

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica**

**Investigação de Parâmetros de Estresse Oxidativo em
Pacientes com Mucopolissacaridose tipo II: o Efeito da
Terapia de Reposição Enzimática**

Letícia Filippon

Orientadora: Prof^a. Dra. Carmen Regla Vargas

Porto Alegre, 2011

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica**

**Investigação de Parâmetros de Estresse Oxidativo em
Pacientes com Mucopolissacaridose tipo II: o Efeito da
Terapia de Reposição Enzimática**

Letícia Filippon

Orientadora: Prof^a. Dra. Carmen Regla Vargas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito à
obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre, 2011

Aos meus pais, Carlos e Ana,
pelo apoio, incentivo e amor
a mim sempre dedicados.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela proteção espiritual.

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Carmen Regla Vargas, pela oportunidade, confiança, amizade e orientação dedicada.

Ao Dr. Roberto Giugliani e às Dras. Ida Vanessa Doederlein Schwartz, Cristina Brinckmann Oliveira Netto, Carolina Fischinger Moura de Souza, Clarissa Gutiérrez Carvalho e Camila Bittar por cooperarem com o estudo e facilitarem o acesso aos pacientes.

À enfermeira Silvani Herber, pelo auxílio na coleta das amostras.

Ao Serviço de Genética Médica, Hospital-dia e Centro de Pesquisa Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, que disponibilizaram a estrutura e os materiais necessários para a realização dos experimentos e coleta das amostras.

Aos colegas do Laboratório de Análise de Metabólitos do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo apoio e imensurável ajuda na realização dos experimentos, e, além de tudo, pela força, amizade e convivência agradável e divertida.

Ao Laboratório da Faculdade de Farmácia da UFRGS, em especial à bioquímica Ana Lúcia Souza Antunes, pela disponibilidade e prontidão no fornecimento das amostras dos controles.

Aos colegas do Hospital Fêmina de Porto Alegre, em especial à minha chefe Maria Regina Braga Batista, pelo apoio, compreensão e flexibilização de horários.

Aos queridos pacientes que participaram deste estudo e aos seus familiares que com muita boa vontade se dispuseram a contribuir com este trabalho, meus sinceros votos de agradecimento e que continuem na luta para um futuro cada vez melhor. Vocês são muito especiais!

Aos meus pais, Carlos e Ana, e à minha irmã, Lauren, pelo constante incentivo, amor, dedicação e torcida, e por sempre acreditarem em mim.

Ao Leonardo, pela força, amor, companheirismo, ajuda e paciência em todos os momentos.

*“Há duas formas para viver sua vida:
Uma é acreditar que não existe milagre.
A outra é acreditar que todas as coisas são um milagre”.*

Albert Einstein

ÍNDICE

RESUMO.....	1
ABSTRACT	2
LISTA DE ABREVIATURAS.....	3
I. INTRODUÇÃO	4
I.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO.....	4
I.1.1 Doenças lisossômicas de depósito.....	5
I.1.1.1 Mucopolissacaridoses.....	6
I.1.1.1.1 Mucopolissacaridose tipo II	12
I.2 ESPÉCIES REATIVAS.....	16
I.3 DEFESAS ANTIOXIDANTES.....	18
I.4 ESTRESSE OXIDATIVO	19
I.5 ESTRESSE OXIDATIVO E ERROS INATOS DO METABOLISMO	20
II. OBJETIVOS	23
II.1 OBJETIVO GERAL	23
II. 2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
III. RESULTADOS	24
III.1 CAPÍTULO I – ARTIGO 01	25
III.2 CAPÍTULO II – ARTIGO 02	49
IV. DISCUSSÃO	71
V. CONCLUSÕES	80
VI. PERSPECTIVAS	81
VII. REFERÊNCIAS	82
ANEXO 1- LISTA DE FIGURAS	95
ANEXO 2 - LISTA DE TABELAS	96
ANEXO 3 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE.....	97
ANEXO 4 – TERMO DE CONSENTIMENTO.....	98
ANEXO 5 – CARTA DE ACEITE DO EDITOR (ARTIGO 01)	101
ANEXO 6 – CARTA DE ACEITE DO EDITOR (ARTIGO 02)	102

RESUMO

Mucopolissacaridose tipo II (MPS II) é uma doença de depósito lisossômico, que possui herança ligada ao cromossomo X, causada pela deficiência da enzima iduronato-2-sulfatase envolvida na degradação dos glicosaminoglicanos (GAGs) dermatan e heparan sulfato. Os GAGs parcialmente degradados acumulam-se nos lisossomos, levando a disfunção celular, tecidual e orgânica. Os mecanismos envolvidos na fisiopatologia desta doença não estão completamente esclarecidos. Considerando que a geração de radicais livres está envolvida na patogênese de várias doenças, inclusive em alguns erros inatos do metabolismo, o objetivo deste trabalho foi avaliar parâmetros de estresse oxidativo em pacientes com MPS II, antes e durante os seis primeiros meses da terapia de reposição enzimática (TRE). Foram verificados níveis aumentados de malondialdeído (MDA) e de grupamentos carbonila plasmáticos assim como da atividade da catalase eritrocitária (CAT) em pacientes com MPS II antes do tratamento quando comparado com os controles. Por outro lado, o conteúdo de grupamentos sulfidrila e o estado antioxidante total (TAS) plasmáticos estavam significativamente diminuídos, enquanto a atividade da superóxido dismutase (SOD) eritrocitária não estava alterada antes do início do tratamento quando comparado com os controles. Durante a TRE, houve uma redução significativa nos níveis de MDA e um aumento significativo de grupamentos sulfidrila, quando comparados com o pré-tratamento. Ainda, foi analisado o dano ao DNA em leucócitos periféricos através do ensaio cometa em pacientes com MPS II no pré-tratamento e durante a TRE. Foi encontrado um aumento significativo no dano ao DNA antes do tratamento quando comparado com os controles e a TRE levou à significativa diminuição desse dano quando comparado com o pré-tratamento. Além disso, foi verificada uma correlação positiva significativa entre o dano ao DNA e os níveis de MDA, assim como com o conteúdo de grupamentos carbonila. Nossos resultados mostram que pacientes com MPS II estão sujeitos a dano oxidativo a lipídios, proteínas e DNA e, pioneiramente, mostram que a TRE é capaz de protegê-los contra esses danos.

ABSTRACT

Mucopolysaccharidosis type II (MPS II) is a lysosomal storage disease, which has X-linked inheritance, caused by deficiency of iduronate-2-sulfatase enzyme involved in degradation of glycosaminoglycans (GAGs) dermatan and heparan sulfate. The partially degraded GAGs accumulate in lysosomes, leading to cellular, tissue and organic dysfunction. The mechanisms involved in the pathophysiology of this disease are not completely understood. Considering that the generation of free radicals is involved in the pathogenesis of many diseases, including some inborn errors of metabolism, the aim of this study was to evaluate oxidative stress parameters in patients with MPS II, before and during the first six months of enzyme replacement therapy (ERT). It was verified significantly increased levels of malondialdehyde (MDA) and carbonyl group content in plasma as well as erythrocyte catalase (CAT) activity in patients with MPS II before treatment when compared with controls. On the other hand, plasma sulfhydryl group content and total antioxidant status (TAS) were significantly reduced, while erythrocyte superoxide dismutase (SOD) activity was not altered before the beginning of treatment when compared to controls. During ERT, there was a significant reduction in MDA levels and a significant increase in sulfhydryl groups, when compared to pretreatment. Also, it was analyzed the DNA damage in peripheral leukocytes by the comet assay in MPS II patients at pretreatment and during ERT. It was verified a significant increase in DNA damage before treatment when compared with controls and ERT induced a significant reduction of this damage compared to pretreatment. Furthermore, we observed a significant positive correlation between DNA damage and MDA levels as well as with carbonyl group content. Our results show that MPS II patients are subject to lipid, protein and DNA oxidative damage and, for the first time, show that ERT is able to protect them against such damage.

LISTA DE ABREVIATURAS

CAT - catalase

DLD - doença lisossômica de depósito

EIM - erros inatos do metabolismo

ERO - espécies reativas de oxigênio

ERN - espécies reativas de nitrogênio

GAGs - glicosaminoglicanos

GR - glutathione redutase

GSH - glutathione reduzida

GSH-Px - glutathione peroxidase

GSSG - glutathione oxidada

I2S - iduronato-2-sulfatase

MDA - malondialdeído

MPS - mucopolissacaridose

NADP⁺ - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma oxidada)

NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)

SOD - superóxido dismutase

TAS - *status* antioxidante total

TBARS - substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TRE - terapia de reposição enzimática

I. INTRODUÇÃO

I.1 Erros inatos do metabolismo

Os erros inatos do metabolismo (EIM) consistem num extenso grupo de doenças hereditárias causadas por mutações em genes que codificam enzimas envolvidas em vias metabólicas. A designação histórica de “erro inato do metabolismo” respeita a denominação inicial do médico inglês Archibal Garrod (1902) que pioneiramente se referiu a estas alterações e as descreveu. Garrod verificou que, em doentes com alcaptonúria, era aparente um bloqueio parcial ou total numa das etapas metabólicas com excreção de quantidades aumentadas de ácido homogentísico na urina, que a tornava escura. Observou ainda que estas alterações eram encontradas em diversos membros de uma mesma família e que eram mais frequentes em descendentes de casais consanguíneos. Ainda, como essas doenças ocorriam em irmãos, filhos de pais normais, tal informação permitiu que Garrod concluísse que havia uma conotação hereditária nessas anomalias. Assim, juntamente com Bateson, um geneticista inglês, Garrod sugeriu o caráter mendeliano recessivo, ou seja, um modelo de herança autossômica recessiva e que a alcaptonúria e outras anomalias metabólicas herdadas eram raras e incomuns (Waber, 1990; Scriver et al., 2001). Apenas em 1958 foi identificada a causa da alcaptonúria como sendo a deficiência na oxidase do ácido homogentísico a nível hepático.

Os EIM são, portanto, defeitos hereditários, devidos à deficiência total ou parcial de uma atividade enzimática, que leva a um bloqueio metabólico com acúmulo de substratos e seus derivados. Tal bloqueio, dependendo da via afetada, repercute clinicamente de maneira bastante variável no indivíduo, sendo geralmente de sintomatologia grave e muitas vezes letal (Waber, 1990; Scriver et al., 2001).

A frequência individual dos EIM é baixa, porém, em conjunto, os aproximados 500 EIM descritos correspondem cerca de 10% de todas as doenças genéticas e atingem um a cada mil nascimentos (Jimenez-Sanchez et al., 2001; Scriver et al., 2001). A maioria dos EIM é de natureza autossômica recessiva e, em menor número de vezes, recessiva ligada ao cromossomo X (Regateiro, 2003).

A identificação de um EIM permite muitas vezes a introdução de um tratamento eficaz. Quando isso não é possível, a ocorrência de novos afetados no mesmo grupo familiar pode ser evitada pela identificação de casais em risco, aos quais pode ser oferecido o aconselhamento genético e, em muitos casos, o diagnóstico pré-natal (Warrs et al., 1975; Kasper et al., 2010; van Spronsen, 2010).

Os EIM podem ser classificados de diversas maneiras, como, por exemplo, de acordo com a área do metabolismo afetada (EIM de aminoácidos, de ácidos orgânicos, de glicídios, de lipídios, de glicosaminoglicanos, de glicoproteínas, etc.) (Scriver et al., 2001). Já a classificação descrita por Saudubray e Charpentier (2001) estabelece três grandes grupos de EIM: defeitos de síntese ou catabolismo de moléculas complexas (doenças lisossômicas de depósito e doenças peroxissomais), defeitos no metabolismo intermediário (doenças que levam a intoxicação aguda ou crônica por acúmulo de componentes tóxicos) e defeitos na produção ou utilização de energia (resultante de um defeito no fígado, músculo, miocárdio e cérebro). Esse trabalho enfoca um EIM pertencente ao grupo das doenças lisossômicas de depósito (DLDs), denominado Mucopolissacaridose (MPS).

I.1.1 Doenças lisossômicas de depósito

As doenças lisossômicas de depósito (DLDs) são um tipo de EIM nas quais há uma deficiência total ou parcial de uma enzima lisossomal específica, levando a

um acúmulo gradual nos lisossomos de macromoléculas complexas não metabolizadas, que podem ser: cerebrosídeos, gangliosídeos, glicogênio, glicoproteínas ou mucopolissacarídeos (Hartung et al., 2004). Apesar dos diferentes tipos de macromoléculas acumuladas, essas doenças mostram algumas similaridades clínicas, como anormalidades ósseas, organomegalias, disfunções do sistema nervoso central e feições grosseiras (Meikle et al., 1999).

As DLDs representam um grupo de aproximadamente 50 doenças e apresentam uma incidência mundial de aproximadamente 1:7700 nascidos vivos (Meikle et al., 1999; Poorthuis et al., 1999; Nelson et al., 2003; Pinto et al., 2004; Baehner et al., 2005; Poupětová et al., 2010). No Brasil, Coelho et al. (1997) encontraram uma frequência relativa de DLDs de 59,8% entre pacientes com EIM.

A gravidade das DLDs dependerá do tipo e da quantidade de macromoléculas acumuladas nas células dos tecidos envolvidos e das consequências patológicas dessa alteração. Na maioria das DLDs, o depósito de compostos não degradados no lisossomo inicia na vida fetal e torna-se clinicamente evidente nos 2 primeiros anos de vida. Muitas destas doenças caracterizam-se por seu curso progressivo, com alta morbidade e aumento da mortalidade, muito embora existam variações significativas entre as diferentes doenças e entre pacientes com a mesma doença (Mabe et al., 2003).

I.1.1.1 Mucopolissacaridoses

As Mucopolissacaridoses (MPS) foram descritas clinicamente pela primeira por Hunter (1917), mas as bases bioquímicas só foram elucidadas entre as décadas de 50 e 60, e só mais recentemente as bases moleculares e os subtipos foram descritos (Wraith, 1996). Em 1952, Brante isolou e identificou a substância

acumulada nos pacientes com gargoilismo, denominação dada aos indivíduos com as características faciais típicas dos pacientes com MPS, como sendo mucopolissacarídeos (ou glicosaminoglicanos - GAGs) e propôs o termo mucopolissacaridose para essas doenças. Em 1968, estes autores demonstraram que o acúmulo desses GAGs é resultante da degradação ineficiente e não de uma síntese excessiva ou de uma redução na sua secreção.

Os GAGs são produtos da degradação celular dos proteoglicanos e são formados por cadeias polissacarídicas ácidas, não ramificadas, compostas por repetições de dissacarídeos. A sua denominação é devida ao fato de um dos açúcares sempre possuir um grupamento amina (N-acetilglicosamina ou N-acetilgalactosamina). O outro açúcar é geralmente um ácido urônico. Os GAGs são componentes da matriz extra-celular onde apresentam-se, com exceção do ácido hialurônico, covalentemente ligados a uma matriz protéica específica formando um grupo diverso de macromoléculas chamadas proteoglicanos. Essa estrutura fornece elasticidade aos tecidos e capacita-os a manter sua conformação característica. Os principais tipos de GAGs são: dermatan sulfato, heparan sulfato, ácido hialurônico, queratan sulfato, condroitin sulfato (4-sulfato e 6-sulfato) e heparina, como representados na figura 1.

De uma maneira geral, a degradação dos GAGs nos lisossomos é iniciada por proteases extracelulares (Neufeld e Muenzer, 2001), que rompem as cadeias polissacarídicas em unidades menores, e, após, pela ação sequencial das enzimas lisossomais, específicas para cada tipo de ligação, produzem monossacarídeos e sulfato inorgânico (Winchester, 1996; Sánches e Fuentes, 2006). A ausência de qualquer uma das onze enzimas comprometidas com este processo leva a um acúmulo intralisossomal de moléculas de GAGs não completamente degradadas,

fazendo com que os lisossomos cheios dessas substâncias se acumulem na célula, interferindo com seu funcionamento normal. A deficiência de uma dessas enzimas denomina-se MPS.

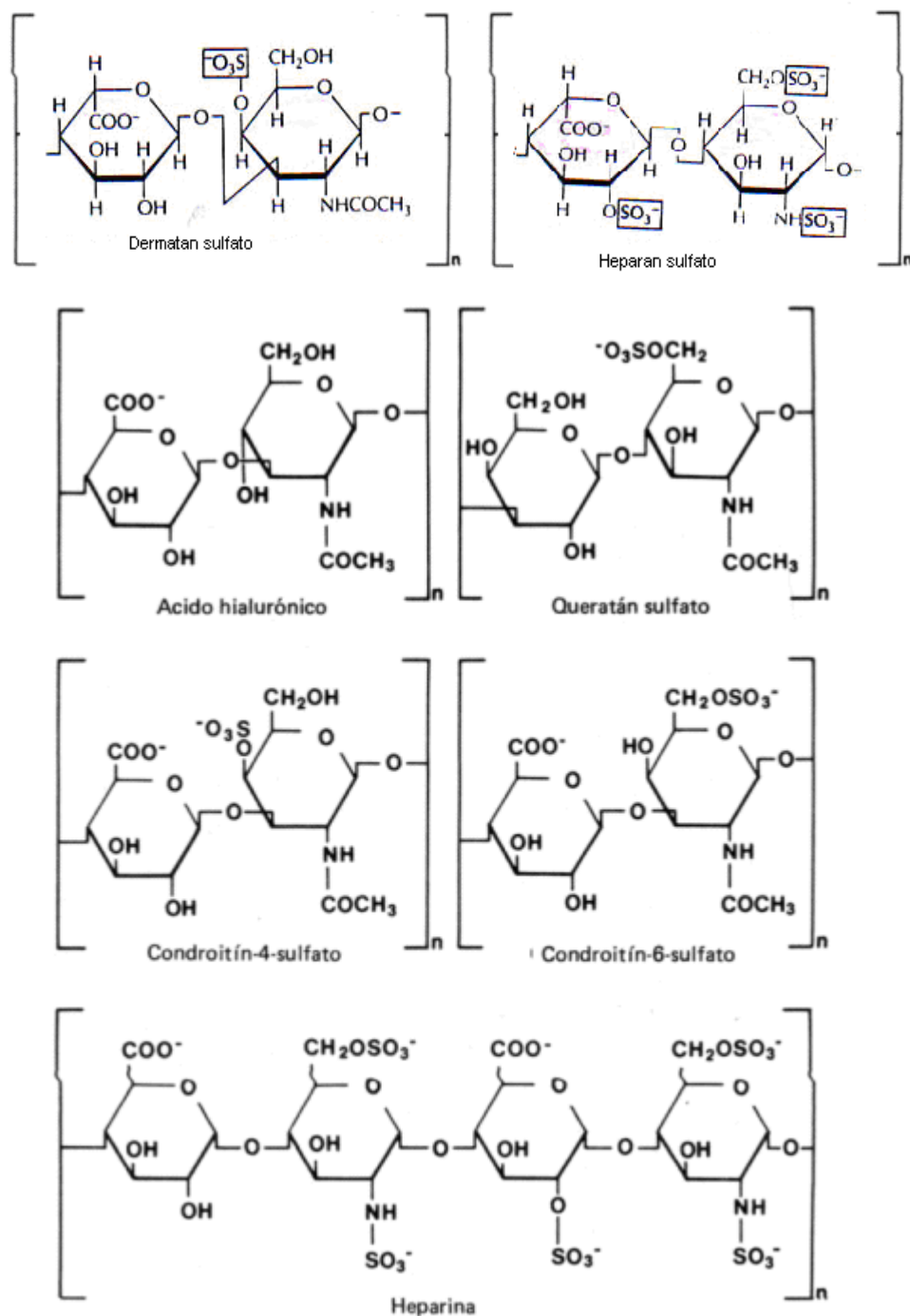


Figura 1. Estrutura química dos GAGs

As MPS são classificadas em 11 fenótipos clínicos, de acordo com o tipo de enzima deficiente (Tabela 1). Contudo, as MPS possuem ampla heterogeneidade clínica, inclusive para uma mesma deficiência enzimática (Neufeld e Muenzer, 2001).

Tabela 1. Classificação das Mucopolissacaridoses (MPS) com indicação do acúmulo de glicosaminoglicanos (GAGs) na urina e deficiência enzimática.

Tipo	Epônimo	GAGs em excesso na urina	Deficiência enzimática
MPS I H	Síndrome de Hurler	Dermatan sulfato e Heparan sulfato	α -L-iduronidase
MPS I H-S	Síndrome de Hurler-Scheie	Dermatan sulfato e Heparan sulfato	α -L-iduronidase
MPS I S	Síndrome de Scheie	Dermatan sulfato e Heparan sulfato	α -L-iduronidase
MPS II	Síndrome de Hunter	Dermatan sulfato e Heparan sulfato	Iduronato-2-sulfatase
MPS III A	Síndrome de Sanfilippo A	Heparan sulfato	Heparan N-sulfatase
MPS III B	Síndrome de Sanfilippo B	Heparan sulfato	α -N-acetil-glicosaminidase
MPS III C	Síndrome de Sanfilippo C	Heparan sulfato	Acetil-coa- α -glicosamina acetiltransferase
MPS III D	Síndrome de Sanfilippo D	Heparan sulfato	N-acetilglicosamina-6-sulfatase
MPS IV A	Síndrome de Morquio A	Queratan sulfato	Galactose-6-sulfatase
MPS IV B	Síndrome de Morquio B	Queratan sulfato	β -galactosidase
MPS VI	Síndrome de Maroteaux-Lamy	Dermatan sulfato	N-acetil-galactosamina 4-sulfatase (Arilsulfatase B)
MPS VII	Síndrome de Sly	Dermatan sulfato e Heparan sulfato	β -glicuronidase
MPS IX	Síndrome de Natowicz	Ácido hialurônico	Hialuronidase

Adaptado de Neufeld e Muenzer, 2001.

Em todas as MPS, o curso é crônico e progressivo, com envolvimento multissistêmico, sendo acometidos principalmente os sistemas esquelético e cardiopulmonar, a pele, a córnea, o fígado, o baço, o cérebro e as meninges. Baixa estatura, perímetro cefálico aumentado, face sugestiva de doença de depósito, envolvimento ocular, cardiopatia, organomegalia, infecções respiratórias, alterações cutâneas, hipoacusia e comprometimento neurológico são algumas das manifestações clínicas apresentadas (Neufeld e Muenzer, 2001).

As MPS possuem padrão de herança autossômico recessivo, exceto para MPS II, que tem herança recessiva ligada ao X. A frequência conjunta é estimada em 1:10.000 a 1:25.000 recém nascidos vivos, sendo que as MPS I e III são relatadas como os tipos mais freqüentes, enquanto as MPS VII e IX parecem ser os tipos mais raros (Meilkle et al., 1999; Poorthuis et al., 1999; Nelson et al., 2003; Pinto et al., 2004; Baehner et al., 2005; Poupětová et al., 2010). No Brasil, não há dados oficiais sobre a incidência das MPS. Contudo, estudo realizado no Laboratório Regional de Erros Inatos do Metabolismo do Hospital de Clínicas de Porto Alegre verificou que as MPS tem uma alta frequência entre os EIM e que os tipos I e VI são os mais freqüentemente identificados na população estudada, seguido por MPS II (Coelho et al., 1997).

Testes de triagem e dados clínicos são muito úteis para o diagnóstico das MPS, porém o padrão-ouro é a medida da atividade da enzima deficiente. Os testes de triagem baseiam-se no fato de que o excesso de GAGs acumulados são excretados na urina, podendo ser identificados neste líquido biológico por testes de turvação ou na visualização de manchas metacromáticas em papel impregnado com corantes (teste do azul de toluidina). Os exames realizados na urina podem ser quantitativos ou qualitativos (cromatografia ou eletroforese). A identificação de GAGs

urinários pode ajudar a discriminar entre as classes de MPS. No entanto, esta identificação não possibilita distinguir entre os subgrupos (ex.: MPS III A, B ou C). O diagnóstico definitivo, então, é estabelecido por ensaio enzimático, geralmente empregando-se pele (fibroblastos) ou sangue (leucócitos) com a utilização de um substrato artificial (cromogênico ou fluorogênico) (Wraith, 1996; Neufeld e Muenzer, 2001; Sánchez e Fuentes, 2006).

Estabelecer a estratégia terapêutica nos pacientes com início precoce da doença é importante para definir o prognóstico, apesar da dificuldade devido ao caráter progressivo deste tipo de doença. Até o momento, não existe cura para as MPS. Entretanto, existem maneiras de melhorar a qualidade de vida destes pacientes. Transplante de células-tronco hematopoiéticas parece ter efeito benéfico em pacientes com MPS I, porém em MPS VI os resultados são controversos e em MPS II, III e IV não tem se mostrado eficaz (Malatack et al., 2003; Heldermon et al., 2010). Estudos em modelos animais de MPS têm analisado a eficácia da terapia gênica e alguns resultados têm sido bastante promissores (Cardone et al., 2006; Beck, 2010). Contudo, a terapia de reposição enzimática (TRE) tem sido o tratamento mais bem sucedido em MPS, assim como em outras DLDs, como na Doença de Fabry e Doença de Gaucher (Schiffmann e Brady, 2002; Desnick, 2004).

A TRE consiste na administração intravenosa da enzima humana recombinante deficiente em cada tipo de MPS. Até o momento, a TRE está apenas disponível para MPS tipo I, II e VI. Já que a enzima não atravessa a barreira hemato-encefálica, a TRE parece não ter influência sobre as manifestações cerebrais da doença. Em pacientes com MPS I, a administração de laronidase (enzima α -L-iduronidase) aumenta significativamente a função respiratória e a capacidade física dos pacientes e diminui o volume do fígado. Além disso, foi

verificada nesta doença uma redução de 25% na hepatoesplenomegalia e uma redução de 80% nos níveis de GAGs excretados (Kakkis et al., 2001; Germain, 2005; Giugliani et al., 2009). Em pacientes com MPS VI, a administração de arilsulfatase B (N-acetilgalactosamina 4-sulfatase) reduziu significativamente os níveis de dermatan sulfato urinários e melhorou a função respiratória e a capacidade física dos pacientes (Harmatz et al., 2008; Harmatz et al., 2010).

I.1.1.1.1 Mucopolissacaridose tipo II (MPS II ou Síndrome de Hunter)

A mucopolissacaridose tipo II (MPS II ou Síndrome de Hunter/OMIM#309900) foi descrita pela primeira vez em 1917 por Charles Hunter (Hunter, 1917). A frequência desta doença é variável entre as populações (Tabela 2).

Tabela 2. Incidência da MPS II em recém-nascidos vivos.

Local	Incidência	Referência
Israel	1:68.000	Schaap e Bach, 1980
Reino Unido	1:264.000	Young et al., 1982
British Columbia, Canadá	1:221.900	Lowry et al., 1990
Holanda	1:149.300	Poorthuis et al., 1999
Austrália	1:320.500	Nelson et al., 2003
Portugal	1:91.700	Pinto et al., 2004
Alemanha	1:156.300	Baehner et al., 2005
República Tcheca	1:233.600	Poupětová et al., 2010

A enzima deficiente nessa síndrome é a iduronato-2-sulfatase (I2S, E.C. 3.1.6.13), necessária para a degradação sequencial do dermatan e heparan sulfato. Essa enzima é uma glicoproteína monomérica contendo 550 aminoácidos e 8 sítios potenciais de N-glicosilação. Ela tem a função de remover o grupo sulfato da

posição 2 do ácido L-idurônico presente no dermatan e no heparan sulfato (Bond et al., 1997). Assim, a deficiência dessa enzima leva a um bloqueio no catabolismo do dermatan sulfato e do heparan sulfato, que se acumulam nos lisossomos (Neufeld e Muenzer, 2001). As figuras 2.A e 2.B representam a rota de degradação sequencial do dermatan e heparan sulfato, respectivamente, nos lisossomos. Cabe ressaltar que a quantidade da atividade enzimática dosada *in vitro* não possui relação com a severidade da doença.

MPS II tem padrão de herança recessiva ligada ao cromossomo X, acometendo principalmente pacientes do sexo masculino. Contudo, algumas mulheres com MPS II têm sido reportadas. Mulheres afetadas geralmente tem baixos níveis da atividade da I2S e um fenótipo clínico atenuado. As portadoras são assintomáticas, com exceção dos casos onde ocorre uma inativação do cromossomo X (Tuschl et al., 2005).

O gene que codifica a I2S tem 9 éxons e 8 íntrons, totalizando aproximadamente 24 kb (www.ncbi.nlm.nih.gov/omim). O gene da I2S se situa no braço longo do cromossomo X (Xq28) e estudos realizados em pacientes com MPS II têm revelado deleções, rearranjos cromossômicos e mutações de ponto. A maioria das mutações se caracteriza por serem do tipo sem sentido ou de troca de sentido (Kim et al., 2003). Cerca de 75 a 80% dos casos decorrem de mutações de ponto e lesões pequenas (deleções, inserções e duplicações de menos de 20 pares de base). Tem sido sugerido que 20 a 25% dos pacientes podem ter deleção parcial ou total, ou rearranjos no gene da I2S. Correlações genótipo-fenótipo tem sido difíceis de serem estabelecidas, com exceção dos pacientes que apresentam grandes deleções ou rearranjos no gene, que são mais frequentemente associadas com a forma mais severa da doença (Wraith et al., 1991). Um pseudogene formado pelas

sequências homólogas dos éxons 2 e 3 e do íntron 7, está localizado cerca de 20 kb do gene ativo (Timms et al., 1995). Mais de 150 diferentes mutações têm sido descritas, resultando em um espectro de fenótipos da doença.

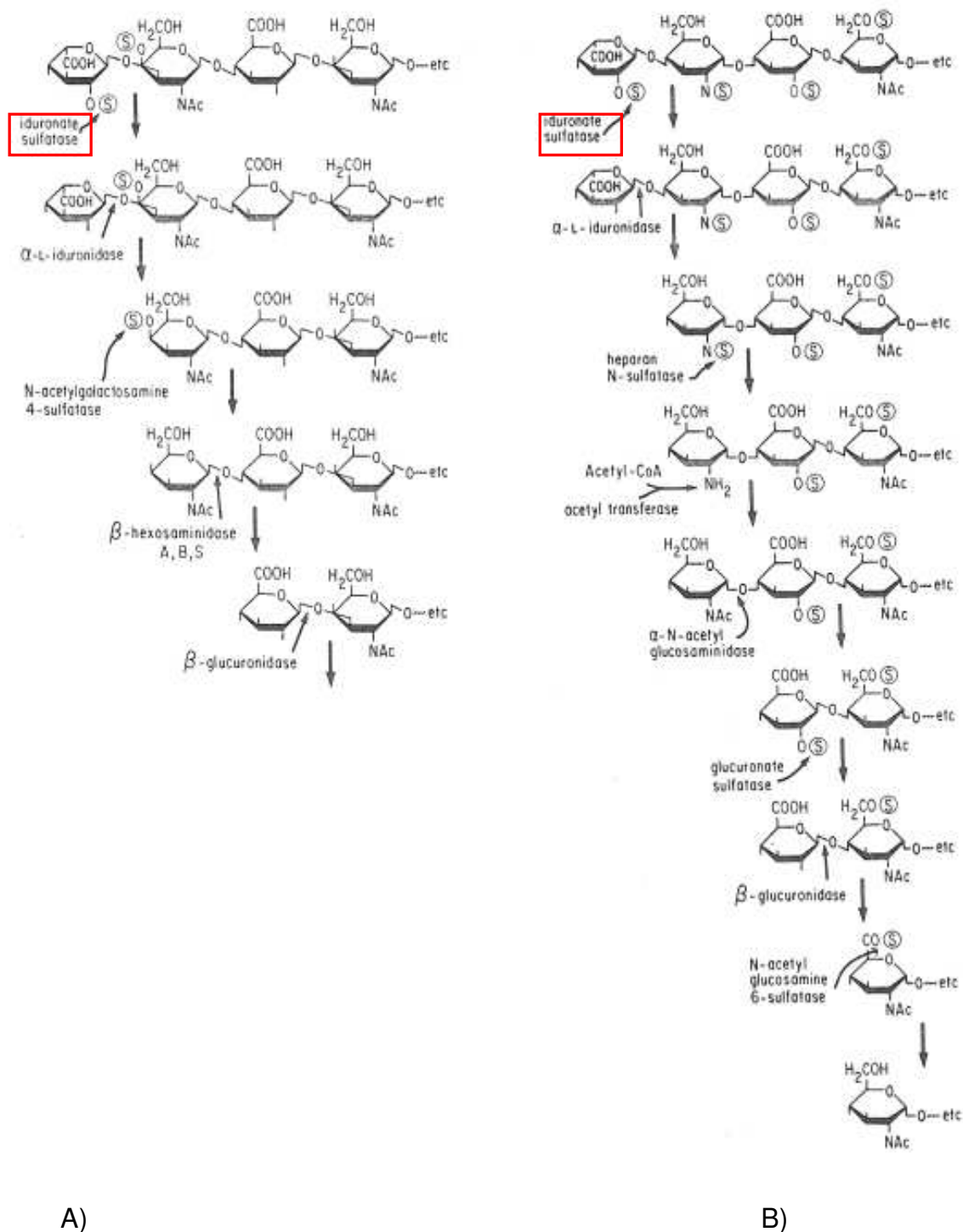


Figura 2. Rota de degradação do dermatan (A) e heparan (B) sulfato nos lisossomos, destacando a enzima iduronato-2-sulfatase, deficiente em MPS II (adaptado de Nelfeld e Muenzer, 2001).

As manifestações clínicas principais encontradas na MPS II são: face grosseira, alterações esqueléticas, baixa estatura, contraturas articulares, retardo mental, infecções recorrentes, surdez e cardiopatia. Quanto aos fenótipos clínicos, pode-se classificar entre formas graves e leves. A forma grave (MPS II A) tem início ao redor dos 2 anos e é similar em suas características à síndrome de Hurler (MPS I – forma grave), com uma sobrevida de até a segunda década de vida. A forma leve ou atenuada (MPS II B) é semelhante à síndrome de Hurler/Scheie (MPS I – forma intermediária), e caracteriza-se por iniciar mais tardiamente, com leve ou nenhum retardo mental e com uma sobrevida de 20 a 30 anos, alguns podendo chegar a 50-60 anos. O critério fundamental para divisão dos pacientes nestes subgrupos é o envolvimento intelectual. Os dois subtipos não podem ser diferenciados pelos resultados da investigação bioquímica. A forma grave é mais frequente (Young et al., 1982).

Essa classificação entre formas leves e graves, baseada no tempo de sobrevivência e na presença ou ausência de doença neurológica, é uma simplificação grosseira. Na verdade, a doença deve ser considerada como um espectro contínuo entre os dois extremos. Vieira e colaboradores (2008) acompanharam pacientes com vários tipos de MPS e revelaram que o grupo de pacientes com MPS II apresentou as manifestações clínicas mais heterogêneas e o maior atraso no diagnóstico, provavelmente devido a ampla heterogeneidade clínica dessa doença.

I2S recombinante (Idursulfase; Elaprase, Shire Human Genetic Therapies, Cambridge, MA, USA) foi recentemente licenciada para o tratamento de pacientes com MPS II no Brasil. Idursulfase é produzida em uma linhagem celular e é uma forma purificada da enzima lisossomal natural. Pacientes com MPS II sob TRE

apresentaram redução significativa dos GAGs urinários, da rigidez articular e do volume do fígado e do baço, além de um aumento significativo na distância de caminhada em 6 minutos. Idursulfase tem se mostrado segura e os efeitos adversos (principalmente urticária e eritema) são leves ou moderados, podendo ser evitados com uso de pré-medicação com anti-histamínicos ou corticóides antes da administração da enzima (Muenzer et al., 2006; Muenzer et al., 2007; Okuyama et al., 2010).

I.2 Espécies reativas

Um radical livre é uma estrutura química que possui um elétron desemparelhado, ou seja, ocupando um orbital atômico ou molecular sozinho. Isso o torna muito instável, extraordinariamente reativo e com uma enorme capacidade para combinar-se inespecificamente e rapidamente com as diversas moléculas integrantes da estrutura celular, como proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos (Halliwell, 2006). Já o termo genérico “espécies reativas de oxigênio” (ERO) é usado para incluir não só os radicais formados pela redução do O_2 , como o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o radical hidroxil ($OH^{\bullet}$), mas também alguns não-radicais derivados do oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio *singlet* (O'_2) (Boveris, 1998; Halliwell e Gutteridge, 2007). Em nosso organismo são produzidas também espécies reativas de carbono, enxofre e nitrogênio (espécies reativas de nitrogênio – ERN, como óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) e o peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$)). Porém, as ERO são as que ganham mais destaque devido à reatividade e aos danos que podem causar.

O ânion superóxido é produzido quando uma molécula de oxigênio é reduzida parcialmente, ou seja, quando recebe apenas um elétron, ao invés de receber dois

elétrons. Quando em excesso, o radical superóxido pode levar à produção de H_2O_2 através da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD). O peróxido formado, reagindo com metais de transição como Fe^{+2} e Cu^{+2} , pode gerar o radical hidroxil, em uma reação denominada reação de Fenton. O radical hidroxil é o mais reativo e danoso radical formado (Halliwell e Gutteridge, 2007). Outro destino do superóxido é a reação com óxido nítrico, formando o peroxinitrito que, por sua vez, pode gerar o radical nitrosil (HONOO). Este, por sua vez, sofrendo decomposição, também forma o radical hidroxil.

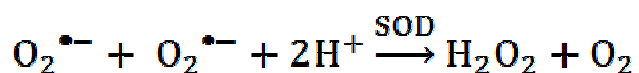
Em condições normais, tanto as ERO como as ERN ocorrem em processos fisiológicos do organismo, como na respiração mitocondrial, na sinalização celular, na síntese e regulação de proteínas, na defesa contra infecções, entre outros (Halliwell e Gutteridge, 2007). Porém, quando formadas em excesso, essas espécies altamente reativas têm o potencial de oxidar moléculas (Maxwell, 1995). Os radicais livres podem promover lipoperoxidação, causar a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), reagir com proteínas, levando à sua inativação e consequente alteração de sua função, e reagir com o DNA e RNA, levando a mutações somáticas e a distúrbios de transcrição (Halliwell e Whiteman, 2004), dentre outros efeitos.

As espécies reativas podem advir de fontes endógenas ou exógenas. Como fontes endógenas, a principal é a redução incompleta do oxigênio durante a transferência de elétrons na cadeia transportadora de elétrons, produzindo o radical superóxido (Halliwell e Gutteridge, 2007). Como fontes exógenas, ressalta-se os radicais advindos da alimentação, de radiação gama e ultravioleta, solventes orgânicos, pesticidas, radiação solar, micotoxinas, traumas, cigarro, ozônio, medicamentos, dentre outras (Van Dyck e Adams, 2003; Hasnis et al., 2007).

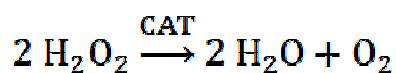
I.3 Defesas antioxidantes

As células contam com defesas antioxidantes, enzimáticas e não-enzimáticas, que agem contra os efeitos danosos das espécies reativas. As primeiras têm a função detoxificadora do agente antes que ele cause lesão, sendo constituídas pela superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona-peroxidase (GSH-Px). Glutathiona (na forma reduzida – GSH), melatonina, ácido úrico, bilirrubina, representam defesas antioxidantes não-enzimáticas produzidas endogenamente pelo organismo. Porém, alguns antioxidantes não-enzimáticos não podem ser sintetizados pelo organismo, devendo ser ingeridos na dieta, como vitaminas (A, C, E, riboflavina e tiamina) e os polifenóis (Halliwell e Gutteridge, 2007; Salvador e Henriques, 2004). Os antioxidantes não enzimáticos atuam na reparação da lesão ocorrida.

A SOD age sobre o radical superóxido, transformando-o em peróxido de hidrogênio e oxigênio através da reação:



Já a CAT age com o peróxido de hidrogênio gerado pela reação anterior ou por outras reações, transformando-o em água por meio da reação:



A GSH-Px também atua sobre o peróxido de hidrogênio por meio de um mecanismo diferente. A GSH-Px participa de um ciclo redox junto da enzima glutathiona redutase (GR), onde GSH é usada pela GSH-Px para transformar H_2O_2 em água; NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato – forma reduzida) é utilizado pela GR para reduzir a glutathiona oxidada (GSSG), na primeira reação, em GSH novamente, retornando à forma NADP^+ (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato – forma oxidada) (Boveris, 1998).

As reações acima estão resumidamente ilustradas na figura 3.

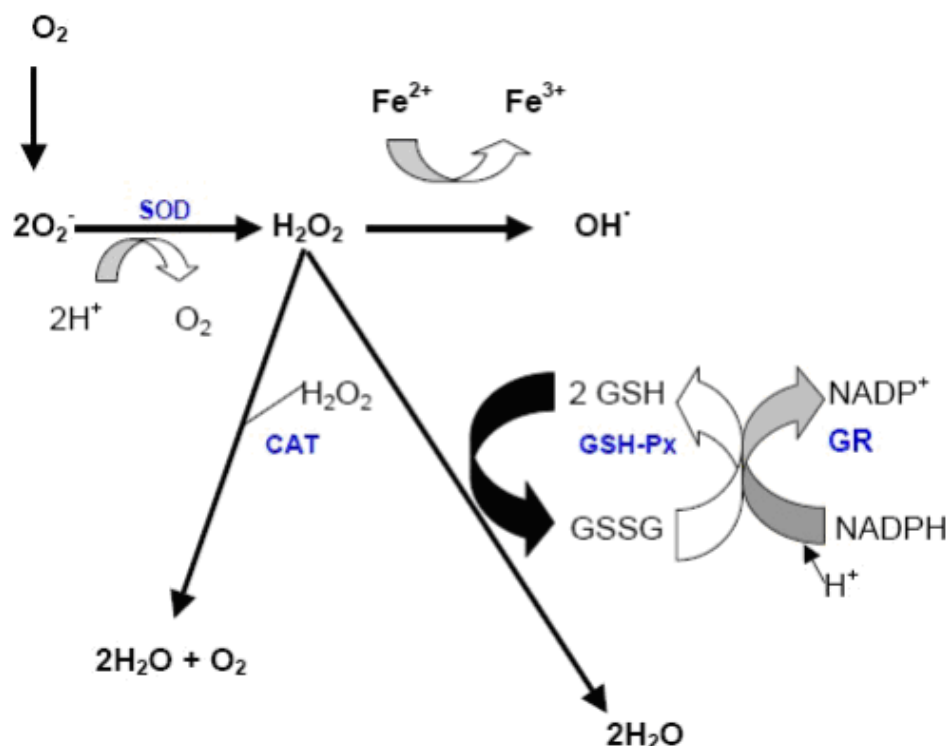


Figura 3. Redução do oxigênio à água, sítios de formação de radicais livres e enzimas antioxidantes (Adaptado de Marks et al., 1996).

I.4 Estresse oxidativo

Nos organismos saudáveis geralmente existe um equilíbrio entre a produção de espécies reativas e as defesas antioxidantes. Entretanto, situações patológicas podem causar o rompimento deste equilíbrio, seja através da diminuição das defesas antioxidantes, seja pelo aumento na produção de espécies reativas e/ou radicais livres, ou, até mesmo, através da combinação de ambas as situações, resultando na situação denominada estresse oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 2007).

O estresse oxidativo pode promover as seguintes situações:

- adaptação, levando a um aumento da síntese de sistemas de defesa antioxidante a fim de restaurar o balanço oxidante/antioxidante. Cabe ressaltar que nem sempre o estresse oxidativo precisa envolver defesas antioxidantes aumentadas;
- dano celular em proteínas, carboidratos, lipídios e DNA;
- morte celular: ocorre por necrose, quando a célula incha e se rompe liberando seu conteúdo para o meio extracelular, ou por apoptose, quando o mecanismo de morte celular programada é ativado e não há a liberação do conteúdo celular (Halliwell e Gutteridge, 2007).

I.5 Estresse oxidativo e erros inatos do metabolismo

O estresse oxidativo está envolvido com o mecanismo de instalação de diversas doenças neurodegenerativas, crônico-inflamatórias, vasculares, genéticas e em vários tipos de câncer. Dentre elas, pode-se destacar: doença de Parkinson e de Alzheimer, esclerose múltipla, distrofia muscular, catarata e retinopatias, aterosclerose, infarto do miocárdio, enfisema pulmonar, cirrose hepática, etc. (Dröge, 2002; Halliwell e Gutteridge, 2007).

Estudos têm mostrado que estresse oxidativo também ocorre em EIM, como em fenilcetonúria (Sitta et al., 2006; Sitta et al., 2009), acidemias malônica e metilmalônica (Fontella et al., 2000; Ribas et al., 2010a; Ribas et al., 2010b), acidemia glutárica (Latini et al., 2003), doença do xarope do bordo (Barschack et al., 2008; Barschack et al., 2009), adrenoleucodistrofia (Deon et al., 2007; Deon et al., 2008), dentre outras. Embora a causa do estresse oxidativo nos EIM ainda não seja inteiramente compreendida, imagina-se que possa estar relacionada ao acúmulo de metabólitos tóxicos, que levariam a uma produção aumentada de radicais livres.

Evidências tanto em estudos experimentais quanto clínicos vem sugerindo o envolvimento do estresse oxidativo e das ERO no desenvolvimento de DLDs. Em pacientes com doença de Gaucher foi demonstrado aumento da atividade da CAT e diminuição da atividade da SOD quando comparado com o grupo controle, sugerindo um desequilíbrio nas defesas antioxidantes enzimáticas desses pacientes (Roversi et al., 2006). Em cultura celular de endotélio vascular de pacientes com doença de Fabry, Shen et al. (2008) verificaram que o acúmulo de globotriaosilceramida, substrato acumulado nessa doença, está associado com aumentada produção de ERO, sendo esta relação dose-dependente. Em doença de Niemann-Pick tipo C, estudos mostraram que fibroblastos humanos deficientes da proteína NPC-1, causa do acúmulo de colesterol e lipídios nos lisossomos de pacientes com essa doença, levam ao aumento da produção de ERO e de ERN (Zampieri et al., 2009). Além disso, alterações em parâmetros antioxidantes foram verificados em pacientes portadores de Niemann-Pick tipo C (Fu et al., 2010).

Em pacientes com MPS I foram encontrados altos níveis de peroxidação lipídica e a TRE induziu algumas alterações na atividade de enzimas antioxidantes, o que sugere que o estresse oxidativo possa ter um importante papel na patogênese desta doença (Pereira et al., 2007). No cérebro e cerebelo de camundongos com MPS IIIB foi verificado aumento da oxidação de proteínas e lipídios (Villani et al., 2009), demonstrando um envolvimento de ERO na patogênese neuronal de pacientes com esta doença.

Tendo em vista que o estresse oxidativo está envolvido na fisiopatologia de muitas doenças, este trabalho propõe avaliar parâmetros de estresse oxidativo em pacientes com MPS II antes de iniciarem a TRE e durante os 6 primeiros meses de tratamento, a fim de melhor elucidar a fisiopatologia desta doença. Cabe salientar

que poucos estudos na literatura descrevem estresse oxidativo em pacientes portadores de DLDs, especialmente em MPS tipo II.

II. OBJETIVOS

II.1 Objetivo geral

Avaliar o estresse oxidativo em amostras de plasma, eritrócitos e leucócitos de pacientes com MPS II, no pré-tratamento e ao longo da terapia de reposição enzimática (TRE), avaliando assim o efeito dessa terapia.

II. 2 Objetivos específicos

II.2.1 Avaliar o estresse oxidativo em pacientes portadores de MPS II no pré-tratamento no que se refere a:

- a) dano a lipídios, através da determinação de malondialdeído (MDA) em plasma;
- b) dano à proteína, através da medida do conteúdo de grupamentos carbonila e sulfidril em plasma;
- c) ação antioxidante enzimática e não enzimática, através da determinação do *status* antioxidante total (TAS) em plasma e da medida da atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) em eritrócitos;
- d) dano ao DNA, através da análise do ensaio cometa em leucócitos.

II.2.2 Avaliar o estresse oxidativo em pacientes portadores de MPS II sob TRE, nos tempos 15 dias, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 meses após o início do tratamento no que se refere a dano a lipídios, proteína e DNA, bem como da ação de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, utilizando os mesmos parâmetros usados para avaliar o pré-tratamento.

III. RESULTADOS

Os resultados serão apresentados na forma de capítulos referentes a artigos científicos.

III.1 Capítulo I – artigo 01

Oxidative Stress in Patients with Mucopolysaccharidosis type II Before and During Enzyme Replacement Therapy

L. Filippon, C.S. Vanzin, G.B. Biancini, I.N. Pereira, V. Manfredini, A. Sitta, M.C.R.

Peralba, I.V.D. Schwartz, R. Giugliani, C.R. Vargas

Periódico: Molecular Genetics and Metabolism

Status: Aceito em 18.02.2011

Oxidative Stress in Patients with Mucopolysaccharidosis type II Before and During Enzyme Replacement Therapy

Letícia Filippon^{a,b}; Camila S. Vanzin^{a,b}; Giovana B. Biancini^{a,b}; Izabela N. Pereira^b; Vanusa Manfredini^b; Angela Sitta^{a,b}; Maria do Carmo R. Peralba^c; Ida V. D. Schwartz^b; Roberto Giugliani^b; Carmen R. Vargas^{a,b*}.

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Ramiro Barcelos 2700, Porto Alegre, RS, 90035-000, Brazil

^b Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, RS, 90035-903, Brazil

^c Instituto de Química Inorgânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Bento Gonçalves 9500, Porto Alegre, RS, 91501-970, Brazil

*** Corresponding author:**

Serviço de Genética Médica, HCPA, Rua Ramiro Barcelos, 2350

CEP 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil.

Phone: +55 51 33598011

Fax: +55 51 33598010

E-mail address: crvargas@hcpa.ufrgs.br (C.R. Vargas)

Abstract

Mucopolysaccharidosis type II (MPS II) is a lysosomal storage disorder caused by deficiency of the enzyme iduronate-2-sulfatase, responsible for the degradation of glycosaminoglycans dermatan and heparan sulfate. Once the generation of free radicals is involved in the pathogenesis of many diseases, including some inborn errors of metabolism, the aim of this study was to evaluate blood oxidative stress parameters in MPS II patients, before and during 6 months of enzyme replacement therapy. We found significantly increased levels of malondialdehyde and carbonyl groups in plasma as well as erythrocyte catalase activity in patients before treatment compared to the control group. Plasma sulfhydryl group content and total antioxidant status were significantly reduced before treatment, while superoxide dismutase enzyme was not altered at this time when compared to controls. During enzyme replacement therapy, there was a significant reduction in levels of malondialdehyde when compared to pretreatment. Sulfhydryl groups were significantly increased until three months of treatment in MPS II patients in comparison to pretreatment. There were no significant alterations in plasma total antioxidant status and carbonyl groups as well as in catalase and superoxide dismutase activities during treatment in relation to pretreatment. The results indicate that MPS II patients are subject to lipid and protein oxidative damage and present reduction in non-enzymatic antioxidants, suggesting a possible involvement of free radicals in the pathophysiology of this disease. Also, the results may suggest that enzyme replacement therapy seems to protect against lipid peroxidation and protein damage in these patients.

Keywords: mucopolysaccharidosis type II, lysosomal storage diseases, oxidative stress, enzyme replacement therapy.

Abbreviations: CAT, catalase; ERT, enzyme replacement therapy; GAGs, glycosaminoglycans; LSD, lysosomal storage diseases; MDA, malondialdehyde; MPS, mucopolysaccharidoses; SOD, superoxide dismutase; TAS, total antioxidant status.

Introduction

The mucopolysaccharidoses (MPS) are a group of inherited metabolic diseases caused by the deficiency of specific lysosomal enzymes responsible for the degradation of glycosaminoglycans (GAGs). The deficiency of iduronate-2-sulfatase (I2S; EC 3.1.6.13), one of the enzymes necessary for the catabolism of heparan sulfate and dermatan sulfate, characterizes the MPS type II (MPS II), also known as Hunter Syndrome [1]. MPS II has an X-linked recessive inheritance pattern and, therefore, occurs mainly in male patients. However, some MPS II cases in women have been already reported [2].

The abnormal storage of the GAGs compromises both the architecture and function of cells and organs, resulting in a broad spectrum of clinical manifestations that are progressive and multisystemic. Common signs and symptoms of this disorder include short stature, hearing loss, coarse facial features, skeletal deformities, hepatosplenomegaly, joint contractures, pulmonary and cardiac dysfunctions and neurodegeneration. On the other hand, the age at the onset of symptoms, symptomatology and disease progression can be variable, with severe and attenuated manifestations [1,3,4].

The incidence of MPS II is estimated in 1:92,000 to 1:320,000 live births [5-9]. In Brazil, there are no official data on the incidence of MPS. However, Coelho *et al.* [10] reported the diagnosis of inborn errors of metabolism in high-risk brazilian patients and revealed that among the inborn errors of metabolism, the lysosomal storage diseases (LSD) represented 59.8%, being the MPS 54.5% of this group. In the same study, MPS types I and VI showed the highest frequencies, followed by MPS II.

Until recently, treatment of MPS II was mainly palliative and focused on alleviating of the multiple clinical symptoms presented by the patients due to the GAGs accumulation in the lysosomes. In 2008, a new treatment for MPS II patients was approved in Brazil: the enzyme replacement therapy (ERT). The recombinant human enzyme therapy showed a significant decrease of the urinary GAGs levels and of the liver and spleen volume, as well as an increase in the mobility of the patients [11-13]. ERT is being the most successful treatment for the MPS II, as well as for other LSD, like Fabry disease, Gaucher disease, MPS type I and MPS type VI [14].

Free radicals and other reactive species are involved in a great number of human disorders, including neurodegenerative, chronic-inflammatory, vascular and neoplastic diseases [15-17]. The imbalance between the production and removal of reactive species might be even more important in LSD due to the lysosomal overload. Lysosomes are very susceptible to the oxidative stress. Reactive species induce lipid peroxidative chain reactions that can result in a destabilization of the lysosomal membrane and release of lysosomal contents into the cytoplasm [18]. A study in mice MPS type I showed alterations in oxidative markers and antioxidant enzymes in the cerebellum and peripheral organs [19]. Another study showed that MPS type I patients presented high levels of lipid peroxidation and that ERT induced some alterations in antioxidant enzyme activities, suggesting that oxidative stress may be an important biochemical event among MPS type I patients, which could contribute to the pathophysiology of the disease [20].

Considering that there are few studies relating MPS II to oxidative stress, the aim of this study was to evaluate oxidative stress parameters in MPS II patients before ERT and during the first six months of treatment, in order to verify whether the oxygen reactive species are involved in the pathophysiology of this disease, and if treatment is capable to alter the oxidative parameters studied.

Materials and methods

Patients and controls

A total of 12 MPS II male patients were included in the study, with ages varying between 1 and 7 years. The main clinical features presented by patients at diagnosis were skeletal deformities, joint contractures, short stature, hepatosplenomegaly, coarse facial features and developmental delay.

MPS II diagnosis was confirmed by measurement of iduronate-2-sulfatase activity in leukocytes and by urinary GAGs quantification [21,22]. Diagnosis and ERT treatment followed the protocol of the Medical Genetic Service of the Clinical Hospital of Porto Alegre, RS, Brazil. The control group consisted of healthy male subjects with similar age of the patients, whose samples were obtained at the Laboratory of Clinical Analysis of Pharmacy Faculty of Federal University of Rio Grande do Sul.

The study was approved by the Ethics Committee of the Clinical Hospital of Porto Alegre. All patients' and control's parents in the present study gave informed consent.

Blood Samples

Blood samples were obtained from patients and controls under sterile conditions in vials containing EDTA anticoagulant. Venous blood was collected from patients in the pretreatment (before the beginning of ERT) and before each session of ERT in the following periods of treatment: 15-day, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 months. Therapy with idursulfase (Elaprase[®] - Shire Human Genetic Therapies Inc., Cambridge, MA, USA) at a dose of 0.5 mg/kg was carried out weekly by intravenous infusion during about 3 hours.

Erythrocyte and plasma preparation

Whole blood was centrifuged at $1,000 \times g$, plasma was removed by aspiration and frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until biochemical determinations. Erythrocytes were washed three times with cold saline solution (0.153 mol/L sodium chloride). Lysates were prepared by addition of 1 mL of distilled water to $100\text{ }\mu\text{L}$ of washed erythrocytes and frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until determination of the antioxidant enzyme activities.

For antioxidant enzyme activity determination, erythrocytes were frozen and thawed three times, and centrifuged at $13,500 \times g$ for 10 min . The supernatant was diluted to approximately 0.5 mg/mL of protein.

Malondialdehyde (MDA) determination

MDA was measured by high performance liquid phase chromatography (HPLC) following the method described by Esterbauer and Cheeseman [23], with slight modifications. Briefly, $100\text{ }\mu\text{L}$ of plasma was mixed with 1.4 mL of distilled water and $600\text{ }\mu\text{L}$ of trichloroacetic acid 28% . After centrifugation, supernatant was removed and MDA was separated by HPLC using an amino-phase column with acetonitrile, 30 mM Tris buffer, $\text{pH } 7.4$ ($1:9, \text{ v/v}$). The flow rate was 0.5 mL/min and the effluent was monitored at 267 nm , the absorption maximum of the enolate anion form of free MDA. The system was calibrated with a standard solution of MDA, which was used for quantification. Results were expressed as μM of MDA.

Sulphydryl content determination

This assay is based on the reduction of 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) by thiols, generating a yellow derivative (TNB) whose absorption is measured spectrophotometrically at 412 nm , according to the method described by Aksenov and

Markesbery [24]. The plasma sulfhydryl content is inversely correlated to oxidative damage to proteins. Results were reported as nmol TNB/mg protein.

Determination of protein carbonyl content

Plasma carbonyl content was measured according to the method described by Levine *et al.* [25]. Quantification was performed using a spectrophotometer at 370 nm. The carbonyl content was calculated using a millimolar absorption coefficient of the hydrazone ($21.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Values of carbonyl content were expressed in nmol carbonyl/mg protein.

Determination of total antioxidant status (TAS)

TAS was determined in plasma using the TAS[®] kit (Randox, Antrim, United Kingdom). ABTS[®] (2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonate]) was incubated with a peroxidase and H_2O_2 to produce the radical ABTS^{®+}. This has a relatively stable blue-green colour, which was measured at 600 nm. Antioxidants cause suppression of this colour production to a degree which is proportional to their concentration [26]. Results were expressed in mmol/L of plasma.

Catalase assay (CAT)

Erythrocytes CAT activity was assayed measuring the absorbance decrease at 240 nm in a reaction medium containing 20 mM H_2O_2 , 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0 and 0.1–0.3 mg protein/mL, according to the method described by Aebi [27]. One unit of the enzyme is defined as 1 μmol of H_2O_2 consumed per minute and the specific activity is reported as units per mg protein.

Superoxide dismutase (SOD)

Erythrocytes SOD activity was determined using the RANSOD[®] kit (Randox, Antrim, United Kingdom). The method is based on the formation of red formazan from the reaction of 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride and superoxide radical (produced in the incubation medium from the xanthine-xanthine oxidase reaction system), which is assayed spectrophotometrically at 505 nm. The inhibition of the produced chromogen is proportional to the activity of the SOD present in the sample. A 50% inhibition is defined as one unit of SOD and the specific activity is represented as units per mg protein.

Protein determination

Erythrocyte protein concentrations were determined by the method of Lowry *et al.* [28] and plasmatic protein concentrations were determined by Biuret method using a diagnostic kit (Labtest Kit[®], Lagoa Santa, Minas Gerais, Brazil). Bovine serum albumin was used as standard.

Statistical Analysis

All data were presented as mean $\pm$ standard deviation (S.D.). Student's *t*-tests for unpaired samples were used to compare means of controls with pretreatment or controls with different treatment periods. In order to evaluate the differences between pretreatment and different treatment periods, Generalized Estimating Equations method was used, followed by Bonferroni test. A *p* value lower than 0.05 was considered significant. All statistical analyses were performed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) version 18.0, in a PC-compatible computer.

Results

The levels of MDA, a product of lipid peroxidation, were increased in patients with MPS II before the ERT and during the first 6 months of treatment, when compared to controls ($p<0.001$). A significant reduction of MDA levels was observed during ERT when compared to the pretreatment group ($p<0.001$), but the values did not reach the controls (Figure 1).

Patients in pretreatment showed significantly decreased sulfhydryl group and increased carbonyl group content, when compared to the control group ($p<0.001$ and $p<0.05$, respectively), indicating a probable damage to proteins (Figures 2 and 3). It was observed during the treatment a significant increase of the levels of sulfhydryl group content, in relation to the pretreatment levels ($p<0.05$), until the third month of treatment. However, after three months of treatment, the values returned to the baseline (pretreatment). On the other hand, the formation of carbonyl groups, which was significantly increased before treatment ($p<0.05$), was not altered during the first six months of ERT, compared to pretreatment.

The measure of TAS, that represent non-enzymatic antioxidant levels, was significantly reduced in the pretreatment when compared to the control group, as demonstrated in Figure 4, remaining decreased during the first five months of ERT ($p<0.05$). There was an increase in the TAS levels at the sixth month of ERT, reaching a value statistically similar to controls.

CAT activity, an enzyme responsible for removal of hydrogen peroxide from cells, was increased in patients with Hunter syndrome in pretreatment when compared to controls ($p<0.05$). During ERT, CAT activity showed a significant transient increase, when compared to controls ($p<0.05$), returning to control values at the sixth month of ERT (Figure 5). There was no significant difference in SOD activity in pretreatment compared to controls, and no changes occurred during ERT, with the exception of the sixth month, in which there was a significant increase of SOD activity, compared to controls ($p<0.05$) (Figure 6).

Discussion

The increase in size and number of the lysosomes in an attempt to retain the growing concentration of undegraded material due to enzymatic deficiency characterizes the primary cause of LSD. However, the delineation of the biochemical and cellular pathways that cause the pathology remains the most intriguing question about these disorders [29].

Reactive species are formed and degraded during normal aerobic metabolism in cells at physiological concentrations, required for the proper functioning of the body. However, uncontrolled production of free radicals results in oxidative damage to biomolecules, leading to altered function and disease [30]. The involvement of reactive species is described in more than 100 human diseases [31], including inborn errors of metabolism [32-36]. Despite many studies relating oxidative damage to inborn errors of metabolism, there are few studies on LSD, especially MPS. It is known nevertheless that in this group of diseases the imbalance between formation and removal of reactive species might be even more important due to the lysosomal overload [19,20]. Some recent studies have shown that lysosomes are very susceptible to oxidative stress, leading to release of hydrolases and metabolites accumulated in the cytosol. It is well known that lysosomal destabilization can lead to apoptosis and necrosis, besides mitochondrial damage with secondary increase in production of superoxide and hydrogen peroxide [18].

It is widely established that various reactive oxygen species react with membrane lipids and proteins, altering cell membrane fluidity and giving rise to carbonyl group formation into side-chains or reduction of sulfhydryl groups of susceptible amino acids [37,38]. In this study we found increased levels of MDA and protein carbonyl content, besides a reduction of the sulfhydryl group content in plasma of MPS II patients at pretreatment when compared to healthy subjects, suggesting that patients present lipid peroxidation and protein damage. Lipid peroxidation is capable to induce alteration of

integrity, fluidity, permeability and functional loss of biomembranes, generating potentially toxic products [31]. Alterations of protein structure may affect the function of receptors, enzymes and transport proteins, resulting in a partial or complete loss of protein functionality [25]. Increased formation of carbonyl groups, as observed in this study, can also cause an autoimmune response due to the recognition of altered proteins as exogenous [31] which, in turn, can trigger and/or intensify an inflammatory process. On the other hand, sulfhydryl groups in proteins may have an antioxidant function since may scavenge oxidants, thus sparing antioxidants and/or cellular constituents from attack [39]. Various studies indicate a strong role for increases in protein oxidation as well as in lipid peroxidation as an important cause of cellular dysfunction in metabolic and neurological diseases [15,40,41]. Therefore, it is conceivable that the protein and lipid oxidative damage verified in the present work in MPS II patients may have pathophysiological significance and underlie the injury found in the affected patients. Besides, it was also verified a TAS reduction in the plasma of MPS II patients in the pretreatment, reflecting a decrease in the total amount of tissue non-enzymatic antioxidants, suggesting a poor ability to modulate the damage associated with the increased production of reactive species. Oxidative stress has been associated with MPS I and MPS III [19,20,42] but there is almost nothing described in literature related to MPS II [43].

Cells exposed to oxidative stress may enhance the antioxidant defenses in an attempt to reestablish homeostasis. In our study there were no changes in SOD activity in pretreatment, but there was an increase in CAT activity before ERT in MPS II patients. Pereira *et al.* [20] showed that MPS type I patients had increased values of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), another parameter of lipid peroxidation, before the start of ERT, while SOD and CAT activities were similar to the reference levels. On the other hand, Reolon and colleagues [19] found decreased levels of TBARS and increased formation of carbonyl groups in the cerebellum of MPS type I mice model. The authors suggest that the

increased CAT and SOD activities observed in this organ may have led to a decrease in the lipid peroxidation, but it was not sufficient to decrease protein damage. Increased oxidation of proteins and lipids was also detected in the cerebellum of young mice with MPS type IIIB [42] and deposition of an end-product of lipoperoxidation was observed in MPS II human brain tissue [43].

The recombinant human enzyme idursulfase, recently approved in Brazil for the treatment of MPS II patients, hydrolyzes the 2-sulfate esters of terminal iduronate sulfate residues from the GAGs dermatan sulfate and heparan sulfate in the lysosomes of various cell types. The secondary biochemical changes that occur after administration of the enzyme are however unknown. In this study, we found a significant decrease in plasma MDA levels from MPS II patients during ERT treatment. There was also verified an increase in the levels of sulfhydryl group content, although this change was significantly different from pretreatment only in the first three months. These results showed that the protein and lipid damage is reduced during ERT treatment.

In relation to antioxidants enzymes, we observed transient increased values of CAT activity during ERT, when compared to the control group, but at the end of six months the levels were equal to those of controls. On the other hand, SOD activity was significantly increased only in the sixth month of ERT when compared to controls. Pereira *et al.* [20] verified that different ERT treatment periods induced some changes in the activity of erythrocyte antioxidant enzymes SOD and CAT in MPS type I patients. The referred authors verified an increase in CAT activity and a transient decrease in SOD activity after ERT and suggested that once erythrocytes can absorb hydrogen peroxide from other cells [31], the increase of CAT activity might be caused by an increased production of hydrogen peroxide from different tissues. Otherwise, TAS measurement from MPS II patients of our study, that represent non-enzymatic antioxidant levels, reached values similar to control group after six

month of ERT, suggesting that non-enzymatic antioxidant defenses need a long time to be restored.

Presence of cytokines and other inflammatory mediators have suggested the involvement of inflammation in the pathophysiology of LSD, such as Gaucher disease [44], Fabry disease [45], gangliosidoses [46,47] as well as MPS [48]. The severe neurological disorder which occurs in MPS type I and type IIIB seems to be related with oxidative stress and activation of microglia [42,49]. Oxidative stress can lead to lysosomal destabilization in the brain, promoting the release of proteolytic enzymes, causing apoptosis or necrosis of Purkinje cells and activating the phagocytic cells of the microglia. The secretion of potentially neurotoxic cytokines and chemokines triggers an inflammatory process and enhances the oxidative damage. Jeyakumar *et al.* verified that substrate reduction therapy decreased glycosphingolipids storage in the Sandhoff mouse model coincidentally with reduction in the extent of inflammation, featuring microglial activation and/or macrophages infiltration in central nervous system [46]. Additionally, Simonaro *et al.* [50,51] analyzed MPS type VI and VII animal model and revealed that synovial fibroblasts and fluid have elevated expression of numerous inflammatory molecules and cytokines, secondary to GAGs accumulation. Then, since ERT leads to a decrease in the GAGs storage and that in the present study we verified that ERT restored some oxidative parameters, it is plausible to hypothesize that the accumulation of intralysosomal GAGs, directly or indirectly, may have an influence on the oxidative imbalance and possibly in the inflammatory process in MPS II patients. Moreover, alterations of inflammatory mechanisms and/or oxidative stress could explain the joint and neurological injury found in these patients.

In summary, our results show that oxidative damage to lipids and protein occurs in patients with MPS II, suggesting that these processes may be involved in the pathophysiology of the disease. To our knowledge this is the first study that describes that ERT administration

reduces lipid and protein oxidative damage in MPS II, showing evidence that ERT seems to play a protective role against oxidative stress, probably contributing to a better prognosis of the disease.

Acknowledgements

This work was supported in part by grants from CAPES, CNPq and FIPE/HCPA-Brazil.

Conflict of interest disclosure

The authors declare that there is no conflict of interest disclosure associated with this manuscript.

References

- [1] E.F. Neufeld, J. Muenzer, The mucopolysaccharidoses, in: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, eighth ed., McGraw-Hill, New York, 2001, pp. 3421–3452.
- [2] K. Tuschl, A. Gal, E. Paschke, S. Kircher, O.A. Bodamer, Mucopolysaccharidosis type II in females: case report and review of literature, *Pediatr. Neurol.* 32 (2005) 270–272.
- [3] I.D. Young, P.S. Harper, R.G. Newcombe, I.M. Archer, A clinical and genetic study of Hunter's syndrome 2: differences between the mild and severe forms, *J. Med. Genet.* 19 (1982) 408–411.
- [4] T. Vieira, I. Schwartz, V. Muñoz, L. Pinto, C. Steiner, M. Ribeiro, R. Boy, V. Ferraz, A. de Paula, C. Kim, A. Acosta, R. Giugliani, Mucopolysaccharidoses in Brazil: what happens from birth to biochemical diagnosis? *Am. J. Med. Genet. Part A.* 146 (2008) 1741–1747.
- [5] J. Nelson, J. Crowhurst, B. Carey, L. Greed, Incidence of the mucopolysaccharidoses in Western Australia, *Am. J. Med. Genet. Part A.* 123 (2003) 310–313.
- [6] F. Baehner, C. Schmiedeskamp, F. Krummenauer, E. Miebach, M. Bajbouj, C. Whybra, A. Kohlschütter, C. Kampmann, M. Beck, Cumulative incidence rates of the mucopolysaccharidoses in Germany, *J. Inherit. Metab. Dis.* 28 (2005) 1011–1017.
- [7] H. Poupětová, J. Ledvinová, L. Berná, L. Dvořáková, V. Kožich, M. Elleder, The birth prevalence of lysosomal storage disorders in the Czech Republic: comparison with data in different populations, *J. Inherit. Metab. Dis.* 33 (2010) 387–396.

- [8] P.J. Meikle, J.J. Hopwood, A.E. Claque, W.F. Carey, Prevalence of lysosomal storage disorders, *JAMA*. 281 (1999) 249-254.
- [9] R. Pinto, C. Caseiro, M. Lemos, L. Lopes, A. Fontes, H. Ribeiro, E. Pinto, E. Silva, S. Rocha, A. Marcao, I. Ribeiro, L. Lacerda, G. Ribeiro, O. Amaral, M.C. Sa Miranda, Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal, *Eur. J. Hum. Genet.* 12 (2004) 87-92.
- [10] J.C. Coelho, M. Wajner, M.G. Burin, C.R. Vargas, R. Giugliani, Selective screening of 10,000 high-risk Brazilian patients for the detection of inborn errors of metabolism, *Eur. J. Pediatr.* 156 (1997) 650-654.
- [11] J. Muenzer, M. Gucsavas-Calikoglu, S.E. McCandless, T.J. Schuetz, A. Kimura, A phase I/II clinical trial of enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome), *Mol. Genet. Metab.* 90 (2007) 329-337.
- [12] J. Muenzer, J.E. Wraith, M. Beck, R. Giugliani, P. Harmatz, C.M. Eng, A. Vellodi, R. Martin, U. Ramaswami, M. Gucsavas-Calikoglu, S. Vijayaraghavan, S. Wendt, A.C. Puga, B. Ulbrich, M. Shinawi, M. Cleary, D. Piper, A.M. Conway, A. Kimura, A phase II/III clinical study of enzyme replacement therapy with idursulfase in mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome), *Genet. Med.* 8 (2006) 465-473.
- [13] T. Okuyama, A. Tanaka, Y. Suzuki, H. Ida, T. Tanaka, G.F. Cox, Y. Eto, T. Orii, Japan Elaprase[®] Treatment (JET) study: Idursulfase enzyme replacement therapy in adult patients with attenuated Hunter syndrome (Mucopolysaccharidosis II, MPS II), *Mol. Gen. Metab.* 99 (2010) 18-25.
- [14] R.J. Desnick, Enzyme replacement and enhancement therapies for lysosomal diseases, *J. Inherit. Metab. Dis.* 27 (2004) 385-410.
- [15] B. Halliwell, Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity cause or consequence? *Lancet.* 344 (1994) 721-724.
- [16] A.Z. Reznick, L. Packer, Free radicals and antioxidants in muscular neurological diseases and disorders, in: G. Poli, E. Albano, M.U. Dianzani (Eds.), *Free Radicals: From Basic Science to Medicine*, Birkhäuser Verlag, Basel, 1993, pp. 425-437.
- [17] E. Bem-Menachem, R. Kylleman, S. Markleind, Superoxide dismutase and glutathione peroxidase function in progressive myoclonus epilepsies, *Epilepsy Res.* 40 (2000) 33-39.
- [18] A. Terman, T. Kurz, B. Gustafsson, U.T. Brunk, Lysosomal Labilization, *IUBMB Life* 58 (2006) 531-539.
- [19] G.K. Reolon, A. Reinke, M.R. Oliveira, L.M. Braga, M. Camassola, M.E. Andrades, J.C.F. Moreira, N.B. Nardi, R. Roesler, F. Dal-Pizzol, Alterations in oxidative markers in the cerebellum and peripheral organs in MPS I mice, *Cell. Mol. Neurobiol.* 29 (2009) 443-448.
- [20] V.G. Pereira, A.M. Martins, C. Micheletti, V. D'Almeida, Mutational and oxidative stress analysis in patients with mucopolysaccharidosis type I undergoing enzyme replacement therapy, *Clin. Chim. Acta.* 387 (2007) 75-79.

- [21] J.G.N. de Jong, R.A. Wevers, R. Liebrand-van Sambeek, Measuring urinary glycosaminoglycans in the presence of protein: an improved screening procedure for mucopolysaccharidoses based on dimethylmethylene blue, *Clin. Chem.* 38 (1992) 803–807.
- [22] Y.V. Voznyi, J.I.M. Keulemans, O.P. van Diggelen, A fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of MPS II (Hunter disease), *J. Inherit. Metab. Dis.* 24 (2001) 675–680.
- [23] H. Esterbauer, K.H. Cheeseman, Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal, *Methods Enzymol.* 186 (1990) 407–421.
- [24] M.Y. Aksenov, W.R. Markesbery, Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease, *Neurosci. Lett.* 302 (2001) 141–145.
- [25] R.L. Levine, D. Garland, C.N. Oliver, A. Amici, L. Climent, A.G. Lenz, B.W. Ahn, S. Shalthiel, E.R. Stadman, Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins, *Methods Enzymol.* 186 (1990) 464–478.
- [26] N.J. Miller, C. Rice-Evans, M.J. Davies, V. Gopinathan, A. Milner, A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates, *Clin. Sci.* 84 (1993) 407–412.
- [27] H. Aebi, Catalase in vitro, *Methods Enzymol.* 105 (1984) 121–126.
- [28] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [29] A.H. Futerman, G. van Meer, The cell biology of lysosomal storage disorders, *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* 5 (2004) 554–565.
- [30] P. Evans, B. Halliwell, Free radicals and hearing: cause, consequence, and criteria, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 884 (1999) 19–40.
- [31] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, *Free radicals in biology and medicine*, fourth ed., Oxford University Press, New York, 2007.
- [32] M. Deon, M. Wajner, L.R. Sirtori, D. Fitarelli, D. Coelho, A. Sitta, A.G. Barschak, G.C. Ferreira, A. Haeser, R. Giugliani, C.R. Vargas, The effect of Lorenzo's oil on oxidative stress in X-linked adrenoleukodystrophy, *J. Neurol. Sci.* 247 (2006) 157–164.
- [33] M. Wajner, A. Latini, A.T. Wyse, C.S. Dutra-Filho, The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidurias: insights from animal studies, *J. Inherit. Metab. Dis.* 27 (2004) 427–448.
- [34] A.G. Barschak, A. Sitta, M. Deon, M.H. Oliveira, A. Haeser, C.S. Dutra-Filho, M. Wajner, C.R. Vargas, Evidence that oxidative stress is increased in plasma from patients with maple syrup urine disease, *Metab. Brain Dis.* 21 (2006) 279–286.

- [35] A. Latini, R. Borba Rosa, K. Scussiato, S. Llesuy, A. Belló-Klein, M. Wajner, 3-hydroxyglutaric acid induces oxidative stress and decreases the antioxidant defences in cerebral cortex of young rats, *Brain Res.* 956 (2002) 367-373.
- [36] A. Sitta, A.G. Barschak, M. Deon, T. Terroso, R. Pires, R. Giugliani, C.S. Dutra-Filho, M. Wajner, C.R. Vargas, Investigation of oxidative stress parameters in treated phenylketonuric patients, *Metab. Brain Dis.* 21 (2006) 287-296.
- [37] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, Oxidative stress: adaptation, damage, repair and death, in: B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge (Eds.), *Free radicals in biology and medicine*, third ed., Oxford University Press, New York, 1999, pp. 246–350.
- [38] R.L. Levine, Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease, *Free Radic. Biol. Med.* 32 (2001) 790–796.
- [39] E. Bourdon, D. Blache, The importance of proteins in defense against oxidation, *Antioxid. Redox Signal.* 3 (2001) 293-311.
- [40] D.A. Butterfield, A. Gnjec, H.F. Poon, A. Castegna, W.M. Pierce, J.B. Klein, R.N. Martins, Redox proteomics identification of oxidatively modified brain proteins in inherited Alzheimer's disease: an initial assessment, *J. Alzheimers Dis.* 10 (2006) 391-397.
- [41] R.M. Adibhatla, J.F. Hatcher, Lipid oxidation and peroxidation in CNS health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities, *Antioxid. Redox Signal.* 12 (2010) 125-169.
- [42] G.R.D. Villani, C. Di Domenico, A. Musella, F. Cecere, D. Di Napoli, P. Di Natale, Mucopolysaccharidosis IIIB: oxidative damage and cytotoxic cell involvement in the neuronal pathogenesis, *Brain Res.* 1279 (2009) 99–108.
- [43] K. Hamano, M. Hayashi, K. Shioda, R. Fukatsu, S. Mizutani, Mechanisms of neurodegeneration in mucopolysaccharidoses II and IIIB: analysis of human brain tissue, *Acta Neuropathol.* 115 (2008) 547–559.
- [44] G. Altarescu, A. Zimran, H. Michelakakis, D. Elstein, TNF-alpha levels and TNF-alpha gene polymorphism in type I Gaucher disease, *Cytokine* 31 (2005) 149–152.
- [45] G. Altarescu, G. Chicco, C. Whybra, S. Delgado-Sanchez, N. Sharon, M. Beck, D. Elstein, Correlation between interleukin-6 promoter and C-reactive protein (CRP) polymorphisms and CRP levels with the Mainz Severity Score Index for Fabry disease, *J. Inherit. Metab. Dis.* 31 (2008) 117–123.
- [46] M. Jeyakumar, R. Thomas, E. Elliot-Smith, D.A. Smith, A.C. van der Spoel, A. d'Azzo, V.H. Perry, T.D. Butters, R.A. Dwek, F.M. Platt, Central nervous system inflammation is a hallmark of pathogenesis in mouse models of GM1 and GM2 gangliosidosis, *Brain* 126 (2003) 974–987.
- [47] M. Jeyakumar, D.A. Smith, I.M. Williams, M.C. Borja, D.C. Neville, T.D. Butters, R.A. Dwek, F.M. Platt, NSAIDs increase survival in the Sandhoff disease mouse: synergy with N-butyldeoxynojirimycin, *Ann. Neurol.* 56 (2004) 642–649.

- [48] G.R.D. Villani, N. Gargiulo, R. Faraonio, S. Castaldo, E.G. Reyero, P. Di Natale, Cytokines, neurotrophins, and oxidative stress in brain disease from Mucopolysaccharidosis IIIB, *J. Neurosci. Res.* 85 (2007) 612–622.
- [49] K. Ohmi, D.S. Greenberg, K.S. Rajavel, S. Ryazantsev, H.H. Li, E.F. Neufeld, Activated microglia in cortex of mouse models of mucopolysaccharidoses I and IIIB, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (2003) 1902–1907.
- [50] C.M. Simonaro, M. D'Angelo, X. He, E. Eliyahu, N. Shtraizent, M.E. Haskins, E.H. Schuchman, Molecular pathogenesis of genetic and inherited diseases mechanism of glycosaminoglycan-mediated bone and joint disease: implications for the Mucopolysaccharidoses and other connective tissue diseases, *Am. J. Pathol.* 172 (2008) 112–122.
- [51] C.M. Simonaro, M.E. Haskins, E.H. Schuchman, Articular chondrocytes from animals with a dermatan sulfate storage disease undergo a high rate of apoptosis and release nitric oxide and inflammatory cytokines: a possible mechanism underlying degenerative joint disease in the mucopolysaccharidoses, *Lab. Invest.* 81 (2001) 1319–1328.

Figure legends

Figure 1. Malondialdehyde content in plasma from controls and MPS II patients before ERT (pretreatment) and at different periods of treatment (15-day, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 months). Data represent the mean $\pm$ S.D. (controls: n = 13; MPS II patients: n = 12). * $p < 0.001$, compared to controls (Student's *t*-tests for unpaired samples); # $p < 0.001$, compared to pretreatment group (Generalized Estimating Equations, followed by Bonferroni test).

Figure 2. Sulfhydryl content in plasma from controls and MPS II patients before ERT (pretreatment) and at different periods of treatment (15-day, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 months). Data represent the mean $\pm$ S.D. (controls: n = 12; MPS II patients: n = 12). * $p < 0.05$, compared to controls; ** $p < 0.001$, compared to controls (Student's *t*-tests for unpaired samples); # $p < 0.05$, compared to pretreatment group; ## $p < 0.001$, compared to pretreatment group (Generalized Estimating Equations, followed by Bonferroni test).

Figure 3. Carbonyl content in plasma from controls and MPS II patients before ERT (pretreatment) and at different periods of treatment (15-day, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 months). Data represent the mean $\pm$ S.D. (controls: n = 6; MPS II patients: n = 12). * $p < 0.05$, compared to controls; ** $p < 0.001$, compared to controls (Student's *t*-tests for unpaired samples).

Figure 4. TAS measurement in plasma from controls and MPS II patients before ERT (pretreatment) and at different periods of treatment (15-day, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 months). Data represent the mean $\pm$ S.D. (controls: n = 6; MPS II patients: n = 12). * $p < 0.05$, compared to controls (Student's *t*-tests for unpaired samples).

Figure 5. CAT activity measurement in erythrocytes from controls and MPS II patients before ERT (pretreatment) and at different periods of treatment (15-day, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 months). Data represent the mean $\pm$ S.D. (controls: n = 6; MPS II patients: n = 12). * $p < 0.05$, compared to controls (Student's *t*-tests for unpaired samples).

Figure 6. SOD activity measurement in erythrocytes from controls and MPS II patients before ERT (pretreatment) and at different periods of treatment (15-day, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 months). Data represent the mean $\pm$ S.D. (controls: n = 13; MPS II patients: n = 12). * $p < 0.05$, compared to controls (Student's *t*-tests for unpaired samples).

Figure 1.

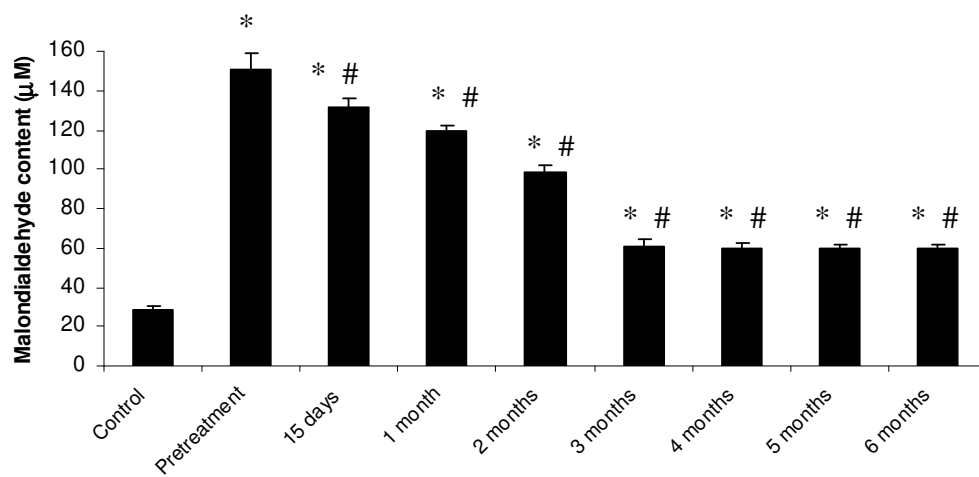


Figure 2.

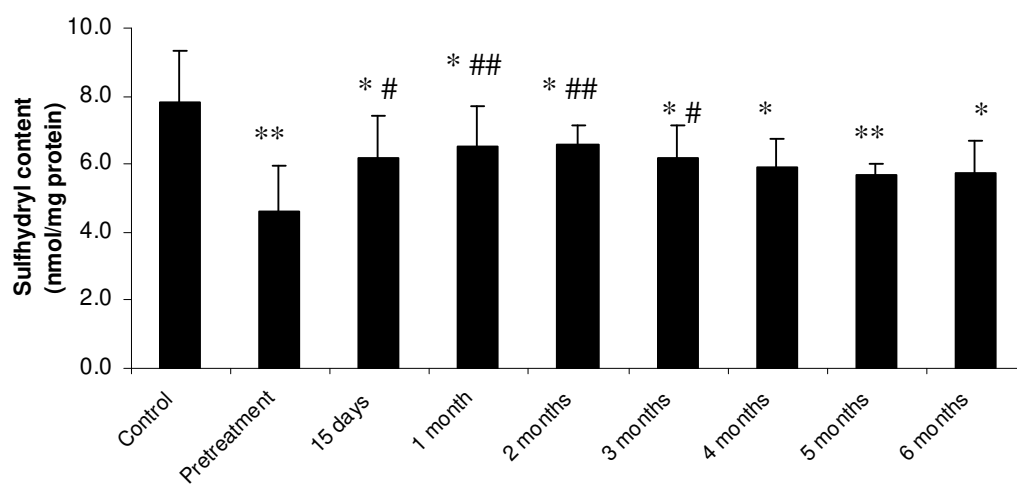


Figure 3

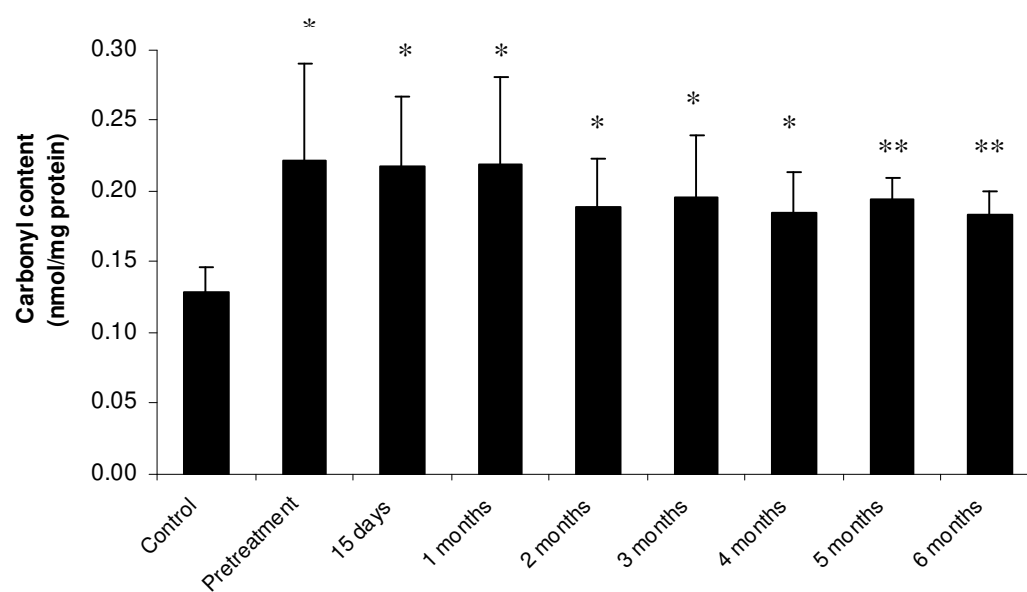


Figure 4.

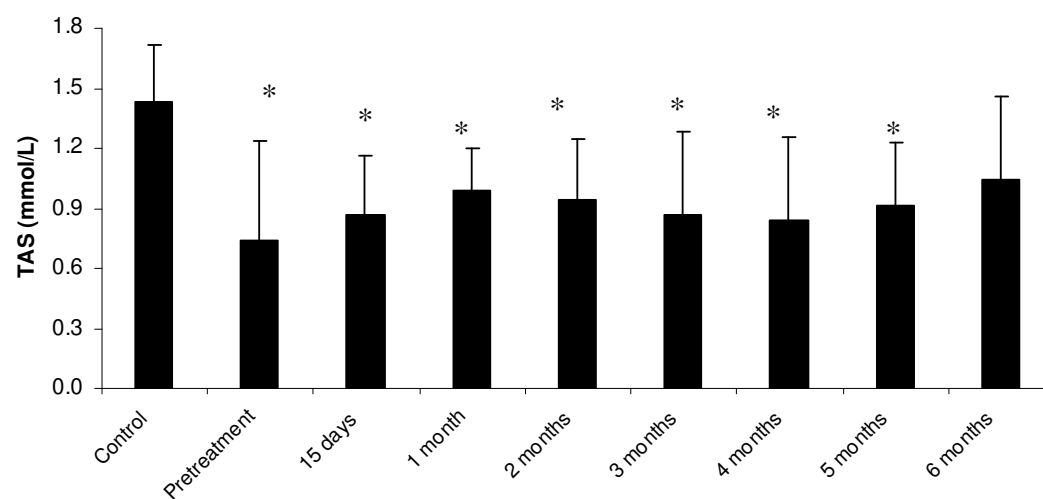


Figure 5.

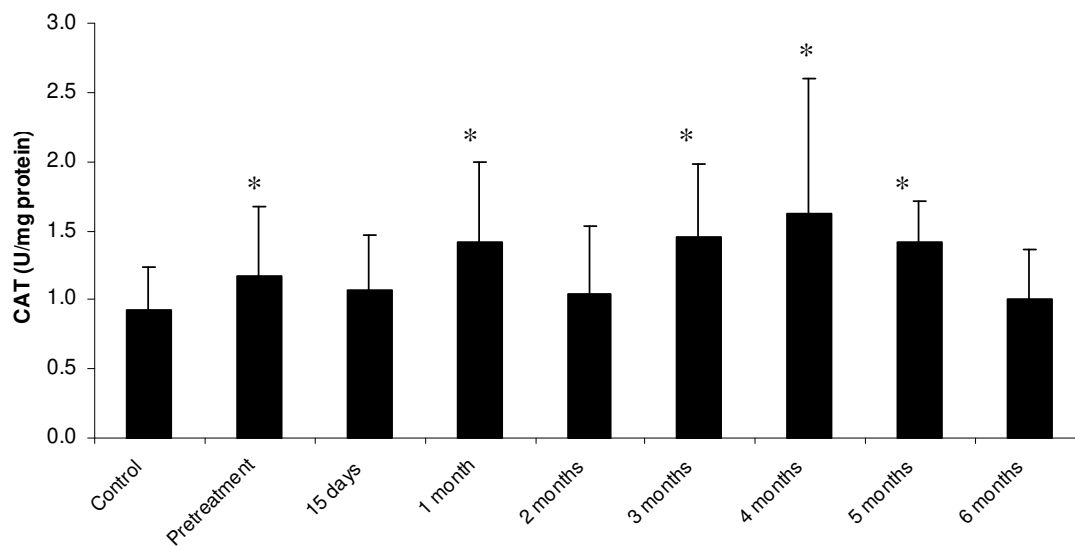
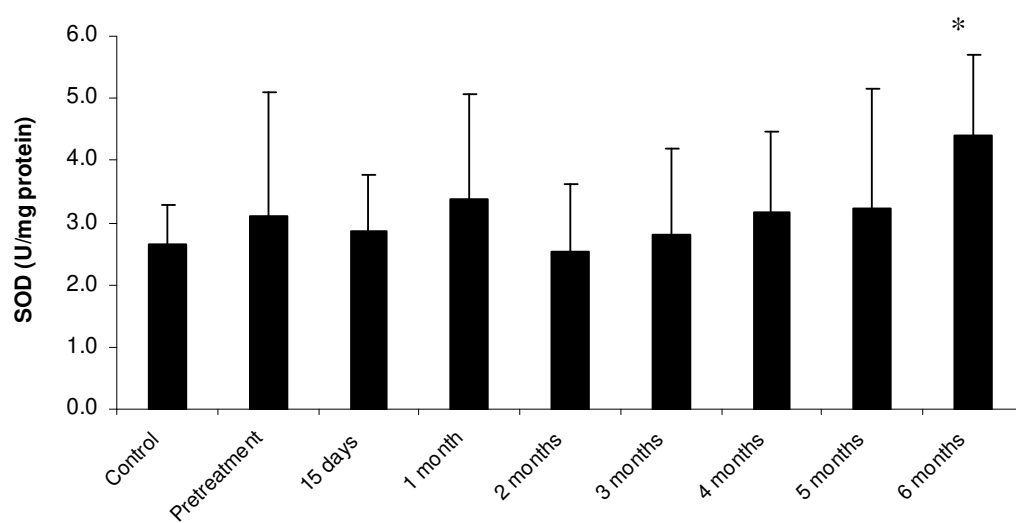


Figure 6.



III.2 Capítulo II – artigo 02

Evidence of the DNA damage in leukocytes from Mucopolysaccharidosis type II patients in pretreatment and the protective effect of the enzyme replacement therapy

L. Filippon, C.A.Y. Wayhs, D.M. Atik, V. Manfredini, S. Herber, C.G. Carvalho, I.V.D. Schwartz, R. Giugliani, C.R. Vargas

Periódico: Mutation Research

Status: Aceito em 11.02.2011

**Evidence of the DNA damage in leukocytes from Mucopolysaccharidosis type II patients
in pretreatment and the protective effect of the enzyme replacement therapy**

Letícia Filippin^{a,b}; Carlos A. Y. Wayhs^b; Diana M. Atik^b; Vanusa Manfredini^{b,c}; Silvani Herber^b; Clarissa Gutiérrez Carvalho^b; Ida V. D. Schwartz^b; Roberto Giugliani^b; Carmen R. Vargas^{a,b,*}.

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Ramiro Barcelos 2700, Porto Alegre, RS, 90035-000, Brazil

^b Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, RS, 90035-903, Brazil

^c Laboratório de Hematologia e Citologia Clínica, Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), BR 472, Km 585, Uruguaiana, RS, 97500-970, Brazil

*** Corresponding author:**

Serviço de Genética Médica, HCPA, Rua Ramiro Barcelos, 2350

CEP 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil

Phone: +55 51 33598011

Fax: +55 51 33598010

E-mail address: crvargas@hcpa.ufrgs.br (C.R. Vargas)

Abstract

Mucopolysaccharidosis type II (MPS II) is an X-linked recessive disease caused by deficiency of the lysosomal enzyme iduronate-2-sulfatase, leading to progressive accumulation of glycosaminoglycans in nearly all cell types, tissues and organs. Enzyme replacement therapy reduces the storage of these substances in the lysosomes. Oxidative stress is related to the pathophysiology of many disorders, including inborn errors of metabolism. Oxidative damage to protein and lipid has been described in MPS types I and III. The aim of this study was to analyze DNA damage, as determined by the alkaline comet assay using silver staining, in peripheral leukocytes from MPS II patients before treatment and during the first six months of enzyme replacement therapy. We also correlated DNA damage with lipid and protein oxidative damages, analyzed by plasma malondialdehyde levels and carbonyl group content, respectively. We found a significant increase in lipid and protein damage in MPS II patients before treatment when compared to controls. Also, our results showed greater DNA damage in terms of damage index (DI) in pretreatment MPS II patients ($DI = 18.0 \pm 2.4$) when compared to controls ($DI = 66.0 \pm 2.0$). Enzyme replacement therapy led to a significant decrease in levels of malondialdehyde and DNA damage when compared to pretreatment, but did not reach control values. Significant positive correlations between DNA damage and malondialdehyde levels, as well as carbonyl group content, were observed. Our findings indicate that MPS II patients are subject to DNA damage and that enzyme replacement therapy is able to protect against this process.

Keywords: mucopolysaccharidosis type II, lysosomal storage disease, oxidative stress, enzyme replacement therapy, DNA damage.

Abbreviations: DI, damage index; ERT, enzyme replacement therapy; GAGs, glycosaminoglycans; LSD, lysosomal storage disease; MPS, mucopolysaccharidosis.

1. Introduction

Mucopolysaccharidosis type II (MPS II or Hunter syndrome), first described by Major Charles Hunter in 1917 [1], is a lysosomal storage disease (LSD) caused by deficiency of the lysosomal enzyme iduronate-2-sulfatase (I2S; EC 3.1.6.13). This enzyme cleaves O-linked sulphate moieties from the glycosaminoglycans (GAGs) dermatan sulphate and heparan sulphate as the first step in their catabolic pathway. The biochemical phenotype of MPS II is characterized by progressive pathological lysosomal storage of GAGs in cells, tissues and organs [2]. The incidence of MPS II is estimated at 1:92,000 to 1:320,000 live births [3-7]. In Brazil, there are no official data on the incidence of MPS. However, it is known that MPS II is among the most frequent types of MPS in this population [8,9]. MPS II is a variable, progressive and multisystemic disorder. Common signs and symptoms on the patients include excess urinary GAGs excretion, facial dysmorphism, organomegaly, joint stiffness and contractures, pulmonary dysfunction, myocardial enlargement and valvular dysfunction, and neurologic involvement. The clinical manifestations generally lead to death in the first or second decade of life, although in the more attenuated form of MPS II, death may occur in early adulthood, and some patients have survived into their fifth and sixth decades. The age of presentation of MPS II is also variable, as well as the appearance of signs and disease complications [8,10]. As MPS II is an X-linked recessive condition, it would not be expected to affect females. Despite this, a few girls have been reported with MPS II [11].

Until recently, there was no effective therapy for MPS II. Treatment was palliative, focusing on management of the multiple clinical symptoms. Haematopoietic stem cell therapy has been attempted in some patients [12], but the long-term results have been unsatisfactory. The recent introduction of enzyme replacement therapy (ERT) with recombinant human enzyme (idursulfase), however, has raised the possibility that the burden of GAGs storage can be reduced and that the progressive tissue and organ damage associated with MPS II can be

slowed or even prevented. Patients undergoing ERT also showed improvements in 6-minute-walk time, functional outcomes and measures of pulmonary function, as well as reduction of liver and spleen volumes [13-17].

Oxidative stress may play an important role in the pathophysiology of some inborn errors of metabolism, since accumulation of metabolites may lead to excessive production of free radicals, which can react with lipids, proteins, DNA, and RNA [18–20]. In different types of MPS, studies in animal models and humans have reported changes in markers of oxidative stress, demonstrating lipid peroxidation and protein oxidation, as well as alterations in erythrocyte antioxidant enzymes [21,22], suggesting a possible involvement of reactive oxygen species in these disorders.

Intralysosomal GAGs accumulation, directly or indirectly, may cause oxidative imbalance. Simonaro *et al.* verified that synovial fibroblasts and fluid of MPS type VI and VII animal model have elevated expression of numerous inflammatory molecules and cytokines, secondary to GAGs accumulation [23]. Another studies have also shown the involvement of inflammatory mediators in the pathophysiology of LSD, such as Gaucher disease [24], Fabry disease [25], gangliosidoses [26,27] as well as MPS [28]. Moreover, much evidence points to the involvement, in the neurological pathology of LSD, as well as for other neurodegenerative diseases, of an inflammatory response that includes microglia activation [26,29]. Pathological activation of microglia might trigger the release of cytokines and chemokines and the development of the inflammatory process, as well as secretion of neurotoxic substances, such as reactive oxygen and nitrogen species. Villani *et al.* have reported involvement of inflammation and oxidative stress in neurodegeneration in murine models of MPS IIIB [30]. These data indicate some relation of inflammatory process with abnormal storage of GAGs in lysosomes, and a possible association with oxidative stress should be further analyzed. In the present work, we investigated the role of oxidative stress in the pathophysiology of MPS II by

analyzing DNA damage, using the comet assay, in patients with Hunter syndrome prior to treatment and during the first six months of ERT, and tested correlations with lipid and protein damage.

2. Materials and methods

2.1. Patients and controls

Twelve MPS II male patients, with ages varying between 1 and 7 years, were included in the study. The main clinical features presented by patients at diagnosis were skeletal deformities, joint contractures, short stature, hepatosplenomegaly, coarse facial features and developmental delay. MPS II diagnosis was confirmed by measurement of leukocytes iduronate-2-sulfatase activity and by urinary GAGs quantification [31,32]. Diagnosis and ERT treatment followed the protocol of the Medical Genetic Service of the Clinical Hospital of Porto Alegre, RS, Brazil. The control group consisted of healthy male subjects (n= 6 to 13) with similar ages to the patients, whose samples were obtained at the Laboratory of Clinical Analysis of Pharmacy Faculty of Federal University of Rio Grande do Sul.

The study was approved by the Ethics Committee of the Clinical Hospital of Porto Alegre. Parents of all patients and controls gave informed consent.

2.2. Blood Samples

Blood samples were obtained from patients and controls under sterile conditions in vials containing EDTA anticoagulant. Venous blood was collected from patients in the pretreatment (before the beginning of ERT) and before each session of ERT in the following periods of treatment: 15-day, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 months. Therapy with idursulfase (Elaprase[®] - Shire Human Genetic Therapies Inc., Cambridge, MA, USA), 0.5 mg/kg, was carried out weekly by intravenous infusion during about 3 h. An aliquot of whole blood was separated

and stored at 4 °C until analysis. The remaining whole blood was centrifuged at 1,000 x *g* and plasma was removed by aspiration and frozen at -80 °C until biochemical determinations.

2.3 Malondialdehyde (MDA) determination

MDA was measured by high performance liquid phase chromatography (HPLC) following the method described by Esterbauer and Cheeseman [33], with slight modifications. Briefly, plasma (100 µL) was mixed with 1.4 mL distilled water and 600 µL trichloroacetic acid, 28%. After centrifugation, the supernatant was removed and MDA was separated by HPLC using an amino-phase column with mobile phase acetonitrile, 30 mM Tris buffer, pH 7.4 (1:9, v/v). The flow rate was 0.5 mL/min and the eluate was monitored at 267 nm, the absorption maximum of the enolate anion form of free MDA. The system was calibrated with a standard solution of MDA, which was used for quantification. Results were expressed as µM MDA.

2.4 Determination of protein carbonyl content

Plasma carbonyl content was measured according to the method described by Levine *et al.* [34]. Quantification was performed using a spectrophotometer at 370 nm. The carbonyl content was calculated from the extinction coefficient of the hydrazone ($21,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Carbonyl content was expressed as nmol carbonyl/mg protein.

2.5. Single cell gel electrophoresis (comet assay)

The alkaline comet assay followed the method described by Singh *et al.* [35] and was performed in accordance with general guidelines for the assay [36,37]. Isolated leukocytes from MPS II patients and controls were suspended in agarose and spread onto a glass microscope slide pre-coated with agarose. Agarose was allowed to set at 4 °C for 5 min.

Slides were incubated in ice-cold lysis solution to remove cell proteins, leaving DNA as “nucleoids”. After the lysis procedure, the slides were placed on a horizontal electrophoresis unit and covered with fresh buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH > 13) at 4 °C for 20 min, to allow DNA unwinding and the expression of alkali labile sites. Electrophoresis was performed for 20 min (25V; 300mA; 0.9V/cm). Slides were then neutralized, washed in double-distilled water, and stained according to a silver-staining protocol [38]. After drying overnight at room temperature, the gels were analyzed using an optical microscope. One hundred cells (50 cells from each of the two replicate slides) were selected and analyzed. Cells were visually scored according to tail length and received scores from 0 (no migration) to 4 (maximal migration) according to shape of the comet. Therefore, the damage index (DI) for cells ranged from 0 (all cells with no migration) to 400 (all cells with maximal migration). Samples from patients (before treatment) and controls were collected and analyzed concurrently and in random order. The slides were analyzed under blind conditions by at least two different individuals.

2.6. Statistical Analysis

All data were presented as mean $\pm$ standard deviation. Student's *t*-tests for unpaired samples were used to compare means of controls and pretreatment or controls and different treatment periods. In order to evaluate differences between pretreatment and different treatment periods, the Generalized Estimating Equations method was used, followed by the Bonferroni test. Correlations between variables were calculated using the Pearson correlation coefficient. *p* <0.05 was considered significant. All statistical analyses were performed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS), version 18.0.

3. Results

Table 1 shows plasma MDA levels and protein carbonyl content in controls and MPS II patients prior to treatment and after different ERT treatment periods. MDA, an end product of membrane fatty acid peroxidation, and protein carbonyl content, which is formed by oxidation of the side chains of lysine, proline, arginine and threonine residues, were significantly increased in patients with MPS II before the ERT ($p<0.001$ and $p<0.05$, respectively), indicating lipid and protein oxidative damage. A significant reduction of MDA levels was observed during ERT when compared to the pretreatment group ($p<0.001$), but the values did not reach those of the controls.

DI values and the numbers of cells in each damage class for the patients studied and the controls are presented in Table 2. The number of damaged cells decreased with treatment for damage classes 1, 2 and 3, and cells with DNA damage class 3 were no longer seen after the third month of ERT. DI was significantly increased in the pretreatment group ($DI = 66.0 \pm 2.0$) when compared to the control group ($DI = 18.0 \pm 2.4$) ($p<0.001$). DNA damage remained similar to the pretreatment value until the second month of treatment, and was then significantly reduced until the sixth month of ERT, when compared to pretreatment ($p<0.001$), although not returning to control values. Additionally, significant positive correlations were observed between DNA damage and MDA ($r = 0.744$; $p<0.001$), and between DNA damage and carbonyl content ($r = 0.326$; $p<0.05$); Figure 1.

4. Discussion

Oxidative stress, an imbalance between total antioxidant defenses and reactive species formed in the tissues [39], has been related to the pathogenesis of neurodegenerative, chronic-inflammatory, vascular, and neoplastic diseases [40-42]. Oxidative stress is also commonly observed in some inborn errors of intermediary metabolism [43-47]. Although the cause of

increased oxidative stress in these diseases is not completely understood, it may be due to accumulation of toxic metabolites that lead to excessive production of free radicals. Lysosomes are very susceptible to the oxidative stress [48]. These organelles have a large pool of iron that can catalyze Fenton reactions in the presence of H_2O_2 , resulting in rupture of lysosomal membranes and subsequent efflux of iron into the cytoplasm. From there, iron may relocate to the nucleus and induce DNA damage under oxidative stress [49].

Oxidative stress can cause DNA lesions ranging from base and sugar damage to strand breaks and DNA–protein cross-links [39,50]. We evaluated DNA damage in peripheral leukocytes of MPS II patients with the alkaline comet assay, which measures DNA strand breaks in single cells [51]. Given that lipids and proteins are easily attacked by reactive oxygen species [18-20], we also analyzed the levels of MDA, a product of lipid peroxidation, and carbonyl groups, products of protein oxidation, in plasma of MPS II patients.

MPS II patients in pretreatment had increased levels of lipid peroxidation, carbonyl group content, and DNA damage, when compared to the control group. The carbonylation of proteins is an irreversible oxidative damage, often leading to loss of protein function, which is considered a widespread indicator of severe oxidative damage and disease-derived protein dysfunction [52]. Lipid peroxidation alters fluidity, integrity and permeability of membranes [40]. The hydroxyl radical, the most harmful reactive oxygen species, can induce a variety of lesions in DNA, including single-strand breaks, double-strand breaks, alkali-labile sites, oxidized purine and pyrimidine bases, and DNA–protein cross-links. DNA lesions may hamper processes such as transcription and replication, resulting in cell cycle arrest, cell death, or mutagenesis. Consequently, oxidative damage to nucleic acid has been associated with a number of pathologies including genetic, neoplastic, neurodegenerative, cardiovascular, and autoimmune diseases, and aging [50,53-55].

In the alkaline version of the comet assay (single cell gel electrophoresis) developed by Singh *et al.* [35], increased DNA migration can be associated with incomplete excision repair sites [36,56]. We observed significantly greater levels of DNA migration, and thus DNA damage, in leukocytes from pretreatment MPS II patients, compared to the control group. ERT led to a significant decrease of DNA damage after the third month of treatment. Although the levels of carbonyl content did not change with treatment, there was a significant decrease in lipid peroxidation subsequent to the first fifteen days of treatment. Weekly administration of the recombinant human enzyme to MPS II patients leads to reduction of GAG accumulation in the lysosomes, causing a significant decrease in urinary GAGs excretion [14-17]. Cellular damage presented by MPS II patients is probably related to the abnormal storage of GAGs in the lysosomes and ERT probably protects against oxidative damage in MPS II patients.

Comparing the distribution of DNA damage classes, we observed that in pretreatment and until the second month of treatment, the damaged cells were distributed in classes 1, 2 and 3. On the other hand, after two months, DNA damage was restricted to classes 1 and 2, reflecting a reduction in highly damaged cells. These findings indicate that ERT has a protective effect against DNA damage. We observed a positive correlation between DNA damage and lipid peroxidation, as well as between DNA damage and carbonyl content. DNA damage in MPS II patients may occur due to excessive production of free radicals, generating oxidative damage in cells [39]. DNA oxidative damage has been described in patients affected by other inborn errors of metabolism, such as, for example, phenylketonuria, homocystinuria, propionic acidemia, and methylmalonic acidemia [20,57,58]. However, there has been little research on LSD, and specifically on MPS, in this context. Previous studies showed that increased formation of cerebellum carbonyl groups in animal models of MPS I [21] and increased values of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), a parameter of lipid

peroxidation, in MPS I patients [22]. Increased oxidation of proteins, lipids and DNA was detected in the cerebellum of young mice with MPS type IIIB [30] and deposition of end-products of lipoperoxidation and DNA oxidation was observed in MPS II human brain tissue [59].

In conclusion, the present work shows that pretreatment MPS II patients have marked DNA damage in leukocytes, as well as protein and lipid damage, possibly secondary to accumulation of GAGs in the lysosomes. ERT can protect against DNA injury, which is probably induced by these substances. To our knowledge, our report is the first to show evidence that ERT has a protective action upon DNA damage in MPS II patients. Our results should be interpreted with caution, however, since the comet assay is unable to discriminate the etiology of DNA damage. Future studies evaluating the effects of antioxidants on oxidative biomarkers in MPS II patients may help to address this question.

Acknowledgements

This work was supported in part by grants from CAPES, CNPq and FIPE/HCPA-Brazil.

Conflict of interest disclosure

The authors declare that there is no conflict of interest associated with this manuscript.

References

- [1] C. Hunter, A rare disease in two brothers, *Proc. R. Soc. Med.* 10 (1917) 104–106.
- [2] E.F. Neufeld, J. Muenzer, The mucopolysaccharidoses, in: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed., McGraw-Hill, New York, 2001, pp. 3421–3452.
- [3] J. Nelson, J. Crowhurst, B. Carey, L. Greed, Incidence of the mucopolysaccharidoses in Western Australia, *Am. J. Med. Genet. Part A.* 123 (2003) 310–313.
- [4] F. Baehner, C. Schmiedeskamp, F. Krummenauer, E. Miebach, M. Bajbouj, C. Whybra, A. Kohlschütter, C. Kampmann, M. Beck, Cumulative incidence rates of the mucopolysaccharidoses in Germany, *J. Inherit. Metab. Dis.* 28 (2005) 1011–1017.
- [5] H. Poupětová, J. Ledvinová, L. Berná, L. Dvořáková, V. Kožich, M. Elleder, The birth prevalence of lysosomal storage disorders in the Czech Republic: comparison with data in different populations, *J. Inherit. Metab. Dis.* 33 (2010) 387–396.
- [6] P.J. Meikle, J.J. Hopwood, A.E. Claque, W.F. Carey, Prevalence of lysosomal storage disorders, *JAMA.* 281 (1999) 249–254.
- [7] R. Pinto, C. Caseiro, M. Lemos, L. Lopes, A. Fontes, H. Ribeiro, E. Pinto, E. Silva, S. Rocha, A. Marcao, I. Ribeiro, L. Lacerda, G. Ribeiro, O. Amaral, M.C. Sa Miranda, Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal, *Eur. J. Hum. Genet.* 12 (2004) 87–92.
- [8] T. Vieira, I. Schwartz, V. Muñoz, L. Pinto, C. Steiner, M. Ribeiro, R. Boy, V. Ferraz, A. de Paula, C. Kim, A. Acosta, R. Giugliani, Mucopolysaccharidoses in Brazil: what happens from birth to biochemical diagnosis? *Am. J. Med. Genet. Part A.* 146 (2008) 1741–1747.
- [9] J.C. Coelho, M. Wajner, M.G. Burin, C.R. Vargas, R. Giugliani, Selective screening of 10,000 high-risk Brazilian patients for the detection of inborn errors of metabolism, *Eur. J. Pediatr.* 156 (1997) 650–654.
- [10] R. Martin, M. Beck, C. Eng, R. Giugliani, P. Harmatz, V. Munoz, J. Muenzer, Recognition and diagnosis of mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome), *Pediatrics* 121 (2008) 377–386.
- [11] K. Tuschl, A. Gal, E. Paschke, S. Kircher, O.A. Bodamer, Mucopolysaccharidosis type II in females: case report and review of literature, *Pediatr. Neurol.* 32 (2005) 270–272.
- [12] A. Vellodi, E. Young, A. Cooper, V. Lidchi, B. Winchester, J.E. Wraith, Long-term follow-up following bone marrow transplantation for Hunter disease, *J. Inherit. Metab. Dis.* 22 (1999) 638–648.
- [13] J. E. Wraith, M. Scarpa, M. Beck, O.A. Bodamer, L. De Meirleir, N. Guffon, A.M. Lund, G. Malm, A.T. Van der Ploeg, J. Zeman, Mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): a clinical review and recommendations for treatment in the era of enzyme replacement therapy, *Eur. J. Pediatr.* 167 (2008) 267–277.

- [14] J. Muenzer, M. Gucsavas-Calikoglu, S.E. McCandless, T.J. Schuetz, A. Kimura, A phase I/II clinical trial of enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome), *Mol. Genet. Metab.* 90 (2007) 329–337.
- [15] J. Muenzer, J.E. Wraith, M. Beck, R. Giugliani, P. Harmatz, C.M. Eng, A. Vellodi, R. Martin, U. Ramaswami, M. Gucsavas-Calikoglu, S. Vijayaraghavan, S. Wendt, A.C. Puga, B. Ulbrich, M. Shinawi, M. Cleary, D. Piper, A.M. Conway, A. Kimura, A phase II/III clinical study of enzyme replacement therapy with idursulfase in mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome), *Genet. Med.* 8 (2006) 465–473.
- [16] T. Okuyama, A. Tanaka, Y. Suzuki, H. Ida, T. Tanaka, G.F. Cox, Y. Eto, T. Orii, Japan Elaprase[®] Treatment (JET) study: idursulfase enzyme replacement therapy in adult patients with attenuated Hunter syndrome (mucopolysaccharidosis II, MPS II), *Mol. Gen. Metab.* 99 (2010) 18–25.
- [17] K.K. White, S. Hale, M.J. Goldberg, Musculoskeletal health in Hunter disease (MPS II): ERT improves functional outcomes, *J. Pediatr. Rehabil. Med.* 3 (2010) 101–107.
- [18] A. Sitta, A.G. Barschak, M. Deon, A.T. Barden, G.B. Biancini, P.R. Vargas, C.F. de Souza, C. Netto, M. Wajner, C.R. Vargas, Effect of short- and long-term exposition to high phenylalanine blood levels on oxidative damage in phenylketonuric patients, *Int. J. Dev. Neurosci.* 27 (2009) 243–247.
- [19] A.G. Barschak, A. Sitta, M. Deon, M.H. de Oliveira, A. Haeser, C.S. Dutra-Filho, M. Wajner, C.R. Vargas, Evidence that oxidative stress is increased in plasma from patients with maple syrup urine disease, *Metab. Brain Dis.* 21 (2006) 279–286.
- [20] G.S. Ribas, V. Manfredini, M.G. de Marco, R.B. Vieira, C.Y. Wayhs, C.S. Vanzin, G.B. Biancini, M. Wajner, C.R. Vargas, Prevention by L-carnitine of DNA damage induced by propionic and L-methylmalonic acids in human peripheral leukocytes in vitro, *Mutat. Res.* 702 (2010) 123–128.
- [21] G.K. Reolon, A. Reinke, M.R. Oliveira, L.M. Braga, M. Camassola, M.E. Andrades, J.C.F. Moreira, N.B. Nardi, R. Roesler, F. Dal-Pizzol, Alterations in oxidative markers in the cerebellum and peripheral organs in MPS I mice, *Cell. Mol. Neurobiol.* 29 (2009) 443–448.
- [22] V.G. Pereira, A.M. Martins, C. Micheletti, V. D'Almeida, Mutational and oxidative stress analysis in patients with mucopolysaccharidosis type I undergoing enzyme replacement therapy, *Clin. Chim. Acta.* 387 (2007) 75–79.
- [23] C.M. Simonaro, M. D'Angelo, X. He, E. Eliyahu, N. Shtraizent, M.E. Haskins, E.H. Schuchman, Molecular pathogenesis of genetic and inherited diseases mechanism of glycosaminoglycan-mediated bone and joint disease: implications for the mucopolysaccharidoses and other connective tissue diseases, *Am. J. Pathol.* 172 (2008) 112–122.
- [24] G. Altarescu, A. Zimran, H. Michelakakis, D. Elstein, TNF-alpha levels and TNF-alpha gene polymorphism in type I Gaucher disease, *Cytokine* 31 (2005) 149–152.

- [25] G. Altarescu, G. Chicco, C. Whybra, S. Delgado-Sanchez, N. Sharon, M. Beck, D. Elstein, Correlation between interleukin-6 promoter and C-reactive protein (CRP) polymorphisms and CRP levels with the Mainz Severity Score Index for Fabry disease, *J. Inherit. Metab. Dis.* 31 (2008) 117–123.
- [26] M. Jeyakumar, R. Thomas, E. Elliot-Smith, D.A. Smith, A.C. van der Spoel, A. d'Azzo, V.H. Perry, T.D. Butters, R.A. Dwek, F.M. Platt, Central nervous system inflammation is a hallmark of pathogenesis in mouse models of GM1 and GM2 gangliosidosis, *Brain* 126 (2003) 974–987.
- [27] M. Jeyakumar, D.A. Smith, I.M. Williams, M.C. Borja, D.C. Neville, T.D. Butters, R.A. Dwek, F.M. Platt, NSAIDs increase survival in the Sandhoff disease mouse: synergy with N-butyldeoxynojirimycin, *Ann. Neurol.* 56 (2004) 642–649.
- [28] G.R.D. Villani, N. Gargiulo, R. Faraonio, S. Castaldo, E.G. Reyero, P. Di Natale, Cytokines, neurotrophins, and oxidative stress in brain disease from mucopolysaccharidosis IIIB, *J. Neurosci. Res.* 85 (2007) 612–622.
- [29] K. Ohmi, D.S. Greenberg, K.S. Rajavel, S. Ryazantsev, H.H. Li, E.F. Neufeld, Activated microglia in cortex of mouse models of mucopolysaccharidoses I and IIIB, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (2003) 1902–1907.
- [30] G.R.D. Villani, C. Di Domenico, A. Musella, F. Cecere, D. Di Napoli, P. Di Natale, Mucopolysaccharidosis IIIB: oxidative damage and cytotoxic cell involvement in the neuronal pathogenesis, *Brain Res.* 1279 (2009) 99–108.
- [31] J.G.N. de Jong, R.A. Wevers, R. Liebrand-van Sambeek, Measuring urinary glycosaminoglycans in the presence of protein: an improved screening procedure for mucopolysaccharidoses based on dimethylmethylene blue, *Clin. Chem.* 38 (1992) 803–807.
- [32] Y.V. Voznyi, J.I.M. Keulemans, O.P. van Diggelen, A fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of MPS II (Hunter disease), *J. Inherit. Metab. Dis.* 24 (2001) 675–680.
- [33] H. Esterbauer, K.H. Cheeseman, Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal, *Methods Enzymol.* 186 (1990) 407–421.
- [34] R.L. Levine, D. Garland, C.N. Oliver, A. Amici, L. Climent, A.G. Lenz, B.W. Ahn, S. Shalithiel, E.R. Stadman, Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins, *Methods Enzymol.* 186 (1990) 464–478.
- [35] N. Singh, M. McCoy, R. Tice, E. Schneider, A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individuals cells, *Exp. Cell Res.* 175 (1988) 184–191.
- [36] R.R. Tice, D. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J.C. Ryu, Y.F. Sasaki, Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, *Environ. Mol. Mutagen.* 35 (2000) 206–221.
- [37] A. Hartmann, E. Agurell, C. Beevers, S. Brendler-Schwaab, B. Burlinson, P. Clay, A. Collins, G. Smith, G. Speit, V. Thybaud, R.R. Tice, Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay, *Mutagenesis* 18 (2003) 45–51.

- [38] S. Nadin, L. Vargas-Roig, D. Ciocca, A silver staining method for single-cell gel assay, *J. Histochem. Cytochem.* 49 (2001) 1183–1186.
- [39] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, Oxidative stress: adaptation, damage, repair and death, in: B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge (Eds.), *Free radicals in biology and medicine*, third ed., Oxford University Press, New York, 1999, pp. 246–350.
- [40] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, *Free radicals in biology and medicine*, fourth ed., Oxford University Press, New York, 2007.
- [41] W. Dröge, Free radicals in the physiological control of cell function, *Physiol. Rev.* 82 (2002) 47–95.
- [42] A.Z. Reznick, L. Packer, Free radicals and antioxidants in muscular neurological diseases and disorders, in: G. Poli, E. Albano, M.U. Dianzani (Eds.), *Free Radicals: From Basic Science to Medicine*, Birkhäuser Verlag, Basel, 1993, pp. 425–437.
- [43] A. Sitta, A.G. Barschak, M. Deon, J.F. de Mari, A.T. Barden, C.S. Vanzin, G.B. Biancini, I.V.D. Schwartz, M. Wajner, C.R. Vargas, L-Carnitine blood levels and oxidative stress in treated phenylketonuric patients, *Cell. Mol. Neurobiol.* 29 (2009) 211–218.
- [44] M. Deon, A. Sitta, A.G. Barschak, D.M. Coelho, M. Pigatto, G.O. Schmitt, L.B. Jardim, R. Giugliani, M. Wajner, C.R. Vargas, Induction of lipid peroxidation and decrease of antioxidant defenses in symptomatic and asymptomatic patients with X-linked adrenoleukodystrophy, *Int. J. Devl. Neuroscience* 25 (2007) 441–444.
- [45] M. Wajner, A. Latini, A.T. Wyse, C.S. Dutra-Filho, The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidurias: insights from animal studies, *J. Inherit. Metab. Dis.* 27 (2004) 427–448.
- [46] A.G. Barschak, A. Sitta, M. Deon, A.T. Barden, C.S. Dutra-Filho, M. Wajner, C.R. Vargas, Oxidative stress in plasma from maple syrup urine disease patients during treatment, *Metab. Brain Dis.* 23 (2008) 71–80.
- [47] A. Latini, R. Borba Rosa, K. Scussiato, S. Llesuy, A. Belló-Klein, M. Wajner, 3-Hydroxyglutaric acid induces oxidative stress and decreases the antioxidant defences in cerebral cortex of young rats, *Brain Res.* 956 (2002) 367–373.
- [48] A. Terman, T. Kurz, B. Gustafsson, U.T. Brunk, Lysosomal labilization, *IUBMB Life* 58 (2006) 531–539.
- [49] T. Kurz, A. Leake, T. von Zglinicki, U.T. Brunk, Lysosomal redox-active iron is important for oxidative stress-induced DNA damage, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1019 (2004) 285–288.
- [50] M.D’Errico, E. Parlanti, E. Dogliotti, Mechanism of oxidative DNA damage repair and relevance to human pathology, *Mutat. Res.* 659 (2008) 4–14.

- [51] W. Liao, M.A. McNutt, W.G. Zhu, The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells, *Methods* 48 (2009) 46–53.
- [52] I. Dalle-Donne, R. Rossi, R. Colombo, D. Giustarini, A. Milzani, Biomarkers of oxidative damage in human disease, *Clin. Chem.* 52 (2006) 601–623.
- [53] B. Halliwell, Role of free radicals in the neurodegenerative diseases, *Drugs Aging* 18 (2001) 685–716.
- [54] M.S. Cooke, R. Olinski, M.D. Evans, Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance? *Clin. Chim. Acta* 365 (2006) 30–49.
- [55] F. Altieri, C. Grillo, M. Maceroni, S. Chichiarelli, DNA damage and repair: from molecular mechanisms to health implications, *Antioxid. Redox Signal.* 10 (2008) 891–937.
- [56] G. Speit, A. Hartmann, The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay), *Mutagenesis* 10 (1995) 555–559.
- [57] A. Sitta, V. Manfredini, L. Biasi, R. Treméa, I.V.D. Schwartz, M. Wajner, C.R. Vargas, Evidence that DNA damage is associated to phenylalanine blood levels in leukocytes from phenylketonuric patients, *Mutat. Res.* 679 (2009) 13–16.
- [58] C. Matté, V. Mackedanz, F.M. Stefanello, E.B.S. Scherer, A.C. Andreazza, C. Zanotto, A.M. Moro, S.C. Garcia, C.A. Gonçalves, B. Erdtmann, M. Salvador, A.T.S. Wyse, Chronic hyperhomocysteinemia alters antioxidant defenses and increases DNA damage in brain and blood of rats: Protective effect of folic acid, *Neurochem. Int.* 54 (2009) 7–13.
- [59] K. Hamano, M. Hayashi, K. Shioda, R. Fukatsu, S. Mizutani, Mechanisms of neurodegeneration in mucopolysaccharidoses II and IIIB: analysis of human brain tissue, *Acta Neuropathol.* 115 (2008) 547–559.

Figure legend

Figure 1. Correlations between oxidative stress parameters and DNA damage. a: Correlation between DNA damage and malondialdehyde levels; b: Correlation between DNA damage and protein carbonyl content.

Table 1

Malondialdehyde (MDA) levels and protein carbonyl content in the controls and in MPS II patients before the beginning of enzyme replacement therapy (pretreatment) and after 15-day, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 months of treatment.

Groups	MDA (μM)	Protein carbonyl content (nmol/mg protein)
Control	28.42 ± 2.36	0.128 ± 0.018
Pretreatment	$151.12 \pm 7.54^{**}$	$0.221 \pm 0.069^*$
15 days	$131.73 \pm 4.37^{**\#}$	$0.217 \pm 0.049^*$
1 month	$119.95 \pm 2.51^{**\#}$	$0.219 \pm 0.062^*$
2 months	$98.80 \pm 3.56^{**\#}$	$0.189 \pm 0.034^*$
3 months	$60.23 \pm 3.69^{**\#}$	$0.196 \pm 0.043^*$
4 months	$59.78 \pm 2.85^{**\#}$	$0.185 \pm 0.029^*$
5 months	$59.48 \pm 1.86^{**\#}$	$0.195 \pm 0.015^{**}$
6 months	$59.56 \pm 2.44^{**\#}$	$0.184 \pm 0.017^{**}$

Values are expressed as mean $\pm$ standard deviation;

MDA (controls: n = 13; MPS II patients: n = 12);

Protein carbonyl content (controls: n = 6; MPS II patients: n = 12).

* $p < 0.05$, compared to controls (Student's *t*-tests for unpaired samples);

** $p < 0.001$ compared to controls (Student's *t*-tests for unpaired samples);

$p < 0.001$ compared to pretreatment group (Generalized Estimating Equations, followed by Bonferroni test).

Table 2

DI values and number of cells found in each damage class in pretreatment and in different periods of enzyme replacement therapy from MPS II patients and controls.

Groups	DI	Damage class				
		0	1	2	3	4
Controls	18.0 ± 2.4	82	18	0	0	0
Pretreatment	66.0 ± 2.0*	55	26	17	2	0
15 days	67.0 ± 1.1*	54	27	17	2	0
1 month	66.0 ± 2.1*	54	28	16	2	0
2 months	65.0 ± 2.1*	53	30	16	1	0
3 months	60.0 ± 1.9* [#]	55	30	15	0	0
4 months	44.0 ± 5.3* [#]	67	22	11	0	0
5 months	38.0 ± 2.5* [#]	72	18	10	0	0
6 months	37.0 ± 3.4* [#]	73	17	10	0	0

DI: damage index

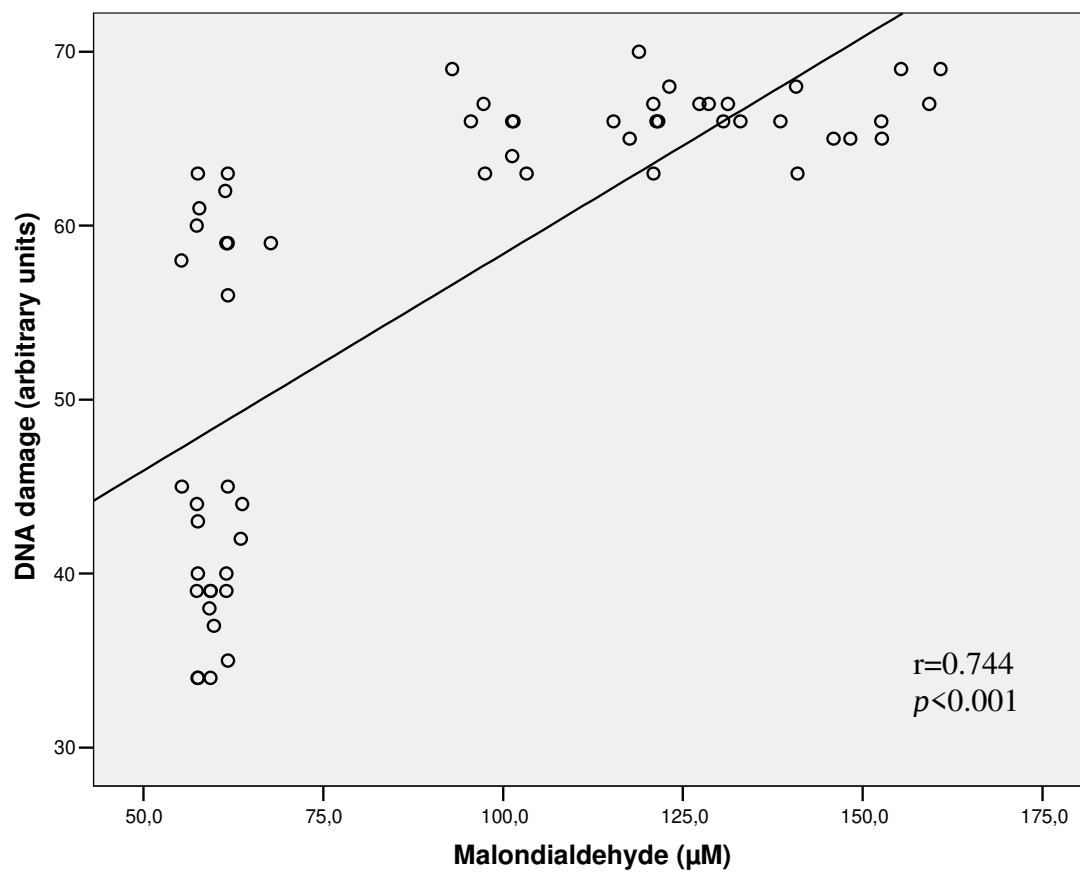
DI values are expressed as mean ± standard deviation (controls: n = 8; MPS II patients: n = 12).

* $p < 0.001$, compared to controls (Student's t -tests for unpaired samples);

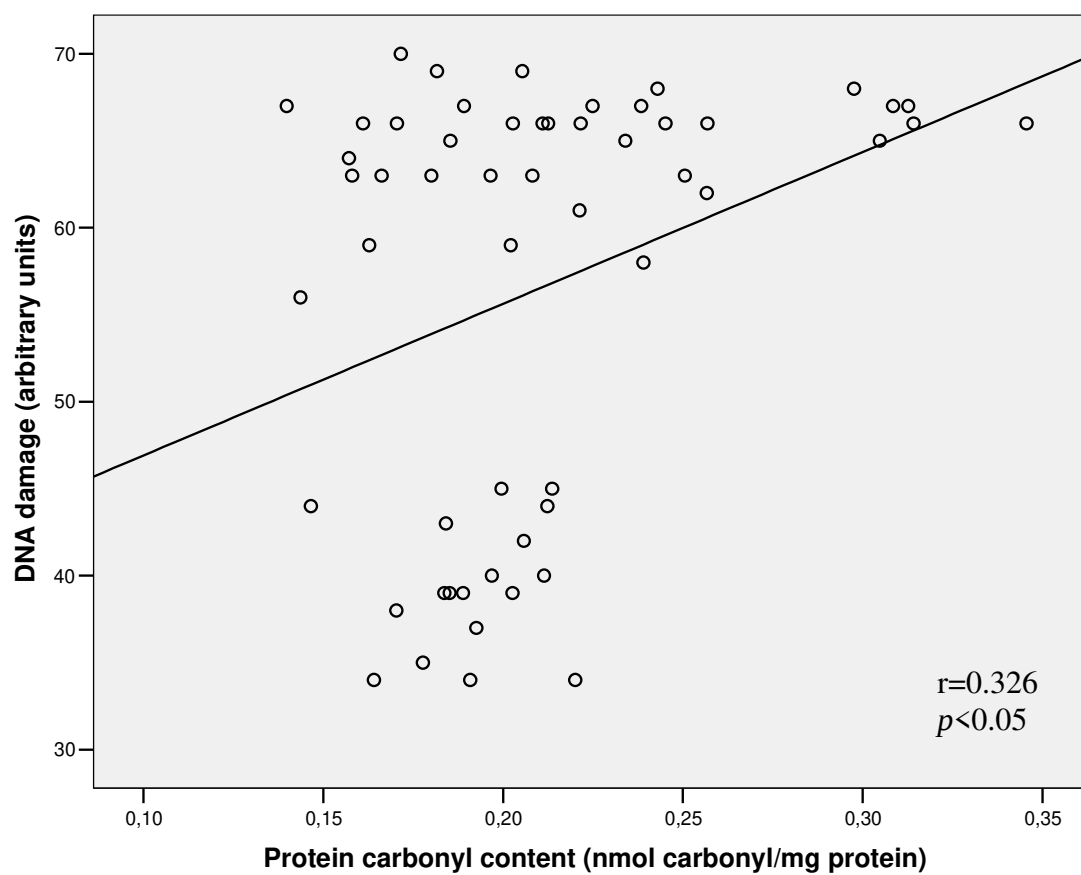
[#] $p < 0.001$, compared to pretreatment group (Generalized Estimating Equations, followed by Bonferroni test).

Figure 1.

a.



b.



IV. DISCUSSÃO

A deficiência enzimática que ocorre em muitos EIM assim como as alterações induzidas pela TRE, podem levar a uma cascata de eventos culminando em efeitos secundários, como a produção e liberação de ERO. De fato, ERO parecem estar envolvidas em um grande número de doenças humanas (Halliwell e Gutteridge, 2007). Em MPS II a deficiência de I2S, que leva ao acúmulo dos GAGs heparan e dermatan sulfato nos lisossomos, parece ter uma influência direta ou indireta sobre o desequilíbrio oxidativo. O mais provável é que o estresse oxidativo seja ativado nas DLDs como um caminho bioquímico secundário e não como um resultado direto do acúmulo do substrato primário (Vitner et al., 2010). Além disso, o estresse oxidativo pode ser de grande importância para entender a fisiopatologia das MPS, tendo em vista o papel central que desempenha em outras doenças neurodegenerativas, como doença de Parkinson, doença de Alzheimer, esclerose múltipla, convulsões e demência (Reznick e Packer, 1993; Halliwell, 2006; Halliwell e Gutteridge, 2007).

As ERO são conhecidas por causarem modificações em membranas celulares ou macromoléculas intracelulares, cujos danos podem ser analisados por métodos quantitativos. A lipoperoxidação, resultante do ataque de radicais livres às membranas lipídicas, leva à modificação das propriedades da membrana, como permeabilidade e fluidez, além de causar danos a proteínas transmembrana, como enzimas e receptores. Esse processo tem como um dos produtos finais o malondialdeído (MDA), que pode ser quantificado por “*High Pressure Liquid Chromatografic*” (HPLC). Esta metodologia consiste num dos melhores parâmetros de análise de dano a lipídios, pois tem uma alta especificidade e sensibilidade na dosagem do MDA plasmático, quando comparado a métodos espectrofotométricos (Halliwell e Gutteridge, 2007). Muitos tipos diferentes de oxidação de proteínas

podem ser induzidos pelos radicais livres, sendo os principais a perda de grupamentos sulfidríla e formação de grupamentos carbonila. O primeiro pode induzir a erros de dobramento, inativação catalítica e perda de funções específicas, como ligação a metais e aminoácidos sulfurados (Starke-Reed e Oliver, 1989). Já a carbonilação em resíduos de lisina, arginina, treonina e prolina é uma alteração oxidativa irreversível, frequentemente levando à perda total ou parcial da função da proteína (Levine et al., 1990). A medida do conteúdo de grupamentos carbonila é o parâmetro mais utilizado como biomarcador de dano oxidativo severo a proteínas, sendo considerado um marcador precoce e de oxidação estável de proteínas (Cakatay, 2005; Pan et al., 2008). Além disso, o dano a proteínas pode gerar novos antígenos fazendo com que haja uma resposta autoimune devido ao reconhecimento de proteínas alteradas como exógenas, o que pode provocar respostas imunológicas e intensificar um processo inflamatório. Ainda, o dano a proteínas pode contribuir para danos secundários a outras biomoléculas, como por exemplo, a inativação de enzimas de reparo do DNA. Para controlar o fluxo de ERO, as células aeróbicas desenvolveram um sistema de defesa antioxidante, que inclui componentes enzimáticos e não-enzimáticos. CAT, SOD e GSH-Px são as principais enzimas que removem e protegem as células dos radicais livres (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Neste trabalho nós verificamos um aumento dos níveis de MDA, aumento do conteúdo de grupamentos carbonila e redução do conteúdo de grupamentos sulfidríla em plasma de pacientes com MPS II no pré-tratamento quando comparado com o grupo controle. Além disso, foi verificada uma redução significativa nos níveis de TAS antes do tratamento quando comparado com os controles, refletindo uma diminuição da quantidade de antioxidantes teciduais não enzimáticos. Esses dados

indicam que pacientes com MPS II apresentam danos oxidativos a proteínas e lipídios, provavelmente devido a um aumento das ERO no organismo, estando a habilidade de modular esses danos diminuída. Também encontramos aumento da atividade da CAT antes do início da TRE, porém a atividade da SOD não se mostrou alterada nesse momento.

O DNA é uma molécula que pode ser facilmente lesada, sendo, portanto, alvo de ataque de radicais livres, podendo gerar mutação e morte celular (Halliwell e Gutteridge, 2007). O dano ao DNA pode ser avaliado através de diferentes técnicas, dentre as quais o ensaio cometa, o qual é um método simples, sensível, rápido e de baixo custo (Liao et al., 2009). Singh et al. (1988) modificaram o método inicialmente descrito por Ostling e Johanson (1984) permitindo avaliar danos ao DNA em células individuais sob condições alcalinas. Após desnaturação do DNA, é possível a verificação de quebras simples e duplas e sítios álcali-lábeis. O dano ao DNA é quantificado neste método analisando-se 100 células (leucócitos) da amostra biológica, as quais recebem um escore que varia de 0 (célula sem dano) à 4 (dano máximo) de acordo com a intensidade da cauda, ou seja, quanto maior a cauda maior dano ao DNA.

Assim, analisamos leucócitos de pacientes com MPS II no intuito de investigar danos a nível de DNA. Verificamos um significativo aumento do índice de dano ao DNA no pré-tratamento quando comparado com o grupo controle.

Estudos anteriores verificaram aumento da oxidação de proteínas, lipídios e DNA no cerebelo de modelos animais de MPS IIIB (Villani et al., 2009). Um estudo em pacientes com MPS I verificou que os níveis das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), outro parâmetro de peroxidação lipídica, estavam aumentados nesses pacientes antes da TRE, enquanto que as enzimas SOD e CAT

apresentavam valores similares aos valores de referência (Pereira et al., 2007). Por outro lado, Reolon e colaboradores (2009) verificaram uma diminuição dos níveis de TBARS e um aumento da carbonilação de proteínas no cerebelo de camundongos com MPS I. Estes autores sugerem que esses resultados se devem às atividades aumentadas de SOD e CAT encontradas no cerebelo destes animais, suficientes para diminuir o dano lipídico, porém não suficientes para diminuir o dano protéico. Outro estudo revelou deposição de 4-hidroxinonenal e de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina, produtos da lipoperoxidação e da oxidação do DNA, respectivamente, em tecido cerebral de pacientes com MPS II (Hamano et al., 2008).

A reposição enzimática com idursulfase é a terapia mais bem sucedida para pacientes com Síndrome de Hunter. Idursulfase é administrada por infusão intravenosa semanalmente, em infusões que duram de 3 a 4 horas, na dose de 0,5 mg/kg diluída em um volume apropriado de salina. Pacientes que têm experiências de reações adversas relacionadas à infusão podem receber pré-medicação com anti-histamínicos nas infusões subsequentes. Para diminuir os problemas associados às infusões em crianças, como a dificuldade de acesso venoso, dispositivos de acesso vascular (Port-a-cath[®]) são muito utilizados.

Cabe salientar aqui que nosso estudo envolveu crianças com idade de 1 a 7 anos de idade, as quais estão participando de um ensaio clínico internacional com duração de 1 ano para verificar a eficácia e segurança da TRE em pacientes menores de 5 anos (foi aberta uma exceção para uma criança de 7 anos participar do estudo). Diferentemente de relatos em adultos, há poucas experiências de tratamento com idursulfase em crianças nessa faixa etária, tendo em vista que crianças não tem capacidade para cooperar com os testes utilizados na verificação da eficácia, como testes de resistência e de função pulmonar (Wraith et al., 2008). O

primeiro estudo clínico relatando a experiência deste tratamento em crianças obteve resultados satisfatórios, como diminuição significativa da quantidade de GAGs excretados, melhora na resistência física e diminuição da hepatoesplenomegalia (Alcalde-Martín et al., 2010).

Neste trabalho, nós avaliamos parâmetros de estresse oxidativo no sangue destas crianças com MPS II durante os primeiros 6 meses de TRE e verificamos que este tratamento foi eficaz na diminuição dos danos causados pelas ERO. Tanto a peroxidação lipídica como os níveis de dano ao DNA sofreram diminuição significativa quando comparados com os valores de pré-tratamento e ao final de 6 meses de TRE os níveis mantiveram-se significativamente diminuídos, porém não se igualaram aos valores dos controles. Além disso, os níveis de grupamentos sulfrídila aumentaram significativamente nos primeiros 3 meses de tratamento em relação ao pré-tratamento, mas ao final de 6 meses da TRE os valores se equivaleram aos basais. Já os níveis plasmáticos de grupamentos carbonila estavam significativamente aumentados ao longo de todo o tratamento, quando comparados ao controle. As atividades das enzimas SOD e CAT, bem como do TAS, também sofreram variações durante a TRE, refletindo uma tentativa de equilibrar as defesas antioxidantes do organismo. No final dos 6 meses de tratamento os níveis de CAT e o TAS estavam similares aos valores dos controles, enquanto que a SOD teve um aumento significativo em relação aos controles nesse mesmo momento. Assim, considerando que os valores de CAT, SOD e TAS sofreram alterações transitórias ao longo do período de tratamento analisado neste trabalho (6 meses), pode-se concluir que é necessário um período de tempo maior para que as defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas sejam restauradas e/ou re-estabelecidas, sendo interessante realizar uma análise desses parâmetros em um

período de tempo superior a 6 meses. Cabe salientar que não há na literatura até o presente momento um estudo avaliando parâmetros de estresse oxidativo antes e durante a TRE em pacientes com MPS II. Pereira et al. (2007) verificaram aumento da atividade da CAT e diminuição da atividade da SOD durante o tratamento com TRE em pacientes com MPS I, enquanto que os valores de TBARS não sofreram variação. Estes autores sugerem que o aumento da atividade da CAT pode ter sido causada por uma aumentada produção de peróxido de hidrogênio de diferentes tecidos, tendo em vista que os eritrócitos podem absorver peróxido de hidrogênio de outras células (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Em relação a avaliação do efeito da TRE sob o dano ao DNA pelo ensaio cometa em leucócitos nos pacientes com MPS II, verificamos uma diminuição significativa do índice de dano a partir do 3º mês da TRE. Além disso, foi observada uma diminuição importante da quantidade de células com escore 3 durante o tratamento, sendo que a partir dos 3 meses de TRE foram identificadas apenas células com escore 1 e 2 (menores danos). Verificamos também uma correlação significativa positiva do índice de dano ao DNA com o conteúdo de grupamentos carbonila e com os níveis de MDA nos pacientes com MPS II. Assim, pode-se hipotetizar que os resultados encontrados neste trabalho em relação ao dano ao DNA em pacientes com MPS II pode ter ocorrido devido um excesso de produção de radicais livres gerando dano oxidativo em células (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Estudos recentes têm mostrado que os lisossomos são de fato altamente suscetíveis ao estresse oxidativo (Terman et al, 2006). Quando os níveis de espécies reativas na célula são muito altos ou os sistemas antioxidantes não conseguem remover todo o peróxido de hidrogênio formado, o excesso entra para dentro do lisossomo. Neste meio, e com a presença de íons ferro, pode ocorrer a

reação de Fenton, formando radicais hidroxil altamente reativos. Estes radicais induzem reações de peroxidação da membrana lipídica, o que resulta em desestabilização da membrana lisossomal e liberação do seu conteúdo (enzimas hidrolíticas e outros metabólitos acumulados) no citoplasma, causando apoptose ou necrose celular, incluindo dano ao DNA. A liberação do conteúdo lisossomal também induz danos mitocondriais com aumento secundário da produção de radicais superóxido e peróxido de hidrogênio. Assim, ocorre um ciclo de formação de espécies reativas e dano lisossomal.

Outros estudos também têm reportado que apoptose ou necrose de alguns tipos celulares devido a liberação do conteúdo lisossomal leva à ativação da microglia, o que parece estar envolvido no processo neurodegenerativo que ocorre em MPS I e MPS IIIB (Ohmi et al., 2003; Villani, et al., 2009). Os autores sugerem que a ativação da microglia aumenta danos através de inflamação e/ou através de ERO liberadas. Estes autores mostraram um componente inflamatório na doença cerebral nos dois tipos de MPS, o que já é conhecido em muitas doenças neurodegenerativas. Em outras DLDs, como gangliosidoses GM1 (Jeyakumar et al., 2003), leucodistrofia metacromática (Hess et al., 1996), Niemann-tipo Pick tipo C (German et al., 2002) e doença de Krabe (Wu et al., 2000) a ativação da microglia também tem sido sugerida como tendo uma participação na fisiopatologia dessas doenças, podendo ser um alvo de estratégias terapêuticas. Foi verificado, em camundongos Sandhoff, outra DLD, que a inflamação contribui para a fisiopatologia da doença, já que o uso de drogas anti-inflamatórias levou à manutenção da coordenação motora e ao aumento da expectativa de vida dos animais, e o uso de antioxidantes teve um efeito benéfico na redução da progressão da doença. Allen et al. (1997) demonstraram que pacientes com doença de Gaucher, outra DLD,

apresentaram aumento das citocinas pró-inflamatórias interleucina 6 (IL-6) e interleucina 10 (IL-10), refletindo a resposta dos macrófagos ao armazenamento anormal de glicoesfingolipídeos. Além disso, a TRE levou a uma diminuição de IL-10 com melhoras nos sintomas clínicos e regressão dos sinais da doença nestes pacientes. Assim, foi sugerido que um tratamento anti-inflamatório pode ser utilizado em pacientes com DLDs, sozinho ou em combinação com TRE.

Sabe-se que acúmulo de GAGs nos lisossomos de diferentes tipos celulares, tecidos e órgãos é a causa primária das manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes com MPS II, já que os lisossomos aumentam em número e tamanho em uma tentativa de manter a concentração crescente de material não degradado (Eng et al., 2008; Wraith et al., 2008). Deposição de GAGs nos tecidos da orofaringe, traquéia e brônquios leva a severa obstrução da passagem do ar e da função respiratória. No coração, fígado e baço o acúmulo leva a cardiomiopatia, displasia de válvula cardíaca e hepatoesplenomegalia. Deformidades esqueléticas e problemas articulares também são muito frequentes. Além disso, o armazenamento anormal de GAGs no SNC leva a comprometimento neurológico progressivo. Por outro lado, sabe-se que nessas desordens o acúmulo de GAGs tem como efeito secundário o desencadeamento de um processo inflamatório. GAGs induzem a proliferação de muitos tipos de células imunes, como células B e T e macrófagos, promovendo inflamação e destruição celular. Como parte da cascata inflamatória, fator de necrose tumoral e outras citocinas inflamatórias são liberados pelas células, resultando em apoptose (Simonaro et al., 2008). Um estudo relata que as disfunções articulares e ósseas apresentadas por pacientes com MPS tipo VI e VII estão relacionadas aos altos níveis de GAGs no fluido sinovial por estimularem caminhos de sinalização relacionados com ativação inflamatória (Simonaro et al., 2005). Outro

estudo relata que administração de GAGs em camundongos normais induzem artrite, dermatite e tendossinovite (Wang e Roehrl, 2002). Nas DLDs, as ERO podem ter um papel na ativação do mecanismo inflamatório, por levar a desestabilização lisossomal, promovendo a liberação de enzimas proteolíticas, lesando as células e ativando células fagocíticas (Vitner et al., 2010). Desta forma, poderia-se levantar a hipótese que o processo inflamatório que ocorre nas diferentes MPS poderia estar relacionado ao estresse oxidativo descrito nestas doenças.

Em conclusão, o presente estudo mostrou que pacientes com MPS II no pré-tratamento possuem dano a proteínas, lipídios e DNA, possivelmente secundário ao acúmulo de GAGs nos lisossomos. Além disso, para nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho que mostra o efeito protetor da TRE contra os danos oxidativos em pacientes com MPS II.

V. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho permitem concluir:

Capítulo I:

- Pacientes com MPS II antes do tratamento com TRE possuem dano a lipídios e proteínas, verificado pelos níveis de MDA e de grupamentos carbonila e sulfidril plasmáticos, respectivamente;
- A atividade da CAT mostrou-se aumentada antes do tratamento, enquanto o TAS estava diminuído, refletindo alterações das defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas nos pacientes com MPS II antes da TRE;
- A TRE levou à redução significativa dos danos a lipídios e proteínas em relação ao pré-tratamento nos pacientes com MPS II.

Capítulo II

- Pacientes com MPS II antes do tratamento com TRE possuem dano ao DNA, verificado através do ensaio cometa em leucócitos;
- A TRE diminuiu significativamente o dano ao DNA em relação ao pré-tratamento nos pacientes com MPS II;
- O dano ao DNA foi positivamente correlacionado com o dano a lipídios e proteínas nos pacientes estudados.

Podemos concluir que o estresse oxidativo contribui em parte na fisiopatologia da doença MPS II e que o tratamento com TRE parece ter um efeito benéfico contra os danos oxidativos a proteínas, lipídios e DNA apresentados pelos pacientes. Assim, pode-se sugerir que a administração de antioxidantes como adjuvante no tratamento dessa doença possa ser benéfica a pacientes com MPS II.

VI. PERSPECTIVAS

Pretendemos dar continuidade a esse trabalho, confirmando nossos resultados e expandindo-os. Dessa forma, são nossas perspectivas:

- a) Estudar os parâmetros de estresse oxidativo em pacientes com MPS II sob TRE em período superior a 6 meses de tratamento, a fim de verificar se há reversão ou estabilização dos níveis desses marcadores;
- b) Quantificar os GAGs urinários dos pacientes, a fim de correlacionar essas dosagens aos parâmetros de estresse oxidativo;
- c) Avaliar *in vivo* e *in vitro* o efeito de antioxidantes sobre parâmetros de estresse oxidativo (dano à proteína, a lipídios e ao DNA) em pacientes com MPS II;
- d) Dosar marcadores inflamatórios, como interleucina 6 (IL6), interleucina 10 (IL10) e fator de necrose tumoral, a fim de verificar se pacientes com MPS II possuem como um dos mecanismos fisiopatológicos a ativação inflamatória, e correlacioná-los com os parâmetros oxidativos;
- e) Estudar parâmetros de estresse oxidativo em outros tipos de MPS, inclusive em MPS tipo I e VI que também possuem como tratamento de escolha a TRE, para comparação com os resultados obtidos neste trabalho.

VII. REFERÊNCIAS

- Alcalde-Martín, C., Muro-Tudelilla, J.M., Cancho-Candela, R., Gutiérrez-Solana, L.G., Pintos-Morell, G., Martí-Herrero, M., Munguira-Aguado, P., Galán-Gómez, E. (2010). First experience of enzyme replacement therapy with idursulfase in Spanish patients with Hunter syndrome under 5 years of age: case observations from the Hunter Outcome Survey (HOS). *Eur J Med Genet* 53:371-377.
- Allen, M.J., Myer, B.J., Khokher, A.M., Rushton, N., Cox, T.M. (1997). Pro-inflammatory cytokines and the pathogenesis of Gaucher's disease: increased release of interleukin-6 and interleukin-10. *Q J Med* 90:19-25.
- Baehner, F., Schmiedeskamp, C., Krummenauer, F., Miebach, E., Bajbouj, M., Whybra, C., Kohlschütter, A., Kampmann, C., Beck, M. (2005). Cumulative incidence rates of the mucopolysaccharidoses in Germany. *J Inherit Metab Dis* 28:1011–1017.
- Barschak, A.G., Sitta, A., Deon, M., Barden, A.T., Dutra-Filho, C.S., Wajner, M., Vargas, C.R. (2008). Oxidative stress in plasma from maple syrup urine disease patients during treatment. *Metab Brain Dis* 23:71-80.
- Barschak, A.G., Sitta, A., Deon, M., Busanello, E.N., Coelho, D.M., Cipriani, F., Dutra-Filho, C.S., Giugliani, R., Wajner, M., Vargas, C.R. (2009). Amino acids levels and lipid peroxidation in maple syrup urine disease patients. *Clin Biochem* 42(6):462-466.
- Beck, Michael. (2010). Therapy for lysosomal storage disorders. *IUBMB Life* 62(1):33–40.
- Bond, C.S., Clements, P.R., Ashby, S., Collyer, C.A., Harrop, S.J., Hopwood, J.J., Guss, J.M. (1997). Structure of a human lysosomal sulfatase. *Structure* 5:277-289.

- Boveris, A. (1998). Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. *Medicina (B. Aires)* 58:350-356.
- Brante, G. (1952). Gargoylism: a mucopolysaccharidosis. *Scand J Clin Lab Invest* 4:43.
- Cakatay, U. (2005). Protein oxidation parameters in type 2 diabetic patients with good and poor glycaemic control. *Diabetes Metab* 31:551–557.
- Cardone, M., Polito, V.A., Pepe, S., Mann, L., D'Azzo, A., Auricchio, A., Ballabio, A., Cosma, M.P. (2006). Correction of Hunter syndrome in the MPS II mouse model by AAV2/8-mediated gene delivery. *Hum Mol Genet* 15:1225-1236.
- Coelho, J.C., Wajner, M., Burin, M.G., Vargas, C.R., Giugliani, R. (1997). Selective screening of 10,000 high-risk Brazilian patients for the detection of inborn errors of metabolism. *Eur J Pediatr* 156:650-654.
- Deon, M., Sitta, A., Barschak, A.G., Coelho, D., Pigatto, M., Schmitt, G.O., Jardim, L.B., Giugliani, R., Wajner, M., Vargas, C.R. (2007). Induction of lipid peroxidation and decrease of antioxidant defenses in symptomatic and asymptomatic patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Int J Devl Neuroscience* 7:441-444.
- Deon, M., Sitta, A., Barschak, A.G., Coelho, D.M., Terroso, T., Schmitt, G.O., Wanderley, H.Y.C., Jardim, L.B., Giugliani, R., Wajner, M., Vargas, C.R. (2008). Oxidative stress is induced in female carriers of X-linked adrenoleukodystrophy. *J Neurol Sci* 266:79-83.
- Desnick, R.J. (2004). Enzyme replacement and enhancement therapies for lysosomal diseases. *J Inherit Metab Dis* 27:385-410.
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82:47-95.

- Eng, C., Beck, M., Martin, R. (2008). Recognition and diagnosis of mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome). *Pediatrics* 121:377-386.
- Fontella, F.U., Pulrolnik, V., Gassen, E., Wannmacher, C.M.D., Klein, A.B., Wajner, M., Dutra-Filho, C.S. (2000). Propionic and L-methylmalonic acids induce oxidative stress in brain of young rats. *Neurochemistry* 11:541-544.
- Fu, R., Yanjanin, N.M., Bianconi, S., Pavan, W.J., Porter, F.D. (2010). Oxidative stress in Niemann–Pick disease, type C. *Mol Genet Metab* 101:214–218.
- Garrod, A.E. (1902). The incidence of alkaptonuria: a study in chemical individuality. *Lancet* 2:1616-1620.
- Germain, D.P. (2005). Enzyme replacement therapies for lysosomal storage disorders. *Med Sci* 21(11):77-83.
- German, D.C., Liang, C.L., Song, T., Yazdani, U., Xie, C., Dietschy, J.M. (2002). Neurodegeneration in the Niemann-Pick C mouse: glial involvement. *Neuroscience* 109:437–450.
- Giugliani, R., Rojas, V.M., Martins, A.M., Valadares, E.R., Clarke, J.T., Góes, J.E., Kakkis, E.D., Worden, M.A., Sidman, M., Cox, G.F. (2009). A dose-optimization trial of laronidase (Aldurazyme) in patients with mucopolysaccharidosis I. *Mol Genet Metab* 96:13-19.
- Halliwell, B., Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 142:231-255.
- Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 141(2):312-322.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (2007). Free Radicals in Biology and Medicine. 4^a edição. New York: Oxford University Press.

- Hamano, K., Hayashi, M., Shioda, K., Fukatsu, R., Mizutani, S. (2008). Mechanisms of neurodegeneration in mucopolysaccharidoses II and IIIB: analysis of human brain tissue. *Acta Neuropathol* 115:547–559.
- Harmatz, P., Giugliani, R., Schwartz, I.V., Guffon, N., Teles, E.L., Miranda, M.C., Wraith, J.E., Beck, M., Arash, L., Scarpa, M., Ketteridge, D., Hopwood, J.J., Plecko, B., Steiner, R., Whitley, C.B., Kaplan, P., Yu, Z.F., Swiedler, S.J., Decker, C. (2008). Long-term follow-up of endurance and safety outcomes during enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis VI: final results of three clinical studies of recombinant human N-acetylgalactosamine 4-sulfatase. *Mol Genet Metab* 94:469-475.
- Harmatz, P., Yu, Z., Giugliani, R., Schwartz, I.V.D., Guffon N., Teles, E.L., Sá Miranda, M.C., Wraith, J.E., Beck, M., Arash, L., Scarpa, M., Ketteridge, D., Hopwood, J.J., Plecko, B., Steiner, R., Whitley, C.B., Kaplan, P., Swiedler, S.J., Hardy, K., Berger, K.I., Decker, C. (2010). Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis VI: evaluation of long-term pulmonary function in patients treated with recombinant human N-acetylgalactosamine 4-sulfatase. *J Inherit Metab Dis* 33:51–60.
- Hartung, S.D., Frandsen, J.L., Pan, D., Koniar, B.L., Graupman, P., Gunther, R., Low, W.C., Whitley, C.B., McIvor, R.S. (2004). Correction of metabolic, craniofacial, and neurologic abnormalities in MPS I mice treated at birth with adeno-associated virus vector transducing the human α -L-iduronidase gene. *Mol Ther* 9:866-875.
- Hasnis, E., Bar-Shay, M., Burbea, A., Reznick, A.Z. (2007). Mechanisms underlying cigarette smoke-induced NK-kB activation in human lymphocytes: the role of reactive nitrogen species. *J Physiol Pharmacol* 58:275-287.

- Heldermon, C.D., Ohlemiller, K.K., Herzog, E.D., Vogler, C., Qin, E., Wozniak, D.F., Tan, Y., Orrock, J.L., Sands, M.S. (2010). Therapeutic efficacy of bone marrow transplant, intracranial AAV-mediated gene therapy, or both in the mouse model of MPS IIIB. *Mol Ther* 18:873-880.
- Hess, B., Saftig, P., Hartmann, D., Coenen, R., Lüllmann-Rauch R., Goebel, H.H., Evers, M., von Figura, K., D'Hooge, R., Nagels, G., De Deyn, P., Peters, C., Gieselmann, V. (1996). Phenotype of arylsulfatase A-deficient mice: relationship to human metachromatic leukodystrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:14821–14826.
- Hunter, C. (1917). A rare disease in two brothers. *Proc R Soc Med* 10:104–106.
- Jeyakumar, M., Thomas, R., Elliot-Smith, E., Smith, D.A., van der Spoel, A.C., d'Azzo, A., Perry, V.H., Butters, T.D., Dwek, R.A., Platt, F.M. (2003). Central nervous system inflammation is a hallmark of pathogenesis in mouse models of GM1 and GM2 gangliosidosis. *Brain* 126:974–987.
- Jimenez-Sanchez, G., Childs, B., Valle, D. (2001). The effect of mendelian disease of human health. In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (Eds.) *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. 8^a edição. New York: MacGraw-Hill. 167-174.
- Kakkis, E.D., Muenzer, J., Tiller, G.E., Waber, L., Belmont, J., Passage, M., Izykowski, B., Phillips, J., Doroshov, R., Walot, I., Hoft, R., Neufeld, E.F. (2001). Enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis I. *N Eng J Med* 344:182-188.
- Kasper, D.C., Ratschmann, R., Metz, T.F., Mechtler, T.P., Möslinger, D., Konstantopoulou, V., Item, C.B., Pollak, A., Herkner, K.R. (2010). The national Austrian newborn screening program – eight years experience with mass

- spectrometry. Past, present, and future goals. *Wien Klin Wochenschr* 122:607-613.
- Kim, C.H., Hwang, H.Z., Seng, M.S., Paik, K.H., Kwon, E.K., Moon, K.B., Yoon, J.H., Han, C.K., Jin, D.K. (2003). Mutation spectrum of the iduronate sulfatase gene in 25 unrelated Korean Hunter syndrome patients: identification of 13 novel mutations. *Hum Mut* 599:1-5.
- Latini, A., Scussiato, K., Borba Rosa, R., Leipnitz, G., Llesuy, S., Bello-Klein, A., Dutra-Filho, C.S., Wajner, M. (2003). Induction of oxidative stress by L-2-hydroxyglutaric acid in rat brain. *J Neurosci Res* 74:103-110.
- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, L., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shalhithel, S., Stadman, E.R. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 186:464-478.
- Liao, W., McNutt, M.A., Zhu, W.G. (2009). The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods* 48:46–53.
- Lowry, R.B., Applegarth, D.A., Tonne, J.R., MacDonald, E., Thunem, N.Y. (1990). An update on frequency of mucopolysaccharide syndromes in British Columbia. *Hum Genet* 85:389-390.
- Mabe, P., Leistner, S., Schwartz, I., Matte, U., Giugliani, R. (2003). Errores innatos del metabolismo lisosomal. In: Colombo, M., Cornejo, V., Raimann, E. (Eds.) Errores innatos en el metabolismo del niño. 2ª edição. Santiago de Chile: Editorial Universitaria. 225-256.
- Malatack, J.J., Consolini, D.M., and Bayever, E. (2003). The status of hematopoietic stem cell transplantation in lysosomal storage disease. *Pediatr Neurol* 29:391-403.

- Marks, D.B., Marks, A.D., Smith, C.M. (1996). Oxygen metabolism and oxygen toxicity. In: Velker, J. (Ed.) Basic Medical Biochemistry. A Clinical Approach. Baltimore: Williams & Wilkins. 327-340.
- Maxwell, S.R. (1995). Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs* 49:345-361.
- Meikle, P.J., Hopwood, J.J., Clague, A.E., Carey, W.F. (1999). Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA* 281:249-254.
- Muenzer, J., Wraith, J.E., Beck, M., Giugliani, R., Harmatz, P., Eng, C.M., Vellodi, A., Martin, R., Ramaswami, U., Gucsavas-Calikoglu, M., Vijayaraghavan, S., Wendt, S., Puga, A.C., Ulbrich, B., Shinawi, M., Cleary, M., Piper, D., Conway, A.M., Kimura, A. (2006). A phase II/III clinical study of enzyme replacement therapy with idursulfase in mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome). *Genet Med* 8:465–473.
- Muenzer, J., Gucsavas-Calikoglu, M., McCandless, S.E., Schuetz, T.J., Kimura, A. (2007). A phase I/II clinical trial of enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome). *Mol Genet Metab* 90:329–337.
- Nelson, J., Crowhurst, J., Carey, B., Greed, L. (2003). Incidence of the mucopolysaccharidoses in Western Australia. *Am J Med Genet* 123:310-313.
- Neufeld, E.F., Muenzer, J. (2001). The mucopolysaccharidoses. In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (Eds.) The metabolic basis of inherited disease. 8^a edição. New York: McGraw Hill. 3421-3452.
- Ohmi, K., Greenberg, D.S., Rajavel, K.S., Ryazantsev, S., Li, H.H., Neufeld, E.F. (2003). Activated microglia in cortex of mouse models of mucopolysaccharidoses I and IIIB. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 100:1902-1907.

- Okuyama, T., Tanaka, A., Suzuki, Y., Ida, H., Tanaka, T., Cox, G.F., Eto, Y., Oorii, T. (2010). Japan Elaprase[®] Treatment (JET) study: Idursulfase enzyme replacement therapy in adult patients with attenuated Hunter syndrome (Mucopolysaccharidosis II, MPS II). *Mol Gen Metab* 99:18-25.
- Ostling, O., Johanson, K.J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123(1):291-298.
- Pan, H.Z., Zhang, H., Chang, D., Li, H., Sui, H. (2008). The change of oxidative stress products in diabetes mellitus and diabetic retinopathy. *Brit J Ophthalmol* 92:548–551.
- Pereira, V.G., Martins, A.M., Micheletti, C., D'Almeida, V. (2007). Mutational and oxidative stress analysis in patients with mucopolysaccharidosis type I undergoing enzyme replacement therapy. *Clin Chim Acta* 387:75-79.
- Pinto, R., Caseiro, C., Lemos, M., Lopes, L., Fontes, A., Ribeiro, H., Pinto, E., Silva, E., Rocha, S., Marcao, A., Ribeiro, I., Lacerda, L., Ribeiro, G., Amaral, O., Sa Miranda, M.C. (2004). Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal. *Eur J Hum Genet* 12:87-92.
- Poorthuis, B.J.H.M., Wevers, R.A., Kleijer, W.J., Groener, J.E.M., de Jong, J.G.N., van Weely, S., Niezen-Koning, K.E., van Diggelen, O.P. (1999). The frequency of lysosomal storage diseases in the Netherlands. *Hum Genet* 105:151–156.
- Poupětová, H., Ledvinová, J., Berná, L., Dvořáková, L., Kožich, V., Elleder, M. (2010). The birth prevalence of lysosomal storage disorders in the Czech Republic: comparison with data in different populations. *J Inherit Metab Dis* 33:387-396.

- Regateiro, F.J. (2003). Manual de Genética Médica. 1ª edição. Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra.
- Reolon, G.K., Reinke, A., Oliveira, M.R., Braga, L.M., Camassola, M., Andrades, M.E., Moreira, J.C.F., Nardi, N.B., Roesler, R., Dal-Pizzol, F. (2009). Alterations in oxidative markers in the cerebellum and peripheral organs in MPS I mice. *Cell Mol Neurobiol* 29:443-448.
- Reznick, A.Z., Packer, L. (1993). Free radicals and antioxidants in muscular neurological diseases and disorders. In: Poli, G., Albano, E., Dianzani, M.U. (Eds.) Free Radicals: From Basic Science to Medicine. Basel: Birkäuser Verlag. 425-437.
- Ribas, G.S., Manfredini, V., de Marco, M.G., Vieira, R.B., Wayhs, C.Y., Vanzin, C.S., Biancini, G.B., Wajner, M., Vargas, C.R. (2010a). Prevention by L-carnitine of DNA damage induced by propionic and L-methylmalonic acids in human peripheral leukocytes in vitro. *Mutat Res* 702:123-128.
- Ribas, G.S., Manfredini, V., de Mari, J.F., Wayhs, C.Y., Vanzin, C.S., Biancini, G.B., Sitta, A., Deon, M., Wajner, M., Vargas, C.R. (2010b). Reduction of lipid and protein damage in patients with disorders of propionate metabolism under treatment: a possible protective role of L-carnitine supplementation. *Int J Dev Neurosci* 28:127-132.
- Roversi, F.M., Galdieri, L.C., Grego, B.H.C., Souza, F.G., Micheletti, C., Martins, A.M., D'Almeida, V. (2006). Blood oxidative stress markers in Gaucher disease patients. *Clin Chim Acta* 364:316-320.
- Salvador, M., Henriques, J.A.P. (2004). Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo. 1ª edição. Canoas: Editora da Ulbra.

- Sánchez, M.B., Fuentes, F.J.R. (2006). Mucopolisacaridosis. In: Sanjurjo, P., Baldellou, A. (Eds.) Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias. 2ª edición. Madrid: Ergon. 421-429.
- Saudubray, J.M., Charpentier, C. (2001). Clinical phenotypes: diagnosis/algorithms. In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (Eds.) The metabolic and molecular bases of inherited disease. 8ª edición. New York: McGraw-Hill. 1327-1403.
- Schaap, T., Bach, G. (1980). Incidence of mucopolysaccharidoses in Israel: is Hunter disease a “Jewish disease”? *Hum Genet* 56:221–223.
- Schiffmann, R., Brady, R.O. (2002). New prospects for the treatment of lysosomal storage diseases. *Drugs* 62(5):733-742.
- Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (2001). The metabolic and molecular basis of inherited disease. 8ª edición. New York: McGraw-Hill.
- Shen, J., Meng, X., Moore, D.F., Quirk, J.M., Shayman, J.A., Schiffmann, R., Kaneski, C.R. (2008). Globotriaosylceramide induces oxidative stress and up-regulates cell adhesion molecule expression in Fabry disease endothelial cells. *Mol Gen Metab* 95:163-168.
- Simonaro, C.M., D’Angelo, M., Haskins, M.E., Schuchman, E.H. (2005). Joint and bone disease in mucopolysaccharidoses VI and VII: identification of new therapeutic targets and biomarkers using animal models. *Pediatr Res* 57:701–707.
- Simonaro, C.M., D’Angelo, M., He, X., Eliyahu, E., Shtraizent, N., Haskins, M.E., Schuchman, E.H. (2008). Molecular pathogenesis of genetic and inherited diseases mechanism of glycosaminoglycan-mediated bone and joint disease:

- implications for the Mucopolysaccharidoses and other connective tissue diseases. *Am J Pathol* 172:112-122.
- Singh, N., McCoy, M., Tice, R., Schneider, E. (1988). A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individuals cells. *Exp Cell Res* 175:184-191.
- Sitta, A., Barschak, A.G., Deon, M., Terroso, T., Pires, R., Giugliani, R., Dutra-Filho, C.S., Wajner, M., Vargas, C.R. (2006). Investigation of oxidative stress parameters in treated phenylketonuric patients. *Metab Brain Dis* 21(4):287-296.
- Sitta, A., Barschak, A.G., Deon, M., De Mari, J.F., Barden, A.T., Vanzin, C.S., Biancini, G.B., Schwartz, I.V., Wajner, M., Vargas, C.R. (2009). L-carnitine blood levels and oxidative stress in treated phenylketonuric patients. *Cell Mol Neurobiol* 2:211-218.
- Starke-Reed, P.E., Oliver, C.N. (1989). Protein oxidation and proteolysis during aging and oxidative stress. *Arch Biochem Biophys* 275:559-567.
- Terman, A., Kurz, T., Gustafsson, B., Brunk, U.T. (2006). Lysosomal labilization *IUBMB Life* 58:531–539.
- Timms, K.M., Lu, F., Shen, Y., Pierson, C.A., Muzny, D.M., Gu, Y., Nelson, D.L., Gibbs, R.A. (1995). 130 kb of DNA sequence reveals two new genes and a regional duplication distal to the human iduronate-2-sulfate sulfatase locus. *Genome Res* 5:71-78.
- Tuschl, K., Gal, A., Paschke, E., Kircher, S., Bodamer, O.A. (2005). Mucopolysaccharidosis type II in females: case report and review of literature. *Pediatr Neurol* 32:270-272.
- Van Dyck, S.M.O., Adams, C.A. (2003). Dietary antioxidants: antiradical active nutricines. *Zootecnia* 11:15-19.

- van Spronsen, F.J. (2010). Phenylketonuria: a 21st century perspective. *Nat Rev Endocrinol* 6(9):509-514.
- Vieira, T., Schwartz, I., Muñoz, V., Pinto, L., Steiner, C., Ribeiro, M., Boy, R., Ferraz, V., de Paula, A., Kim, C., Acosta, A., Giugliani, R. (2008). Mucopolysaccharidoses in Brazil: what happens from birth to biochemical diagnosis? *Am J Med Genet Part A* 146:1741–1747.
- Villani, G.R.D., Di Domenico, C., Musella, A., Cecere, F., Di Napoli, D., Di Natale, P. (2009). Mucopolysaccharidosis IIIB: oxidative damage and cytotoxic cell involvement in the neuronal pathogenesis. *Brain Res* 1279:99–108.
- Vitner, E.B., Platt, F.M., Futerman, A.H. (2010). Common and uncommon pathogenic cascades in lysosomal storage diseases. *J Biol Chem* 285(27):20423-20427.
- Waber, L. (1990). Inborn errors of metabolism. *Ped Ann* 19(2):105-118.
- Wang, J.Y., Roehrl, M.H. (2002). Glycosaminoglycans are a potential cause of rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:14362–14367.
- Warrs, R.W., Chalmers, R.A., Lawson, A.M. (1975). Abnormal organic acidurias in mentally retarded patients. *Lancet* 1:368.
- Winchester, B. (1996). Lysosomal metabolism of glycoconjugates. In: Lloyd, J.B., Mason, R.W. (Eds.) *Subcellular biochemistry. Biology of the lysosome*. New York: Plenum Press. 191-238.
- Wraith, J.E., Cooper, A., Thornley M., Wilson, P.J., Nelson, P.V., Morris, C.P., Hopwood, J.J. (1991). The clinical phenotype of two patients with a complete deletion of the iduronate-2-sulphatase gene (mucopolysaccharidosis II – Hunter syndrome). *Hum Genet* 87:205-206.
- Wraith, J.E. (1996). The mucopolysaccharidoses: a clinical review and guide to management. *Arch Dis Child* 72:263-267.

- Wraith, J.E., Beck, M., Scarpa, M. (2008). Mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): a clinical review and recommendations for treatment in the era of enzyme replacement therapy. *Eur J Pediatr* 167:267-277.
- Wu, Y.P., Matsuda, J., Kubota, A., Suzuki, K., Suzuki, K. (2000). Infiltration of hematogenous lineage cells into the demyelinating central nervous system of twitcher mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 59:628–639.
- Young, I.D., Harper, P.S., Archer, I.M., Newcombe, R.G. (1982). A clinical and genetic study of Hunter's syndrome. Clinical heterogeneity. *J Med Gen* 19:401-407.
- Zampieri, S., Mellon, S.H., Butters, T.D., Nevyjel, M., Covey, D.F., Bembi, B., Dardis, A. (2009). Oxidative stress in NPC1 deficient cells: protective effect of allopregnanolone. *J Cell Mol Med* 13:3786-3796.

ANEXO 1- Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Estrutura química dos GAGs	8
Figura 2. Rota de degradação do dermatan (A) e heparan (B) sulfato nos lisossomos, destacando a enzima iduronato-2-sulfatase, deficiente em MPS II.	14
Figura 3. Redução do oxigênio à água, sítios de formação de radicais livres e enzimas antioxidantes.	19

ANEXO 2 - Lista de tabelas

Pág.

Tabela 1. Classificação das Mucopolissacaridoses (MPS) com indicação do acúmulo de glicosaminoglicanos (GAGs) na urina e deficiência enzimática.	9
Tabela 2. Incidência da MPS II em recém-nascidos vivos.	12

ANEXO 3 – Parecer do Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB00000921) analisaram o projeto:

Projeto: 09-379

Versão do Projeto: 19/10/2009

Versão do TCLE: 20/11/2009

Pesquisadores:

CARMEN REGIA VARGAS

LÉTICIA FILIPPON

IDA VANESSA DOEDERLEIN SCHWARTZ

MOACIR WAJNER

ANGELA SITTA

GIOVANA BRONDANI BIANCINI

Título: AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM MUCOPOLISSACARIDOSE

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada imediatamente ao CEP/HCPA.

Porto Alegre, 20 de novembro de 2009.

Profª Nadine Clausell
Coordenadora GPPG e CEP/HCPA

ANEXO 4 – Termo de Consentimento

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – **PACIENTES COM MUCOPOLISSACARIDOSE**

O presente projeto de pesquisa tem por objetivo verificar os efeitos da ação dos radicais livres (por exemplo, radiação solar) e de substâncias antioxidantes (por exemplo, vitaminas) em pacientes com mucopolissacaridose. Também será avaliado o efeito do tratamento utilizado rotineiramente nesta doença sobre a ação destas substâncias antioxidantes e dos radicais livres.

Os dados necessários para a realização do projeto serão obtidos através de entrevistas realizadas com os pacientes e/ou responsáveis e da medida da ação dos radicais livres em sangue. Estes dados serão coletados nos dias de consultas rotineiras dos pacientes, não sendo necessário o comparecimento dos pacientes em consultas extras.

Os riscos e desconfortos causados pela coleta de material biológico para o estudo são semelhantes aos envolvidos na coleta de sangue e urina para exames laboratoriais de rotina. O material coletado será utilizado única e exclusivamente para fins do projeto de pesquisa, sendo garantido o sigilo das informações obtidas e que o indivíduo terá acesso às mesmas.

Os pesquisadores responsáveis pelo estudo estão à disposição para o esclarecimento de qualquer dúvida durante todo o andamento da pesquisa. Telefones de contato: 3359.8011 (Pesquisadores Responsáveis: Profa. Dra. Carmen Regla Vargas e a mestranda Letícia Filippon).

Pelo presente consentimento, declaro que fui devidamente informado sobre o projeto de pesquisa, de forma clara e detalhada, da liberdade de não participar do estudo e tive minhas dúvidas esclarecidas.

Data: _____

Nome: _____

Nome do responsável legal: _____

Assinatura: _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO –

PACIENTES CONTROLES

Vimos através deste convidar você a participar do trabalho cujo objetivo é avaliar a ação de radicais livres (por exemplo, radiação solar) e de substâncias antioxidantes (por exemplo, vitaminas) em pacientes portadores de doenças metabólicas herdadas geneticamente, as quais causam danos graves à saúde. Também pretendemos avaliar o efeito do tratamento utilizado rotineiramente nestas doenças sobre a ação destas substâncias antioxidantes e dos radicais livres. Você está sendo convidado a participar deste estudo como controle, ou seja, por não ser portador de doenças metabólicas.

Para participar você fará exames de sangue e de urina, as quais serão coletadas juntamente com as que serão utilizadas para os testes de acompanhamento, solicitados rotineiramente pelo seu médico. Os riscos e desconfortos causados pela coleta de material biológico para o estudo são semelhantes aos envolvidos na coleta de sangue e urina para exames laboratoriais de rotina. Os dados advindos com a sua doação são de importância científica relevante para o estabelecimento de novos tratamentos para estas doenças, bem como para o melhor entendimento destas patologias. O material coletado será única e exclusivamente utilizado para fins do projeto de pesquisa, sendo reservado ao doador acesso às mesmas.

As informações individuais levantadas pela pesquisa são confidenciais. Os resultados obtidos serão agrupados e expressos através de resultados numéricos, sem qualquer referência a elementos que possam identificar as pessoas que participaram do estudo.

Todas as despesas relacionadas ao custo dos exames laboratoriais serão cobertas por verbas do próprio Projeto de Pesquisa, completamente gratuitas para o paciente.

Caso você queira se retirar em definitivo da pesquisa, terá total liberdade para fazê-lo, sem que isso prejudique a futuros atendimentos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. O seu material (sangue e urina) coletado será destruído e os seus dados excluídos do nosso banco de dados.

Os pesquisadores responsáveis pelo estudo estão à disposição para o esclarecimento de qualquer dúvida durante todo o andamento da pesquisa.

Telefones de contato: 3359.8011 (Pesquisadores Responsáveis: Profa. Dra. Carmen Regla Vargas e a mestranda Letícia Filippon).

Pelo presente consentimento, declaro que fui devidamente informado sobre o projeto de pesquisa, de forma clara e detalhada, da liberdade de não participar do estudo e tive minhas dúvidas esclarecidas.

Data: _____

Nome: _____

Nome do responsável legal: _____

Assinatura: _____

ANEXO 5 – Carta de aceite do editor (Artigo 01)

Date: Feb 18, 2011
To: "Letícia Filippon" lefilippon@yahoo.com.br
From: "Molecular Genetics and Metabolism" MolGenMetab@elsevier.com
Subject: MGM-11-12R1 - Final Decision

Ms. No.: MGM-11-12R1

Title: Oxidative Stress in Patients with Mucopolysaccharidosis type II Before and During Enzyme Replacement Therapy

Corresponding Author: Mrs. Letícia Filippon

Authors: Camila Vanzin; Giovana Biancini; Izabela Pereira; Vanusa Manfredini; Angela Sitta; Maria do Carmo Peralba; Ida Schwartz; Roberto Giugliani; Carmen Vargas

Dear Mrs. Filippon,

We are pleased to notify you that your above-referenced manuscript has been accepted for publication in Molecular Genetics and Metabolism. We publish monthly and average 100 days from submission to publication. Our journal is also available online as part of Elsevier's ScienceDirect System. We have a color figure on each cover. You may want to indicate potential cover figures in future manuscripts.

We are forwarding your manuscript to the publishing office today. Galley proofs will be sent to you as soon as they are ready.

Thank you for giving us the opportunity to publish your work. We look forward to receiving other manuscripts from your laboratory.

With kind regards,

Edward R. B. McCabe, MD, PhD
Editor-in-Chief
Molecular Genetics and Metabolism

Executive Director
Linda Crnic Institute for Down Syndrome
Academic Office One, Room L15-8001
12631 East 17th Ave., Mail Stop 8608
Aurora, CO 80045
Phone: +1 303-724-6574
Fax: +1 303-724-5741
Email: edward.mccabe@ucdenver.edu

ANEXO 6 – Carta de aceite do editor (Artigo 02)

Date: Feb 11, 2011
To: "Letícia Filippon" lefilippon@yahoo.com.br
From: David Josephy djosephy@uoguelph.ca
Subject: Your Submission

Ms. Ref. No.: MUTGEN-D-11-00019R1

Title: Evidence of the DNA damage in leukocytes from Mucopolysaccharidosis type II patients in pretreatment and the protective effect of the enzyme replacement therapy
Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis

Dear Mrs. Filippon,

I am pleased to confirm that your paper "Evidence of the DNA damage in leukocytes from Mucopolysaccharidosis type II patients in pretreatment and the protective effect of the enzyme replacement therapy" has been accepted for publication in Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. Thank you for submitting your work to the journal.

With kind regards,

David Josephy, Ph.D.
Editor
Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis