

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Efeitos do tratamento de longo prazo com terapia de reposição enzimática sobre o estresse oxidativo e a inflamação em pacientes portadores de mucopolissacaridose tipo II

CARLOS EDUARDO DIAZ JACQUES

Porto Alegre, 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Efeitos do tratamento de longo prazo com terapia de reposição enzimática sobre o estresse oxidativo e a inflamação em pacientes portadores de mucopolissacaridose tipo II

Dissertação apresentada por **Carlos Eduardo Diaz Jacques** para obtenção do TÍTULO DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

CARLOS EDUARDO DIAZ JACQUES

Orientadora: Prof^a Dr^a Carmen Regla Vargas

Porto Alegre, 2016

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 29.03.2016, pela banca examinadora constituída por:

Profa. Dra. Alethéa Gatto Barschak
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Profa. Dra. Carla Dalmaz
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Cristiane Matté
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Jacques, Carlos Eduardo Diaz
Efeitos do tratamento de longo prazo com terapia de reposição enzimática sobre o estresse oxidativo e a inflamação em pacientes portadores de mucopolissacaridose tipo II / Carlos Eduardo Diaz Jacques. -- 2016.
112 f.

Orientadora: Carmen Regla Vargas.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Mucopolissacaridose tipo II. 2. Estresse oxidativo. 3. Inflamação. 4. Terapia de reposição enzimática. 5. Espécies reativas de nitrogênio. I. Vargas, Carmen Regla, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análises de Metabólitos do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e no Laboratório de Biomarcadores em Doenças Metabólicas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com financiamento da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do HCPA.

“We ourselves feel that what we are doing is just a drop in the ocean. But the ocean would be less because of that missing drop.”

Madre Teresa de Calcutá

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Prof^a Carmen Vargas, por todo o aprendizado e crescimento proporcionados, pelo carinho e compreensão nos momentos difíceis, e por todo o acolhimento, confiança e incentivo que sempre me ofereceu.

Aos meus queridos colegas de laboratório (Bruna Donida, Caroline Mescka, Daiane Rodrigues, Desirée Marchetti, Gilian Guerreiro, Giovana Biancini, Graziela Ribas, Marion Deon, Alana Monalissa, Heryk Mota, Jéssica Faverzani, Natália Forest, Tatiane Hammerschmidt), pela ajuda, força, companheirismo, e sobretudo pela amizade. Essa jornada foi muito mais fácil com a presença de vocês.

Aos meus colegas do Laboratório de Genética Toxicológica da UFCSPA, especialmente Nathalia Sperotto, Helen da Rosa e Rodrigo Veríssimo, por todo o conhecimento compartilhado, pela ajuda, mas principalmente pela parceria, risadas e pela amizade.

Às bioquímicas do Laboratório de Análise de Metabólitos, Ângela Sitta e Daniela Coelho, pela atenção e compreensão durante a realização dos experimentos.

A minha família, pelo amor, carinho, e por sempre acreditarem em mim. Aos meus pais João Carlos e Maira (*in memoriam*), pela felicidade de verem na minha realização profissional a sua própria realização pessoal; aos meus avós, Eduardo e Estela, por serem meus segundos pais, meu porto seguro, e meu maior incentivo; a minha irmã Taiane e aos meus sobrinhos Bruna e Vitor, meus amores, que me enchem de alegria e carinho; e aos meus tios Mauro e Nina e a minha prima Desirée, pelo amor e por, ainda que “distantes”, estarem sempre presentes.

Aos meus amigos da “Turma Malhação”, presentes que eu ganhei na graduação, que foram e são essenciais na minha vida, e os quais guardarei pra sempre.

Ao Pedro, por todo companheirismo, cumplicidade, e momentos de alegria juntos. Agradeço também aos seus pais, Vera e Vladimir, pelo apoio e pelo carinho.

Ao Serviço de Genética Médica e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela excelente infraestrutura e ambiente de trabalho.

Aos pacientes e familiares, verdadeiros lutadores, agradeço imensamente pela atenção, colaboração e confiança. Espero que de alguma forma este trabalho seja uma contribuição para um futuro melhor.

RESUMO

A mucopolissacaridose tipo II (MPS II) é uma doença lisossômica de depósito ocasionada pela degradação deficiente dos glicosaminoglicanos (GAGs) heparan sulfato e dermatan sulfato devido à deficiência da enzima iduronato-2-sulfatase. O principal tratamento para a MPS II é a administração da forma recombinante da enzima, em um processo conhecido como terapia de reposição enzimática (TRE). Considerando que estudos prévios de nosso grupo mostraram um possível papel protetor da TRE contra o estresse oxidativo nos seis meses iniciais de tratamento, e como este processo, assim como a inflamação, parece estar envolvido na patogênese da MPS II, o objetivo principal deste trabalho foi investigar o efeito a longo prazo da TRE em diversos marcadores de estresse oxidativo e pró-inflamatórios em pacientes MPS II. Foram analisadas amostras de plasma, eritrócitos e urina de pacientes MPS II (n=9) e em indivíduos saudáveis (n=10), pareados por idade e sexo. O tempo médio de tratamento com TRE foi de 4,6 anos. Os pacientes apresentaram um aumento significativo nos dois marcadores de peroxidação lipídica analisados – conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em plasma e concentração de 15-F2t-isoprostanos na urina. Os resultados indicaram certo grau de dano oxidativo a proteínas, determinado através da dosagem de di-tirosina na urina. No entanto, não houve alterações no conteúdo de grupamentos carbonila e sulfidrilica em plasma. Nossos resultados também mostraram que nos pacientes MPS II há maior concentração de espécies reativas de nitrogênio (ERN) tanto em plasma como em urina. Foram medidas as concentrações plasmáticas dos mediadores inflamatórios interleucina-1 β (IL-1 β) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), ambos aumentados nos pacientes em relação ao grupo controle. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos com relação à defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas. Os níveis de GAGs urinários foram encontrados aumentados em relação ao controle. Por fim, foram verificadas correlações positivas entre as concentrações urinárias de GAGs e os conteúdos de carbonilas, di-tirosina e nitrato/nitrito. Isto demonstra a possível relação dos GAGs na geração de ERN e no dano a biomoléculas. Além disto, as concentrações de IL-1 β foram correlacionadas com as de TNF- α , bem como com a concentração de óxido nítrico em plasma. Somados, estes resultados evidenciam que a TRE é capaz de proteger, em certo grau, contra a oxidação proteica e contra alterações das

defesas antioxidantes. Por outro lado, a lipoperoxidação, a inflamação, os níveis de GAGs e a produção de ERN não parecem melhorar em função da TRE, ainda que a longo prazo. Com isso, sugere-se que o estudo de novas abordagens terapêuticas para a MPS II, complementares à TRE, possa ser promissor, a fim de que haja maior proteção contra mecanismos deletérios, como o dano a biomoléculas e a liberação de mediadores inflamatórios.

Palavras-chave: Mucopolissacaridose tipo II; Estresse oxidativo; Inflamação; Terapia de reposição enzimática; Espécies reativas de nitrogênio.

ABSTRACT

Effects of long-term enzyme replacement therapy on oxidative stress and inflammation in patients with mucopolysaccharidosis type II

Mucopolysaccharidosis type II (MPS II) is a lysosomal storage disorder, caused by a deficient degradation of the glycosaminoglycans (GAGs) heparan sulfate and dermatan sulfate, due to a deficient activity of the enzyme iduronate-2-sulfatase. The main treatment for MPS II is the administration of the recombinant enzyme, in a process known as enzyme replacement therapy (ERT). Previous studies from our group showed a possible protective role of ERT against oxidative stress during the first six months of treatment. Considering that this process, as well as inflammation, seem to be involved on MPS II pathogenesis, the aim of this study was to investigate the effect of long-term ERT upon several biomarkers of inflammation and oxidative stress in MPS II patients. It was analyzed plasma, erythrocyte and urine samples from MPS II patients (n=9) and from age- and sex-matched controls (n=10). The mean time on ERT was 4.6 years. Patients presented an increase of the two lipid peroxidation markers that were analyzed – thiobarbituric acid-reactive substances plasmatic content and 15-F2t-isoprostanes urine concentration. The results indicated some degree of protein oxidative damage, determined by di-tyrosine measurement in urine. However, there were no alterations on plasmatic carbonyl and sulfhydryl content. Our results also showed that there are higher contents of reactive nitrogen species (RNS) in plasma and urine of MPS II patients than in controls. It was measured the plasmatic concentrations of interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α), and both were found increased compared to control group. No significant differences of enzymatic and non-enzymatic defenses were observed between groups. Urinary GAGs levels were found higher in patients than in controls. Moreover, it was verified positive correlations between GAGs levels and carbonyl, di-tyrosine, and nitrate/nitrite contents. These facts show a possible relation of GAGs on RNS production and damage to biomolecules. Furthermore, IL-1 β concentration was found correlated to TNF- α and nitric oxide levels. All together, these results show that ERT is able to provide some protection against protein oxidation and antioxidant defenses alterations. On the other hand, lipid peroxidation, inflammation, GAGs levels and RNS production do not seem to improve during ERT, not even under long-

term ERT. Considering these facts, it is suggested that new therapeutical approaches for MPS II, in combination with ERT, can be promising and should be investigated, in order to increase the protection against some deleterious mechanisms like inflammation and biomolecules damage.

Keywords: Mucopolysaccharidosis type II; Oxidative stress; Inflammation; Enzyme replacement therapy; Reactive nitrogen species.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AMPK – proteína serina/treonina quinase ativada por AMP
- CAT – catalase
- CD14 – do inglês *cluster of differentiation 14*
- CD44 – do inglês *cluster of differentiation 44*
- CuZnSOD – superóxido dismutase contendo zinco e cobre
- di-Tyr – di-tirosina
- DKO – duplo-*knockout*
- DLDs – doenças lisossômicas de depósito
- DNA – ácido desoxirribonucleico
- EIM – erros inatos do metabolismo
- ERN – espécies reativas de nitrogênio
- ERO – espécies reativas de oxigênio
- GAGs – glicosaminoglicanos
- GM-CSF – do inglês *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*
- GPx – glutathione peroxidase
- GR – glutathione reductase
- GSH – glutathione reduzida
- GSSG – glutathione oxidada
- H₂O – água
- H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
- I2S – iduronato-2-sulfatase
- IFN-γ – interferon-γ
- IL-10 – interleucina-10
- IL-1β – interleucina-1β
- IL-6 – interleucina-6
- iNOS – óxido nítrico sintase induzível
- LBP – do inglês *LPS-binding protein*
- LPS – lipopolissacarídeo
- MDA – malondialdeído
- MIP-1α – do inglês *macrophage inflammatory protein-1α*
- MnSOD – superóxido dismutase contendo manganês

MPSs – mucopolissacaridoses
MyD88 – do inglês *myeloid differentiation factor-88*
NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato reduzida
NF-κB – fator nuclear *kappa-B*
NO• – óxido nítrico
Nox – NAD(P)H oxidase
Nrf-2 – fator nuclear eritroide-2
O₂ – oxigênio molecular
O₂^{•-} – radical superóxido
O₂¹ – oxigênio *singlet*
OH• – radical hidroxil
ONOO• – peroxinitrito
RL – radicais livres
SOD – superóxido dismutase
TAS – status antioxidante total
TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCTH – transplante de células-tronco hematopoéticas
TLR4 – do inglês *Toll-like receptor 4*
TNF-α – fator de necrose tumoral-α
TRE – terapia de reposição enzimática

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	
I.1. Erros inatos do metabolismo	17
I.1.1. Doenças lisossômicas de depósito	18
I.1.1.1. Mucopolissacaridoses	18
I.1.1.1.1. Mucopolissacaridose tipo II	22
I.1.1.1.1.1. A terapia de reposição enzimática no tratamento da MPS II	24
I.2. Radicais livres e estresse oxidativo	26
I.2.1. Estresse oxidativo e inflamação em MPSs	29
II. OBJETIVOS	
II.1. Objetivo geral	33
II.2. Objetivos específicos	33
III. RESULTADOS	
III.1. Capítulo 1 – Artigo 01	35
IV. DISCUSSÃO	77
V. CONCLUSÕES GERAIS	89
VI. PERSPECTIVAS	91
VII. REFERÊNCIAS	93
VIII. ANEXOS	
VIII.1. Anexo 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido para pacientes MPS II	105
VIII.2. Anexo 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido para indivíduos controle	108
VIII.3. Anexo 3 – Carta de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa	111
VIII.4. Anexo 4 – Comprovante de submissão do Artigo 01	112

I. INTRODUÇÃO

I.1. Erros Inatos do Metabolismo

Os erros inatos do metabolismo (EIM) correspondem a um grande grupo de distúrbios genéticos hereditários, causados pela síntese alterada de uma proteína – geralmente uma enzima – envolvida em alguma via do metabolismo. Esta alteração ocasiona um bloqueio parcial ou total da rota metabólica em questão, levando a um acúmulo dos substratos da etapa anterior à interrompida e à diminuição da síntese dos produtos. Ainda, vias metabólicas alternativas podem ser ativadas, em um mecanismo compensatório que vise a diminuir as concentrações dos substratos acumulados e/ou aumentar a concentração dos produtos. Dependendo da importância da via afetada pelo EIM, a repercussão clínica no indivíduo afetado pode variar, geralmente apresentando sintomatologia grave, e muitas vezes letal (Scriver et al. 2001)

Individualmente, a frequência dos EIM é baixa; entretanto, em conjunto, atingem um a cada 1000 nascidos, e correspondem a 10% de todas as doenças genéticas (Jimenez-Sanchez et al. 2001; Scriver et al. 2001). O padrão de herança dos EIM pode ser autossômico recessivo – o que ocorre para a maioria das doenças –, autossômico dominante, ou ligado ao cromossomo X (Regateiro 2003).

Tradicionalmente, os EIM são classificados de acordo com o tipo de biomolécula que tem seu metabolismo afetado, por exemplo: EIM de glicídios, de aminoácidos, de ácidos orgânicos, de glicosaminoglicanos, de lipídios, etc. (Scriver et al. 2001). Já na classificação proposta por Saudubray e Charpentier (2001), os EIM são agrupados em três grandes classes:

- 1) Distúrbios no catabolismo de moléculas complexas: como por exemplo, as doenças lisossômicas de depósito e as doenças peroxissomais;
- 2) Distúrbios com déficit energético: como nas doenças da cadeia transportadora de elétrons, defeitos na oxidação de ácidos graxos e defeitos na gliconeogênese;
- 3) Erros inatos do metabolismo intermediário: distúrbios que levam à intoxicação aguda ou crônica em função do acúmulo de substratos tóxicos.

Enquadram-se nesta classificação as aminoacidopatias e as acidemias orgânicas, por exemplo.

Este trabalho é focado em um EIM dos glicosaminoglicanos, sendo, portanto, classificado como um distúrbio do catabolismo de moléculas complexas, mais especificamente um doença lisossômica de depósito.

I.1.1. Doenças Lisossômicas de Depósito

As doenças lisossômicas de depósito (DLDs) são um grupo de EIM, o qual é integrado por aproximadamente 50 doenças, nas quais há uma deficiência parcial ou total da atividade de uma enzima lisossomal específica, acarretando no acúmulo de macromoléculas complexas não-metabolizadas dentro da organela. As enzimas deficientes nas DLDs podem ser integrantes de vias catabólicas de esfingolipídios, glicosaminoglicanos, colesterol, glicoproteínas, etc. (Ballabio e Gieselmann 2009; Hartung et al. 2004; Futerman e van Meer 2004).

Da mesma maneira que os EIM como um todo, a incidência isolada das DLDs é baixa; em conjunto, estima-se que elas acometam aproximadamente um em cada 8000 nascidos vivos (Fuller et al. 2006; Meikle et al. 1999). No Brasil, Coelho et al. (1997) estimaram uma frequência relativa das DLDs de 59,8% entre pacientes com EIM.

Geralmente, o início dos sintomas nos pacientes com DLDs é mais tardio quando comparado a doenças do metabolismo intermediário, como aminoacidopatias e acidemias orgânicas. Apesar de o acúmulo intralisossomal de macromoléculas se iniciar ainda na vida intrauterina, as manifestações clínicas da DLD tornam-se mais evidentes por volta dos dois anos de vida, evoluindo em curso progressivo, crônico, e com alta morbidade e mortalidade (Futerman e van Meer 2004; Mabe et al. 2003). A grande variação fenotípica, característica dos EIM, também está presente nas DLDs; porém, de um modo geral, alterações ósseas, cartilaginosas, oculares e neurológicas são comuns à maioria das doenças deste grupo (Parenti et al. 2013; Futerman e van Meer 2004).

I.1.1.1. Mucopolissacaridoses

Dentre as DLDs, as mucopolissacarídeos (MPSs) representam um subgrupo de doenças caracterizadas pela deficiência em uma das 11 enzimas da rota de degradação dos glicosaminoglicanos (GAGs). Integrantes da matriz extracelular – ligados a um núcleo proteico, formando, então, os proteoglicanos –, os GAGs são cadeias polissacarídicas longas e lineares, formadas por unidades dissacarídicas repetidas. Devido a sua estrutura química ser altamente polar e eletricamente carregada, os GAGs possuem grande capacidade de absorver água, formando matrizes hidratadas nos espaços intercelulares e intersticiais (Esko et al. 2009). Por essa razão, os GAGs eram anteriormente conhecidos como mucopolissacarídeos. O alto caráter hidrofílico dos GAGs faz com que sua presença na constituição dos proteoglicanos seja crucial para a manutenção da conformação característica dos tecidos, assim como de sua elasticidade. Os principais tipos de GAGs são: heparan sulfato, dermatan sulfato, condroitin 6-sulfato, queratan sulfato, heparina e ácido hialurônico, conforme representados na Figura 1.

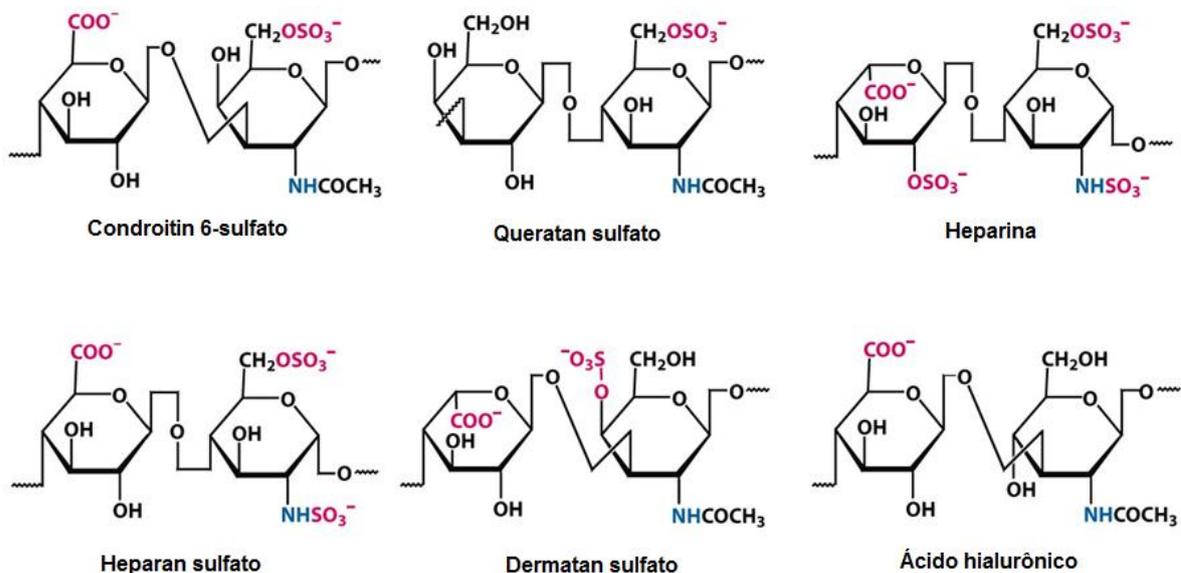


Figura 1. Estrutura química dos GAGs (adaptado de Berg et al. 2006).

Com exceção do ácido hialurônico, os GAGs que chegam ao lisossomo são produtos de degradação dos proteoglicanos. Após a clivagem proteolítica, os GAGs são separados do *core* proteico dos proteoglicanos presentes na matriz extracelular e internalizados pela célula, alcançando, por fim, o lisossomo (Neufeld e Muenzer 2001). Dentro da organela, os GAGs são metabolizados a monossacarídeos e sulfato

inorgânico através de diferentes vias, cuja catálise se dá por 11 enzimas distintas, dentre glicosidases, sulfatases e hidrolases (Coutinho et al. 2012; Neufeld e Muenzer 2001). A ausência ou deficiência da atividade de uma delas ocasiona um acúmulo intralisossomal de moléculas de GAGs não completamente degradadas, provocando um aumento do tamanho e do número de lisossomos dentro da célula (Futerman e van Meer 2004). A deficiência em um dos passos da via catabólica dos GAGs é denominada de MPS.

Clinicamente, as MPSs são classificadas em 13 diferentes fenótipos, de acordo com a enzima deficiente. Apesar disto, este grupo de doenças abriga uma vasta heterogeneidade clínica, havendo, muitas vezes, para uma mesma deficiência enzimática, diferentes sintomatologias e manifestações (Neufeld e Muenzer 2001). A Tabela 1 descreve os 13 tipos de MPSs.

Tabela 1. Classificação das Mucopolissacaridoses (MPSs), com indicação dos glicosaminoglicanos (GAGs) majoritariamente excretados na urina e a respectiva enzima deficiente

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 (Arisulfatase 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.

De caráter crônico e progressivo, as MPSs têm envolvimento multissistêmico, afetando principalmente os sistemas ósseo e cardiopulmonar, a pele, a córnea, o baço, o fígado, o cérebro e as meninges. As principais manifestações clínicas presentes em indivíduos com MPS incluem aumento do perímetro cefálico, mãos em garra, caracteres faciais grosseiros característicos de doença de depósito, baixa estatura, cardiomiopatia, organomegalia, diminuição da acuidade visual, infecções respiratórias de repetição, e comprometimento neurológico (Neufeld e Muenzer 2001).

A frequência estimada das MPSs em conjunto é de 1:25.000 a 1:10.000 nascidos vivos, sendo que a MPS I e MPS III parecem ser as mais frequentes dentre todos os tipos (Poupětová et al. 2010; Fuller et al. 2006; Baehner et al. 2005; Pinto et al. 2004; Nelson et al. 2003; Poorthuis et al. 1999; Meikle et al. 1999). No Brasil, um estudo realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre mostrou uma alta frequência das MPSs dentre as DLDs e os EIM no geral, sendo que em conjunto, as MPSs correspondem a 54,5% de todas as DLDs. Ainda, na população analisada, observou-se uma maior frequência das MPSs tipo I e VI, seguido pela MPS II (Vieira et al. 2008; Coelho et al. 1997). Apesar disto, não há dados oficiais com relação à epidemiologia destas doenças no país.

Diversas técnicas diagnósticas são úteis para a identificação de uma MPS. Inicialmente, utilizam-se testes de triagem, que têm como objetivo a quantificação e a identificação de qual tipo de GAG está presente na urina. Devido ao seu caráter altamente hidrofílico, os GAGs são extensamente excretados na via renal; em pacientes com MPS, sua concentração urinária é extremamente alta, sendo um bom marcador para o diagnóstico presuntivo destas doenças. Dentre os testes de triagem, destacam-se a cromatografia em camada delgada, a eletroforese de GAGs, e a quantificação espectrofotométrica a partir da reação dos GAGs com o azul de dimetilmetileno. No entanto, o diagnóstico confirmatório somente é realizado com a medida da atividade enzimática. Utilizando-se substratos cromogênicos ou fluorogênicos, é realizada a medida da atividade da enzima em amostras de fibroblastos, plasma ou leucócitos. Antes dos testes enzimáticos, a eletroforese de GAGs é importante no direcionamento do diagnóstico, pois possibilita a exclusão de outros tipos de MPS de acordo com o GAG majoritariamente excretado na urina. Além destas metodologias, técnicas de biologia molecular também permitem um

12S localiza-se no braço longo do cromossomo X (Xq28) (Berg et al. 1968), e mais de 300 alterações mutacionais distintas já foram detectadas neste gene, o que, em parte, explica a grande heterogeneidade clínica apresentada por estes pacientes (Froissart et al. 2007; Neufeld e Muenzer 2001; Wraith et al. 1991). Diferentemente de outras doenças genéticas com herança ligada ao cromossomo X (p. ex. Doença de Fabry e a Adrenoleucodistrofia ligada ao X), a MPS II acomete quase que exclusivamente indivíduos do sexo masculino, sendo as mulheres portadoras do gene alterado, via de regra, assintomáticas para a doença. Os relatos constantes na literatura a respeito de portadoras manifestando o fenótipo desta desordem sugerem, principalmente, defeitos no processo de inativação do cromossomo X e/ou mutações *de novo* no gene codificante da enzima (Guillén-Navarro et al. 2013; Piña-Aguilar et al. 2013; Tuschl et al. 2005; Clarke et al. 1991).

Epidemiologicamente, a MPS II é considerada uma das MPSs mais frequentes a nível mundial, com incidências aproximadas variando de 1:232.000 a 1:92.000 nascimentos (Poupětová et al. 2010; Baehner et al. 2005; Pinto et al. 2004; Nelson et al. 2003; Meikle et al. 1999; Poorthuis et al. 1999). No Brasil, estima-se que de 25% a 38% dos casos de MPS diagnosticados no país são de MPS II (Vieira et al. 2008; Coelho et al. 1997).

As manifestações clínicas da MPS II são bastante variáveis, e os pacientes apresentam um amplo espectro de sintomas, gravidade e progressão da doença. Ainda assim, as alterações mais comuns encontradas nos indivíduos afetados incluem: baixa estatura, face grosseira, infecções respiratórias recorrentes, mãos em garra, contraturas articulares, deformações esqueléticas generalizadas e retardo mental (Neufeld e Muenzer 2001; Young et al. 1982). Didaticamente, a MPS II pode ser classificada em dois subtipos: MPS II A (ou Hunter A), que é a forma grave da doença, com início dos sintomas por volta dos dois anos de vida, e normalmente cursando com retardo mental severo; e MPS II B (ou Hunter B), que é considerada a forma atenuada, caracterizada retardo mental leve ou ausente, e por um início mais tardio e com maior sobrevivência dos pacientes – normalmente até a terceira década de vida (Hamano et al. 2008; Young et al. 1982). Embora exista esta classificação com base em dados clínicos, a MPS II deve ser considerada como um espectro contínuo de fenótipos entre estes dois extremos, haja vista a grande heterogeneidade clínica manifestada pelos pacientes. Em face disto, Vieira et al. (2008) mostraram que

dentre pacientes MPS I, MPS II, MPS IVA e MPS VI, os portadores de MPS II são os que têm maior atraso no diagnóstico da doença, com uma idade média de quase oito anos – comparado a 6,3 anos para as MPS I e IVA e 4,3 anos para a MPS VI. A heterogeneidade clínica, portanto, pode ser um dos fatores que explica o atraso no estabelecimento de um diagnóstico da doença.

1.1.1.1.1. A terapia de reposição enzimática no tratamento da MPS II

A terapia de reposição enzimática (TRE) consiste na administração intravenosa da forma recombinante da enzima deficiente no portador da doença. Atualmente, já há TRE para diversas DLDs, incluindo as MPSs I, II, IVA, VI e outras, como a doença de Gaucher, doença de Fabry e doença de Pompe (Shemesh et al. 2015; Nilsson et al. 2015; Ohashi 2012; Tomatsu et al. 2011; Bagewadi et al. 2008; Eng et al. 2001). Antes do advento da TRE para o tratamento de DLDs, as estratégias terapêuticas empregadas consistiam apenas de medidas farmacológicas paliativas, fisioterapia, intervenções cirúrgicas, e demais cuidados suportivos que visassem a melhorar a qualidade de vida e aumentar a sobrevida dos pacientes.

Após administrada – em frequências que variam de semanais e quinzenais, normalmente –, a enzima lisossomal recombinante chega ao interior do lisossomo através de ligações específicas com receptores de manose ou manose-6-fosfato presentes tanto na membrana plasmática como na membrana lisossomal (Sly 1985). A Figura 3 representa o mecanismo de internalização celular e lisossomal da enzima administrada pela TRE.

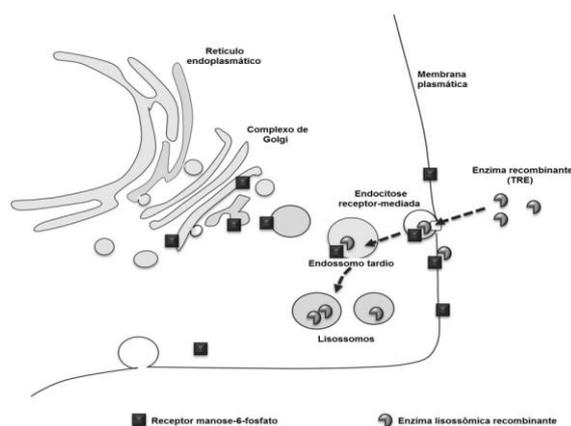


Figura 3. Mecanismo de internalização da enzima recombinante administrada na TRE (adaptado de Parenti et al. 2013).

Há relatos na literatura de que pacientes com MPS I apresentaram melhoria significativa na função respiratória e na capacidade física após a administração de laronidase (α -L-iduronidase) (Giugliani et al. 2009; Germain 2005; Kakkis et al. 2001). Além disso, Kakkis et al. (2001) também verificaram uma redução de 25% na hepatoesplenomegalia e de 80% nos níveis de GAGs urinários em pacientes MPS I submetidos à TRE. Em pacientes com MPS II, a TRE também se mostrou eficaz no que concerne a função respiratória, no teste de caminhada de seis minutos, e redução do volume de fígado e baço (Okuyama et al. 2010; White et al. 2010; Wraith et al. 2008; Muenzer et al. 2007; Muenzer et al. 2006). Em pacientes com MPS VI, a administração de arilsulfatase B reduziu significativamente os níveis de dermatan sulfato, melhorou sua função respiratória e sua capacidade física (Harmatz et al. 2008).

O medicamento idursulfase (Elaprase[®], *Shire Human Genetic Therapies*, MA, Estados Unidos) foi aprovado para o tratamento da MPS II no Brasil em 2008, e desde então, vem sendo utilizado como terapia de escolha para esta doença. Em uma dose recomendada de 0,5 mg/kg, a TRE é administrada via infusão intravenosa lenta em uma frequência usualmente semanal (Okuyama et al. 2010; Muenzer et al. 2007; Muenzer et al. 2006). O uso da idursulfase vem, ao longo do tempo, demonstrando ser seguro, com eventos adversos de fácil manejo e sem grandes riscos ao paciente (Alegra et al. 2013; Muenzer et al. 2011; Muenzer et al. 2006). Estudos recentes mostram, ainda, dados sobre a segurança da administração da TRE para pacientes MPS II com menos de cinco (Giugliani et al. 2014) e menos de um ano de idade (Lampe et al. 2014).

A maior desvantagem dos tratamentos com TRE é o fato de a enzima administrada não ser capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (Burrow et al. 2007). No caso de pacientes MPS II neuronopatas, a ausência de ação farmacológica da idursulfase no sistema nervoso central impossibilita uma melhora dos danos neurológicos causados pelo acúmulo de GAGs no tecido encefálico. Ainda, em uma revisão publicada pela *Cochrane Corporation* avaliando os testes clínicos acerca da TRE para a MPS II, os autores consideraram que há falta de maiores evidências comprovando a eficácia do tratamento com idursulfase (da Silva et al. 2016). Dentro dos critérios de inclusão por eles estabelecidos, os autores consideraram apenas um estudo (envolvendo 96 pacientes) (Muenzer et al. 2006).

Tendo isto em vista, o trabalho concluiu que, apesar de serem reconhecidas melhoras em parâmetros como o teste de caminhada de seis minutos e a redução da excreção urinária de GAGs, não há evidências disponíveis na literatura que o tratamento com TRE reduza complicações da doença relacionadas à qualidade de vida e à mortalidade, incluindo comorbidades como apneia do sono e cardiopatias. Ainda, os autores sugerem a necessidade de mais estudos, principalmente a respeito dos benefícios e da segurança do uso a longo prazo da TRE (da Silva et al. 2016). Além disto, sabe-se que a redução na excreção de GAGs induzida pela TRE é significativa, porém normalmente não alcança os níveis de indivíduos saudáveis, tanto em pacientes MPS II como em pacientes MPS IVA (Donida et al. 2015; Negretto et al. 2014).

I.2. Radicais livres e estresse oxidativo

Radicaís livres (RL) são estruturas químicas com um elétron desemparelhado no seu último orbital, ou seja, ocupando um orbital atômico sozinho, o que confere uma alta reatividade à molécula. Em nosso organismo são produzidos RL de carbono, enxofre, nitrogênio (espécies reativas de nitrogênio, ou ERN) e oxigênio (espécies reativas de oxigênio, ou ERO), sendo estas últimas as que ganham maior destaque devido à sua alta reatividade e aos danos gerados às biomoléculas. As ERO podem ser produzidas por fontes exógenas – tais como a radiação, cigarro, solventes orgânicos, paraquat e paracetamol – e por fontes endógenas, através de processos como a degradação de ácidos graxos, a fagocitose, citocromo P450 e cadeia transportadora de elétrons. O termo ERO é utilizado tanto para RL de oxigênio, como o superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxil (OH^{\bullet}) e o oxigênio singlet (O_2^1), quanto para alguns não-radicaís capazes de gerar RL, como por exemplo, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que pode produzir o OH^{\bullet} (Ramos-Vasconcelos et al. 2000; Halliwell e Gutteridge 2007).

Em condições fisiológicas, o metabolismo aeróbio realiza a redução tetravalente completa de aproximadamente 95% do oxigênio molecular (O_2), formando quatro moléculas de água (H_2O) no passo final da cadeia transportadora de elétrons. Apesar disto, há a constante formação de intermediários reativos como

o $O_2^{\bullet-}$ durante o processo de respiração celular (Halliwell e Gutteridge 2007). É importante enfatizar que durante certos processos patológicos – como infecções, por exemplo – a produção de ERO e ERN pode se intensificar, muitas vezes como um próprio mecanismo de defesa do organismo contra ataques de um microrganismo invasor (Zablocka e Janusz 2008; Maxwell 1995).

As ERN, principalmente representadas pelo óxido nítrico (NO^{\bullet}) são outros representantes dos RL, que têm grande importância no estudo do estresse oxidativo. Majoritariamente produzido pela enzima óxido nítrico sintase, o NO^{\bullet} *per se* é um fraco agente oxidante; contudo, após reação não-enzimática com o $O_2^{\bullet-}$, pode haver a formação de peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$), uma molécula altamente reativa, com forte capacidade de oxidar lipídios e em resíduos tiólicos proteicos, bem como causar nitração em resíduos de tirosina (Lancaster 2006; Giulivi et al. 1998; Pryor et al. 1994).

Em condições fisiológicas, a produção de espécies reativas é eficientemente neutralizada pelos sistemas antioxidantes do organismo. A definição clássica para o termo antioxidante é a de qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações em relação a um substrato oxidável, significativamente diminui ou previne a oxidação deste substrato. As defesas antioxidantes que atuam em sistemas biológicos são compostas por antioxidantes não-enzimáticos e antioxidantes enzimáticos. Nos primeiros estão incluídas as vitaminas (como p. ex., A, C e E), a glutathiona reduzida (GSH), os carotenóides, proteínas ligantes de metal (transferrina, ferritina), dentre outros. Os antioxidantes não enzimáticos podem atuar de diversas maneiras, por exemplo, através da remoção do oxigênio presente no meio, como detoxificadores/sequestradores de RL, quelantes de íons metálicos e reparadores de lesão (Halliwell e Gutteridge, 2007). Já, entre os antioxidantes enzimáticos, podem-se citar as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR). A SOD é uma enzima que catalisa a dismutação de duas moléculas de $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 e O_2 . Em eucariotos, duas isoformas são predominantes: SOD contendo zinco e cobre (CuZnSOD, ou SOD 1) e SOD contendo manganês (MnSOD, ou SOD 2). O H_2O_2 resultante da reação catalisada pela SOD pode ser eliminado pela reação da CAT e da GPx. A primeira é uma hemoproteína encontrada nos peroxissomos e realiza a

decomposição de duas moléculas de H_2O_2 em duas moléculas de H_2O e O_2 (Halliwell e Gutteridge 2007; Chance et al. 1979); a segunda – presente em animais, vegetais, e em muitas bactérias aeróbias e encontrada sob a forma de dois diferentes tipos: dependente de selênio e não-dependente de selênio – catalisa a redução do H_2O_2 a H_2O utilizando os grupamentos sulfidrila de duas moléculas de GSH como doadora de elétrons, formando, em seguida, uma molécula de glutationa oxidada (GSSG) (Halliwell e Gutteridge 2007; Matés e Sánchez-Jiménez 1999; Wendel 1981). A GSSG formada – tanto a proveniente da reação da GPx como da atuação como *scavenger* da GSH – é regenerada pela GR, que utiliza como cofator redutor uma molécula de nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato reduzida (NADPH) e converte uma molécula de GSSG em duas de GSH (Halliwell e Gutteridge 2007). A GSH – e mais importante, a razão entre sua forma reduzida e oxidada – é uma das principais forças redutoras no ambiente celular, sendo também um indicador de quando um desequilíbrio redox está ocorrendo no organismo (Schafer e Buettner 2001). As reações enzimáticas acima descritas estão resumidamente ilustradas na Figura 4.

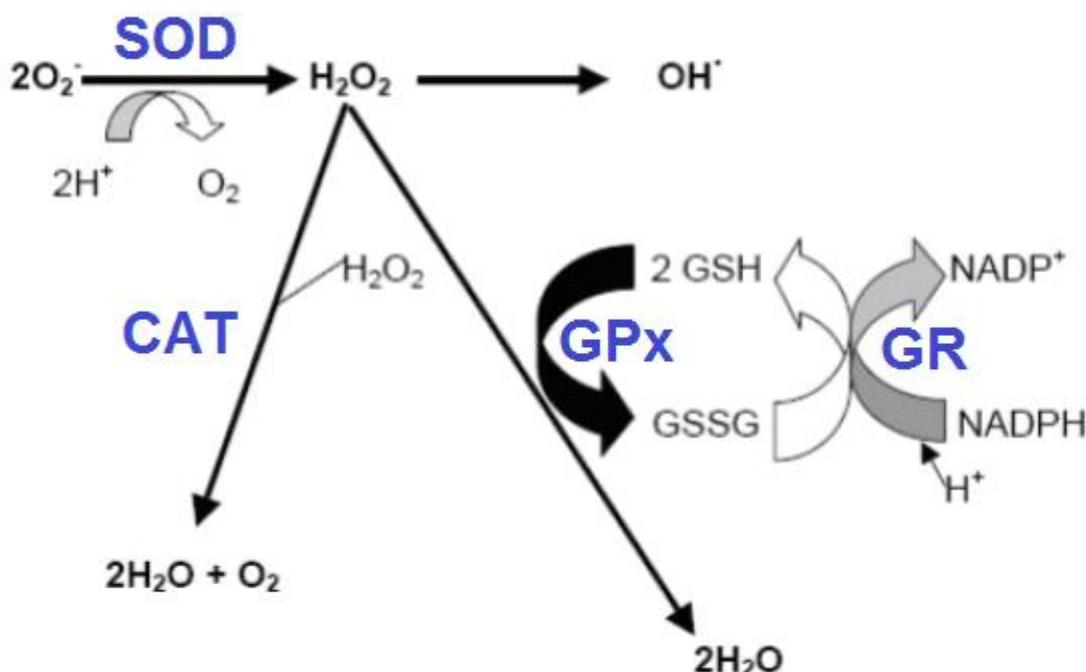


Figura 4. Ilustração esquemática das principais enzimas antioxidantes (adaptado de Marks et al. 1996)

De uma forma geral, portanto, o sistema de defesa antioxidante atua convertendo as espécies reativas em derivados inativos. Entretanto, em situações patológicas, pode ocorrer o aumento da produção de RL e/ou uma diminuição da capacidade do sistema antioxidante, gerando uma condição conhecida como estresse oxidativo. Entre as principais consequências do estresse oxidativo estão: peroxidação das membranas celulares, oxidação de proteínas, lesões ao DNA e ao RNA. O dano oxidativo aos lipídios de membrana pode alterar sua fluidez e permeabilidade, o que acarreta em alterações no metabolismo homeostático celular. A oxidação de proteínas pode levar à alteração da estrutura conformacional proteica, alterando sua função e atividade – no caso de enzimas. Já lesões aos ácidos nucleicos – principalmente o DNA – têm o potencial de causar mutações, o que, secundariamente, pode ser um fator importante no aparecimento de doenças, tais como câncer e doença de Parkinson (Halliwell e Gutteridge 2007; Ramos-Vasconcelos et al. 2000; Beckman e Ames 1998).

I.2.1. Estresse oxidativo e inflamação em MPSs

O estresse oxidativo vem sendo associado a diversas doenças neurodegenerativas, crônico-inflamatórias, em diversos tipos de câncer (Halliwell e Gutteridge 2007; Dröge 2002), e também em diferentes EIM, como fenilcetonúria (Rocha e Martins 2012; Vargas et al. 2011; Sitta et al. 2009), acidemia glutárica (Latini et al. 2003), adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X (Rockenbach et al. 2012), e também em DLDs, como a doença de Fabry (Biancini et al. 2012), doença de Gaucher (Deganuto et al. 2007; Roversi et al. 2006) e em diferentes MPSs. Apesar de os mecanismos causadores das alterações do estado redox em EIM não serem completamente elucidados, acredita-se que o acúmulo dos metabólitos tóxicos seja o principal responsável pela exacerbação na produção de RL e ERO/ERN (Ribas et al. 2010; Barschak et al. 2006).

Em modelos animais, alguns trabalhos sobre os mecanismos fisiopatológicos das MPSs foram publicados nos últimos anos. Em 2007, Villani et al. mostraram pela primeira vez, uma possível relação do estresse oxidativo e da inflamação com os efeitos deletérios induzidos pela MPS IIIB. Neste estudo realizado em camundongos jovens, os autores demonstraram um aumento da expressão de genes componentes

da NAD(P)H oxidase (Nox), bem como da sua atividade enzimática. A Nox uma enzima produtora de $O_2^{\bullet-}$ e considerada uma das maiores fontes de ERO durante estados inflamatórios (Villani et al. 2009). No mesmo trabalho, também foi possível verificar um *upregulation* de genes envolvidos na apoptose e na inflamação, como os genes *Casp11* (codificante da caspase 11) e *Ccl3* [(codificante da proteína inflamatória de macrófago-1 α (MIP-1 α)). Por outro lado, foi encontrado um aumento da produção de interleucina-10 (IL-10), uma citocina anti-inflamatória que, possivelmente, encontra-se aumentada em um mecanismo compensatório, visando a diminuir o estado inflamatório induzido pela ativação microglial. Em 2009, outro estudo mostrou um aumento da peroxidação lipídica, oxidação proteica e dano ao DNA em cerebelo de camundongos MPS IIIB (Villani et al. 2009).

Reolon et al. (2009), utilizando um modelo animal de MPS I, demonstraram um aumento da atividade de SOD em cerebelo, pulmão, diafragma, fígado e rins e um aumento de CAT em cerebelo, pulmão e baço. Adicionalmente, estes autores descreveram dano oxidativo a proteínas, pela quantificação de grupamentos carbonila, em coração, baço e cerebelo de ratos MPS I. Os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) – um marcador de lipoperoxidação – foram significativamente menores no cerebelo dos ratos afetados em comparação com o controle. Os autores sugeriram que, possivelmente, as enzimas antioxidantes SOD e CAT não foram capazes de prevenir o dano proteico verificado nos tecidos cardíaco e esplênico, enquanto que essa compensação pode ter ocorrido nos outros tecidos. No cerebelo, a elevação das duas enzimas foi capaz de diminuir o dano lipídico basal, mas não o dano proteico. Os resultados apresentados neste trabalho indicam um desbalanço oxidativo em modelo animal de MPS I.

Em pacientes portadores de MPS I, foi demonstrado um aumento da lipoperoxidação antes da TRE e durante as primeiras 24 semanas de tratamento em comparação a indivíduos saudáveis. Além disso, foi visto um aumento da atividade da CAT durante o tratamento em comparação com o período prévio ao mesmo. Apesar disto, não houve efeito de diminuição do estresse oxidativo com relação ao dano lipídico (Pereira et al. 2008).

Donida et al. (2015), em um estudo com pacientes MPS IVA em tratamento com TRE (média de tempo de 32 semanas), foram encontradas alterações em

diversos marcadores de estresse oxidativo e também de inflamação. Os autores verificaram uma diminuição do conteúdo de GSH em eritrócitos e de grupamentos tióis totais em plasma, bem como um aumento da excreção urinária de dímeros de di-tirosina (di-Tyr) – um marcador de oxidação proteica – e de isoprostanos – produto da peroxidação lipídica – na urina dos pacientes sob tratamento. Além disso, o estudo mostra um maior nível de dano oxidativo ao DNA nos pacientes em comparação aos controles, evidenciado através do ensaio cometa com a enzima de reparo endonuclease III e dos níveis de 8-hidróxi-2'-desoxiguanosina na urina – sendo este um produto oriundo do ataque oxidativo a purinas. Com relação a marcadores inflamatórios, foi verificado um aumento da concentração plasmática da citocina pró-inflamatória interleucina-6 (IL-6), evidenciando a ocorrência de um status inflamatório nos pacientes MPS IVA sob TRE. Além disso, a concentração de IL-6 foi negativamente correlacionada com o conteúdo eritrocitário de GSH. Esses resultados demonstraram um desequilíbrio redox, dano a biomoléculas e inflamação em pacientes MPS IVA sob TRE, e demonstram uma ligação entre os estados de estresse oxidativo e inflamatório nestes pacientes.

No que concerne a MPS II, três trabalhos foram publicados nos últimos anos. Filippon et al. (2011a) realizaram um acompanhamento de pacientes portadores de MPS II antes e durante os seis primeiros meses sob tratamento com TRE. Foi verificado que há um aumento dos níveis de lipoperoxidação e de oxidação a proteínas antes e durante a TRE nos pacientes MPS II, verificado através da medida do conteúdo de malondialdeído (MDA, produto final da cascata de lipoperoxidação), de grupamentos carbonilas e sulfidrilas (marcadores do status redox de proteínas, principalmente). Ainda assim, com quinze dias de TRE, foi verificada uma diminuição significativa da concentração plasmática de MDA e um aumento do conteúdo de sulfidrilas com relação ao pré-tratamento. Apesar destas alterações proporcionadas pela TRE, nenhum destes marcadores foi restaurado a valores comparáveis aos do grupo controle. Na mesma linha, o status antioxidante total (TAS) medido em plasma encontrava-se diminuído antes e durante os cinco primeiros meses de TRE; essa alteração, porém, foi restaurada a níveis de controle no sexto mês de tratamento.

Outro parâmetro estudado em pacientes MPS II nos quais a TRE parece ter algum efeito protetor é o dano ao DNA. Filippon et al. (2011b) descrevem um aumento do índice de dano – avaliado através do ensaio cometa alcalino – nos

pacientes antes e durante o tratamento. Com três meses de TRE, foi encontrada uma diminuição do dano em comparação com o momento pré-tratamento; entretanto, ao final do estudo (seis meses de tratamento), os pacientes MPS II tratados ainda apresentavam maiores níveis de dano ao DNA quando comparados a indivíduos controle. Negretto et al. (2014), ainda, demonstraram uma correlação positiva entre os níveis de peroxidação lipídica e de dano ao DNA; com isso, os autores sugerem o estresse oxidativo como a causa do dano ao DNA. Além disso, foi verificado que os pacientes sob TRE tiveram seus índices de lipoperoxidação e dano ao DNA diminuídos, assim como seus níveis de GAG. Estes dados sugerem que, provavelmente, o acúmulo de metabólitos lisossomais esteja relacionado com o estresse oxidativo apresentado por estes pacientes.

II. OBJETIVOS

II.1. Objetivo geral

Considerando o grande número de evidências na literatura sobre o estresse oxidativo e a inflamação nas MPSs, bem como evidências de que a TRE parece ter um efeito protetor contra estes mecanismos deletérios durante períodos iniciais de tratamento, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar o efeito em longo prazo da TRE sobre marcadores de estresse oxidativo e de inflamação em pacientes MPS II, a fim de melhor compreender a fisiopatologia desta doença e o efeito deste tratamento na mesma.

II.2. Objetivos específicos

- a) Avaliar o dano oxidativo a lipídios, através da medida do conteúdo de TBARS no plasma e de 15-F2t-isoprostanos na urina;
- b) Avaliar o dano oxidativo a proteínas, através da medida do conteúdo de grupamentos carbonila e sulfidrilica em plasma e do conteúdo de di-Tyr na urina;
- c) Avaliar as defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas, através da medida da atividade das enzimas SOD, CAT, GPx e GR em eritrócitos, do conteúdo de GSH em eritrócitos e da capacidade antioxidante plasmática;
- d) Avaliar os níveis de ERN, através da medida do conteúdo de NO[•] em plasma e de nitrato e nitrito em urina;
- e) Avaliar marcadores inflamatórios, através da medida da concentração das citocinas pró-inflamatórias interleucina-1 β (IL-1 β) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α);
- f) Quantificar os níveis de GAGs na urina;
- g) Correlacionar os biomarcadores oxidativos, inflamatórios, e os GAGs entre si.

III. RESULTADOS

Os resultados desta dissertação serão apresentados na forma de capítulo referente a um artigo científico.

III.1. Capítulo 1 – Artigo 01: *Oxidative and nitrative stress and pro-inflammatory cytokines in Mucopolysaccharidosis type II patients: effect of long-term enzyme replacement therapy and relation with glycosaminoglycan accumulation*

Este artigo foi submetido ao periódico *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Basis of Disease*.

O texto completo do Capítulo III.1, que no texto integral da dissertação apresentada ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 36-75, foi suprimido por tratar-se de manuscrito ainda em processo de avaliação pelo periódico ao qual o mesmo foi submetido. Consta da descrição dos estudos bioquímicos realizados em pacientes com MPS II realizando TRE. Foi visto que estes indivíduos apresentam diversos desbalanços no status oxidativo, nitrativo e inflamatório, apesar do uso da TRE.

IV. DISCUSSÃO

Estudos relacionando o estresse oxidativo e a inflamação como mecanismos participantes da fisiopatologia de doenças vêm cada vez mais ganhando destaque, incluindo em EIM como as DLDs (Ribas et al. 2012; Biancini et al. 2012; Filippon et al. 2011a; Filippon et al. 2011b; Villani et al. 2009; Pereira et al. 2008). Neste grupo de doenças, o estresse oxidativo pode ter um papel ainda mais central, tendo em vista a suscetibilidade do lisossomo ao estresse oxidativo (Vitner et al. 2004).

Como consequência primária à deficiência enzimática lisossomal observada na MPS II, o acúmulo de GAGs no interior dos lisossomos gera um aumento do tamanho e do número destas organelas na célula (Futerman e van Meer 2004). Desestabilizações nas membranas lisossomais em função de ataques oxidativos podem ocasionar um rompimento das mesmas, com subsequente efluxo do seu conteúdo para o citosol. A liberação de hidrolases ácidas lisossomais, bem como dos metabólitos não-degradados – como os GAGs – e de íons ferro para fora do lisossomo pode ativar diferentes cascatas que culminem na morte celular (Terman e Brunk 2006; Terman et al. 2006; Zhao et al. 2003; Brunk et al. 2001). O ferro, por sua vez, através da reação de Fenton, favorece a formação do altamente reativo OH^{\bullet} , através da cisão homolítica do H_2O_2 (Halliwell e Gutteridge 2007). Ainda, o ferro *per se* é capaz de iniciar e propagar reações de lipoperoxidação, através da conversão de hidroperóxidos lipídicos em outros radicais lipídicos altamente reativos, como peroxila e alcoxila (Halliwell e Gutteridge 2007; Minotti e Aust 1992; Braugher et al. 1986). Desta maneira, a exacerbação na produção de RL e uma baixa nas defesas antioxidantes pode desencadear um ciclo vicioso de estresse oxidativo nas DLDs, como a MPS II.

O processo inflamatório e o estresse oxidativo encontram-se intimamente relacionados entre si. Diversas cascatas de sinalização intracelular podem ser ativadas e inibidas por ação direta de espécies reativas e RL, culminando em um aumento ou diminuição da resposta inflamatória. Por exemplo, resíduos de cisteína da proteína serina/treonina quinase ativada por AMP (AMPK) podem ser diretamente oxidados por ERO – como o H_2O_2 –, o que muda sua conformação, provoca sua auto-fosforilação e, assim, a ativa. A AMPK ativada fosforila diversas outras proteínas, amplificando o sinal inicialmente liberado pelo H_2O_2 . Um dos principais

eventos resultantes da ativação da AMPK é a inibição da degradação e indução da translocação ao núcleo do fator nuclear eritroide-2 (Nrf-2). O Nrf-2 é um fator de transcrição que ativa a expressão de diversos genes com caráter antioxidante e anti-inflamatório. Dentre estes, pode-se citar: as enzimas antioxidantes CAT, a SOD e a hemeoxigenase-1; a expressão de citocinas anti-inflamatórias como a interleucina-10 e a interleucina-1Ra; e enzimas produtoras de NADPH, como a glicose-6-fosfato-desidrogenase e a enzima málica (Olsen et al. 2015; Higdon et al. 2012). Desta maneira, vê-se que, em condições normais, os RL e outras ERO podem atuar como ativadores de respostas antioxidantes e anti-inflamatórias, a fim de preservar a homeostase celular (Valko et al. 2007). Todos estes processos ainda não estão completamente bem elucidados, porém, sabe-se que os níveis de RL e ERO/ERN e a cronicidade do estresse oxidativo são fatores determinantes na ativação de outras vias de sinalização, sendo que um maior status oxidativo e com maior duração tende a ativar vias pró-oxidantes e pró-inflamatórias (Olsen et al. 2015; Marinho et al. 2014; Higdon et al. 2012). Além disso, em condições patológicas, a exacerbação da produção de RL torna-se deletéria, lesando biomoléculas e culminando em morte celular, via necrose ou apoptose (Halliwell e Gutteridge 2007).

A estratégia terapêutica atual de escolha para o manejo da MPS II é a TRE. Ela é capaz de reduzir significativamente os níveis de GAGs no interior do lisossomo – haja vista a diminuição de sua excreção na urina – e, com isso, diminuir alterações sistêmicas observadas nos pacientes, como hepatoesplenomegalia, disfunções respiratórias e dificuldade para andar (Okuyama et al. 2010; White et al. 2010; Muenzer et al. 2007). Entretanto, a TRE não é totalmente eficaz no que concerne a reversão de danos neurológicos – em função de a enzima recombinante não ultrapassar a barreira hematoencefálica – e a normalização dos níveis urinários de GAGs (Donida et al. 2015; Negretto et al. 2014). Além disso, da Silva et al. (2016) reportam a necessidade de estudos clínicos de maior porte que certifiquem a eficácia e a segurança do tratamento com idursulfase, especialmente com relação a seu uso a longo prazo.

Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa com pacientes portadores de diferentes DLDs investigaram diversos biomarcadores de estresse oxidativo e também de inflamação, bem como o efeito da TRE sobre estes parâmetros. Pacientes com doença de Fabry, ainda que submetidos à TRE (média de 24 meses),

apresentaram um aumento em marcadores de dano oxidativo a lipídios e proteínas, diminuição das defesas antioxidantes, e uma maior concentração plasmática de IL-6 e TNF- α . Além disso, os autores verificaram uma correlação positiva entre os níveis de IL-6 e marcadores de dano oxidativo a proteínas e entre os níveis de IL-6 a concentração urinária de globotriaosilceramida – o principal metabólito acumulado na doença de Fabry (Biancini et al. 2012). Donida et al. (2015), em um estudo com pacientes MPS IVA sob tratamento com TRE (média de oito meses) mostraram uma diminuição de defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas, um aumento de marcadores de dano oxidativo a lipídios, proteínas e ao DNA, e também uma maior concentração de IL-6 nos pacientes quando comparados ao grupo controle.

Com relação à MPS II, alguns estudos também realizados em nosso grupo descrevem o efeito da TRE no estresse oxidativo, realizando um acompanhamento dos pacientes antes e durante os seis primeiros meses de tratamento. Nos pacientes MPS II, as defesas antioxidantes não-enzimáticas – que permaneceram reduzidas antes e durante os cinco primeiros meses de tratamento – alcançaram valores normais no sexto mês após o início da TRE. Além disso, foi visto que a TRE pode ter um efeito benéfico no estresse oxidativo, reduzindo alguns marcadores de lipoperoxidação e de dano a proteínas logo após 15 dias de tratamento, e no dano ao DNA após três meses. Entretanto, ao final de seis meses sob TRE, os pacientes ainda apresentavam níveis significativamente maiores destes marcadores quando comparados a indivíduos controle (Filippon et al. 2011a; Filippon et al. 2011b). Desta maneira, torna-se interessante avaliar o efeito da TRE em pacientes que estejam há mais tempo sob tratamento, uma vez que seu efeito protetor contra o estresse oxidativo e a inflamação possa aumentar conforme o tempo de terapia.

No presente trabalho, foi verificado que pacientes MPS II realizando tratamento com TRE por, em média, 4,6 anos, tiveram um aumento dos marcadores plasmáticos e urinários de lipoperoxidação em relação ao grupo controle. Quimicamente, a lipoperoxidação consiste na incorporação de O₂ a um ácido graxo poli-insaturado para produzir um hidroperóxido lipídico como produto inicial. Esta reação pode acontecer através de reações enzimáticas – envolvendo as cicloxigenases e lipoxigenases – e através da peroxidação não-enzimática, que envolve a participação de ERO, ERN, metais de transição e outros RL (Halliwell e Gutteridge 2007). A lipoperoxidação pode ser considerada o evento citotóxico

primário que desencadeia uma sequência de lesões na célula. Entre as alterações desencadeadas pela lipoperoxidação podem-se citar: alterações nas membranas levando a transtornos da permeabilidade, alterando o fluxo iônico e de outras substâncias; alterações do DNA, levando a lesões mutagênicas; e comprometimento dos componentes da matriz extracelular, como proteoglicanos, colágeno e elastina (Halliwell e Gutteridge 2007). Dentre os produtos finais formados pelas cascatas de lipoperoxidação, o MDA, o 4-hidroxinonenal e os isoprostanos são os mais conhecidos, e testes bioquímicos e imunológicos que os quantifiquem são extensamente utilizados como marcadores para avaliação da peroxidação lipídica. Neste estudo, foram avaliados o conteúdo de TBARS em plasma e a concentração de 15-F2t-isoprostanos na urina. A medida de TBARS em amostras biológicas vem sendo utilizada há bastante tempo, e tem como princípio a reação do ácido 2-tiobarbitúrico com o MDA e com outros aldeídos MDA-like (Ohkawa et al. 1979). Já a dosagem de isoprostanos – especificamente o 15-F2t-isoprostano, a molécula mais bem caracterizada dentre os isoprostanos – é considerada um excelente marcador de dano oxidativo a lipídios (Basu 2008). Os isoprostanos são produtos finais da oxidação não-enzimática do ácido araquidônico, e sua concentração pode ser medida em diversos líquidos biológicos (Roberts e Morrow 2000; Lawson et al. 1999). Os pacientes MPS II, ainda que em TRE há longo prazo, apresentaram os níveis dos dois marcadores maiores quando em comparação a indivíduos saudáveis. Corroborando com estes achados, estudos mostram que pacientes MPS I e MPS IVA também possuem maiores níveis de marcadores de peroxidação lipídica, mesmo sob o efeito da TRE (Donida et al. 2015; Pereira et al. 2008). Ainda, em pacientes MPS II, Filippon et al. (2014a) verificaram uma diminuição do conteúdo plasmático de MDA após 15 dias de tratamento em comparação ao período antes do tratamento; porém, a TRE não foi eficaz em normalizar este marcador a níveis de controle mesmo após seis meses de tratamento. Com os presentes resultados, pode-se inferir que a TRE não é capaz, ainda que administrada por longos períodos, de reduzir a lipoperoxidação nos pacientes MPS II. Tendo em vista que há a presença de dano oxidativo a lipídios em outras DLDs como MPS I (Pereira et al. 2008), MPS IVA (Donida et al. 2015), e doença de Fabry (Biancini et al. 2012) mesmo após a TRE, supõe-se que a intensa desestabilização lisossomal – provocada pelo depósito de GAGs na organela, seguida por uma diminuição do seu

tamanho em função da TRE – possa afetar a estrutura e membrana do lisossomo, e isto pode estar relacionado com o aumento das concentrações de TBARS e de isoprostanos na MPS II (Terman et al. 2006; Brunk et al. 2001).

Ainda, no que diz respeito ao dano a biomoléculas, foi observado um aumento do conteúdo de di-Tyr na urina nos pacientes MPS II realizando TRE, e ausência de diferença nos conteúdos de carbonilas e de sulfidrilas em plasma, em comparação ao grupo controle. A oxidação proteica representa sérios danos ao funcionamento fisiológico e bioquímico da célula, uma vez que alterações em sua estrutura primária podem gerar mudanças conformacionais em sua estrutura terciária e quaternária. Em razão disso, proteínas com função enzimática podem sofrer inativação catalítica, bem como receptores e proteínas transportadoras podem ser alteradas e ter suas funções comprometidas (Halliwell e Gutteridge 2007; Halliwell e Whiteman 2004). Além disso, proteínas com sua estrutura alterada podem desencadear processos inflamatórios, em função do reconhecimento da proteína pelo sistema imune como um antígeno (Halliwell e Whiteman 2004).

A formação de carbonilas proteicas acontece após o ataque oxidativo a resíduos de lisina, arginina, treonina e prolina, formando, respectivamente semialdeído aminoácido, semialdeído glutâmico, ácido 2-amino-3-cetobutírico e 2-pirrolidona (Levine et al. 1990). Sua identificação em proteínas é considerada uma alteração oxidativa de difícil reversão, normalmente levando à inativação total ou parcial da proteína, em função da formação de agregados de alto peso molecular. Sua medida em amostras biológicas pode ser, portanto, classificada como um marcador mais estável e precoce de dano proteico (Pan et al. 2008; Dalle-Donne et al. 2006; Cakatay 2005; Dalle-Donne et al. 2003; Levine et al. 1990). Além das ERO e ERN, hidroperóxidos lipídicos, aldeídos formados pela lipoperoxidação, e outras reações catalisadas por íons metálicos podem causar a formação de carbonilas proteicas (Dalle-Donne et al. 2006; Dalle-Donne et al. 2003; Requena et al. 2003). Já os grupamentos sulfidrilas presentes no organismo são, majoritariamente, proteicos; aproximadamente 1/3 está presente em outras moléculas contendo enxofre, como a GSH (Requejo et al. 2010). A oxidação das sulfidrilas proteicas – presentes nos resíduos de cisteína – altera o estado redox da proteína, podendo modificar sua conformação e, por fim, comprometer sua funcionalidade (Halliwell e Gutteridge 2007; Halliwell e Whiteman 2004; Starke-Reed e Oliver 1989). A avaliação destes

dois parâmetros no plasma de pacientes MPS II realizando TRE há aproximadamente quatro anos e meio mostrou que não há alteração no que diz respeito à oxidação proteica. Considerando o estudo de Filippon et al. (2011a), pode-se inferir que um período de tempo maior de TRE confere certa proteção às proteínas contra o ataque por espécies reativas, uma vez que pacientes MPS II após seis meses de tratamento ainda apresentavam maiores níveis de carbonilas e menores níveis de sulfidrilas. No entanto, a análise da excreção urinária de di-Tyr – nunca antes realizada em pacientes MPS II – mostra-nos certo grau de dano oxidativo a proteínas. A oxidação de resíduos adjacentes de tirosina faz com que haja a formação de uma ligação simples, altamente estável, entre os carbonos 3 dos dois resíduos, formando a di-Tyr, que posteriormente é excretada na urina sem sofrer metabolização (McGuire et al. 2009). Em sistemas biológicos, a formação dos dímeros de tirosina é especialmente aumentada por certas espécies reativas, como $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} and $ONOO^{\cdot}$ (Malencik e Anderson 2003). O aumento da excreção de di-Tyr já foi relatada em pacientes com acidemia propiônica e acidemia metilmalônica (Ribas et al. 2012), doença da urina do xarope de bordo (Guerreiro et al. 2015) e também em pacientes MPS IVA submetidos a TRE (Donida et al. 2015).

O radical $ONOO^{\cdot}$ pode estar intimamente ligado à formação de di-Tyr. A formação de $ONOO^{\cdot}$ se dá pela reação entre $O_2^{\cdot-}$ e o NO^{\cdot} . Os resíduos de tirosina, após nitração pelo $ONOO^{\cdot}$ ou pelo radical dióxido de nitrogênio, formam a 3-nitrotirosina e a di-Tyr. A primeira sofre metabolização e é excretada na urina na forma de ácido 3-nitro-4-hidroxifenilacético (Lancaster 2006; Mani et al. 2003). Pode-se inferir, então, que o alto conteúdo de ERN favorece a formação de di-Tyr. De fato, através da dosagem de nitrato e nitrito na urina e de NO^{\cdot} no plasma nos pacientes deste estudo, verificou-se que os mesmos apresentam maiores conteúdos de ERN do que os indivíduos saudáveis. O NO^{\cdot} é formado principalmente pela enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e desempenha papel importante na sinalização celular e na vasodilatação, além de estar envolvido no estresse nitrativo (Giulivi et al. 1998). Diferentes estudos na literatura demonstram o possível envolvimento das ERN e do estresse nitrativo nas MPSs. Villani et al. (2007), em um estudo em camundongos *knockout* para o gene da MPS IIIB, demonstraram um aumento na expressão do gene da iNOS nos tecidos cerebral e cerebelar de animais com um mês de vida. Somado a isto, foi verificado, também, um *upregulation* na expressão

da Nox, o que pode evidenciar um aumento da produção de ONOO[•] na neurodegeneração observada nesta doença. Contudo, na análise de animais com três e sete meses, houve a normalização dos transcritos de iNOS. Isto sugere a participação do ONOO[•] no processo neurodegenerativo da MPS IIIB, principalmente no início do processo fisiopatológico. Outro trabalho relacionando o estresse nitrativo e as MPSs mostra o aumento moderado da expressão da iNOS em cérebro de camundongos com MPS IIIA aos dois, oito e dez meses de vida (Arfi et al. 2011). Por fim, Simonaro et al. (2001), em um trabalho realizado com cultura de condrócitos de ratos e gatos com MPS VI, demonstraram que células deficientes em arilsulfatase B possuem maiores níveis de nitrito – metabólito estável do NO[•] – em comparação a condrócitos saudáveis. Além disso, a incubação de dermatan sulfato – GAG acumulado na MPS VI, e também na MPS II – com condrócitos saudáveis estimulou a formação de ERN em níveis superiores aos alcançados pelo controle positivo – lipopolissacarídeo (LPS). Em células dos animais MPS VI, as concentrações de nitrito alcançadas através da adição de LPS ou de dermatan sulfato foram semelhantes. Apesar do tratamento com TRE, os pacientes analisados apresentavam maiores níveis de NO[•] e de seus metabólitos no plasma e na urina, o que pode, ao menos em parte, explicar os maiores níveis de lipoperoxidação e de oxidação de proteínas quando comparados ao grupo controle. De acordo com estes resultados, verifica-se o envolvimento das ERN na MPS II, em um mecanismo provavelmente desencadeado em função da toxicidade dos GAGs.

Dentre os marcadores de defesas antioxidantes avaliados neste trabalho, não foram encontradas diferenças significativas nos pacientes submetidos à TRE em comparação ao grupo controle. A fim de investigar o papel da MPS II e do uso a longo prazo da TRE nos pacientes sobre as defesas antioxidantes não-enzimáticas, foram analisados os conteúdos de GSH em eritrócitos e a capacidade antioxidante plasmática. A GSH – um tripeptídeo formado pelos aminoácidos glicina, cisteína e ácido glutâmico – é a principal molécula redutora intracelular, de fundamental importância antioxidante. Este composto atua de maneira sinérgica com o ácido ascórbico e o α -tocoferol, sendo fundamental para a manutenção de suas formas reduzidas. Além disso, a GSH é uma molécula *scavenger* de RL, executa funções de proteção de grupamentos sulfidrila de proteínas e é o cofator da enzima antioxidante GPx (Halliwell 2006; Rani e Panneerselvam 2002). Já a medida da capacidade

antioxidante é um método quantitativo para a determinação das substâncias com potencial redutor na amostra avaliada. Desta forma, substâncias como o ácido ascórbico, ferritina, bilirrubina, ceruloplasmina, e a própria GSH são detectadas por esta metodologia, sendo um bom indicador global do status antioxidante não-enzimático (Miller e Rice-Evans 1997; Rice-Evans e Miller 1994). É relatado na literatura que pacientes MPS IVA sob tratamento com TRE (média de 32 semanas) apresentam redução nos conteúdos de GSH eritrocitária (Donida et al. 2015). Em camundongos *knockout* para a MPS IIIB, há uma diminuição da razão GSH/GSSG em cérebro, cerebelo, fígado e baço em comparação a animais saudáveis (Arfi et al. 2011). Por outro lado, Pereira et al. (2008), em um estudo que acompanhou pacientes MPS I durante os primeiros seis meses de tratamento, não observaram reduções significativas no conteúdo de GSH eritrocitária nem antes nem durante a TRE. No presente trabalho, verificou-se que um maior tempo de tratamento com TRE (4,6 anos) colaborou para a manutenção das concentrações intracelulares de GSH, conferindo certa proteção antioxidante aos sistemas biológicos. Com relação à medida global das defesas antioxidantes não-enzimáticas plasmáticas, Filippon et al. (2011a) observaram que pacientes MPS II apresentavam uma diminuição no TAS antes da TRE, e que esse marcador permaneceu diminuído até o quinto mês de tratamento; contudo, ao final do sexto mês a medida do TAS foi restaurada aos níveis de controle. Em consonância com este estudo, verificamos a ausência de alteração na capacidade antioxidante plasmática nos pacientes MPS II sob o efeito a longo prazo da TRE. É possível, portanto, que o acúmulo de GAGs causado pela doença seja diretamente responsável pela diminuição das defesas antioxidantes não-enzimáticas nos pacientes, mas que estes efeitos tóxicos sejam revertidos após maiores tempos sob a TRE.

Na avaliação da atividade de quatro enzimas antioxidantes, verificou-se, também, o efeito protetor da TRE, tendo em vista que não foram verificadas diferenças entre o grupo controle e o grupo de pacientes MPS II por nós estudados em nenhuma das enzimas. Em estudos com pacientes MPS I (Pereira et al. 2008) e MPS II (Filippon et al. 2011a), foi visto um aumento intermitente da atividade da CAT e/ou da SOD ao longo dos seis meses de tratamento em que foram realizadas as análises. Os autores postulam que estas alterações transientes das atividades enzimáticas observadas nos pacientes durante os meses iniciais de tratamento

podem ser devido ao tempo de meia-vida dos eritrócitos, que dura aproximadamente quatro meses. Após a maturação destas células, a síntese de novas enzimas é diminuída (Halliwell e Gutteridge 2007). Tendo em vista que a TRE provoca diversas alterações bioquímicas e estruturais celulares – especialmente no início do tratamento, onde os depósitos lisossômicos de GAGs são maiores –, aumentos ou diminuições nas atividades de enzimas podem demandar mais tempo de tratamento para serem estabilizadas (Pereira et al. 2008). Além das enzimas CAT e SOD, as atividades de duas enzimas envolvidas no metabolismo da GSH – GPx e GR – também foram analisadas no presente trabalho. Corroborando com o resultado encontrado na dosagem de GSH, não foram vistas alterações nas atividades da GR e da GPx. A primeira está diretamente envolvida na regeneração da GSH e na manutenção da razão GSH/GSSG intracelular, convertendo, à custa de NADPH, uma molécula de GSSG em duas de GSH. Já a GPx catalisa a detoxificação do H₂O₂ utilizando o potencial redutor da sulfidril presente na GSH (Halliwell e Gutteridge 2007). A normalidade dos valores observados nas atividades da GPx e da GR e no conteúdo de GSH sugere haver um correto funcionamento do sistema de produção-consumo de GSH nos pacientes MPS II sob longos tempos de TRE.

Com o intuito de avaliar os mecanismos subjacentes à inflamação, foram avaliadas as concentrações plasmáticas das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α , as quais se apresentaram aumentadas no grupo de pacientes MPS II em relação ao grupo controle, ainda que os mesmos estejam sob o tratamento a aproximadamente quatro anos com TRE. Diversos estudos mostram a ocorrência de estados inflamatórios em MPSs, tanto em estudos *in vitro*, em modelos animais, como em pacientes. Trabalhos realizados com cultura de condrócitos e em modelos *in vivo* em camundongos apontam para uma elevada expressão de moléculas inflamatórias e citocinas secundária ao acúmulo de GAGs nas MPSs IIIB, VI e VII (Villani et al. 2009; Simonaro et al. 2008; Villani et al. 2007; Simonaro et al. 2005; Simonaro et al. 2001). De fato, evidências apontam que a ativação de vias inflamatórias ocasionada por GAGs pode ser um fator preponderante na fisiopatologia das MPSs, incluindo a MPS II. Neste contexto, a ativação da via do *Toll-like receptor 4* (TLR4) é um dos mecanismos iniciais que resultam em inflamação (Simonaro et al. 2010; Simonaro et al. 2008). A via “clássica” de ativação do TLR4 envolve o LPS, através de sua interação com o *myeloid differentiation*

factor-88 (MyD88), com a LPS-binding protein (LBP) e com receptores CD14 (Xia et al. 2006). A outra via de ativação do TLR4 é iniciada por fragmentos de hialuronana, gangliosídios, e outros fragmentos oligossacarídicos provenientes da degradação dos proteoglicanos, o que indica o papel dos GAGs nesta via de sinalização celular. Da mesma forma que o LPS, substâncias como a hialuronana e os GAGs ativam a via TLR4 através da ligação com o MyD88 e também com receptores CD44 (Taylor et al. 2007). Ausseil et al. (2008) demonstraram que gangliosídios e fragmentos de heparan sulfato são os principais contribuintes na ativação da via TLR4 em cérebro de camundongos MPS IIIB, e que esta ativação pode ser responsável pela neurodegeneração observada na doença. No centro da cascata desencadeada pela ativação do TLR4 está o aumento da expressão do fator nuclear *kappa*-B (NF- κ B). Este fator é considerado um elemento chave na instauração e manutenção de processos inflamatórios, sendo um forte estimulante da síntese de moléculas como a IL-1 β e o TNF- α (Olsen et al. 2015). Em um estudo comparando camundongos *knockout* para a MPS VII e camundongos duplo-*knockout* (DKO) para a MPS VII e para o gene codificante do TLR4, foi verificado que os animais do grupo DKO apresentaram menores concentrações séricas de TNF- α e menor expressão de NF- κ B do que os animais do grupo que possuía o TLR4 funcional. Além disso, a inativação da via TLR4 nos animais *DKO* diminuiu alterações ósseas, cartilaginosa, e sinoviais (Simonaro et al. 2010). Desta forma, vê-se o papel do processo inflamatório – ativado por GAGs via TLR4 – como um importante mecanismo fisiopatológico nas MPSs.

De encontro a estes fatos, Eliyahu et al. (2011) demonstrou que o uso do fármaco anti-TNF- α *CNTO1081* em associação com TRE foi capaz de corrigir deformidades na cartilagem traqueal, melhorar a mobilidade corporal, restaurar a expressão de colágeno tipo IIA1 em condrócitos, diminuir a expressão de marcadores apoptóticos e a concentração sérica e cartilaginosa de TNF- α em ratos com MPS VI. No grupo de animais aos quais foi administrado apenas a TRE, foram observadas algumas melhoras em parâmetros de mobilidade, atividade motora e nos níveis de TNF- α séricos; porém, a administração concomitante de *CNTO1081* à TRE foi mais efetiva na melhora destes e de outros parâmetros histológicos e bioquímicos analisados. Mais uma vez, a promoção da liberação de marcadores inflamatórios – especialmente o TNF- α – parece ser de suma importância no

processo patogênico das MPSs, principalmente nas implicações ósseo-articulares da doença. Por fim, um estudo recente realizado em pacientes com MPS I, II e VI submetidos à TRE e/ou transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH) mostrou que os níveis de TNF- α estão positivamente correlacionados com os níveis de dor, com a diminuição da função física geral e com limitações sociais implicadas pela doença. Além disso, observou-se não haver diminuição do TNF- α ao longo do tempo de TRE e/ou pós-TCTH (Polgreen et al. 2016). Em nosso estudo, o aumento encontrado das concentrações plasmáticas de TNF- α e IL-1 β nos pacientes MPS II, ainda que realizando TRE há longos períodos, corrobora com os dados constantes na literatura. Mais, reforça-se o papel da inflamação na patogênese e na sintomatologia da MPS II, e sugere-se que o uso de terapias anti-inflamatórias e anti-TNF- α possa ser de suma importância no tratamento desta doença.

Considerando que os níveis urinários de GAGs ainda estavam elevados nos pacientes MPS II sob TRE a longo prazo em comparação com o grupo controle, pode-se supor que os GAGs estão relacionados, pelo menos em parte, com o dano oxidativo e com a inflamação encontrada em pacientes com MPS II. Sabe-se que a TRE é eficaz em reduzir o depósito de GAGs dentro do lisossomo e, por consequência, diminuir sua excreção na urina. Todavia, na maioria das vezes, ela não é capaz de normalizar os valores de GAGs até valores dentro da faixa de referência (Donida et al. 2015; Negretto et al. 2014). Observando-se as correlações positivas encontradas em nosso estudo entre os valores de GAGs e o conteúdo de grupamentos carbonila, di-Tyr e nitrato/nitrito, é possível inferir que o aumento de ERN e, por possível consequência, o aumento de dano oxidativo a proteínas são mecanismos desencadeados pelo acúmulo de GAGs característico da doença. Além disso, outras duas correlações observadas nos permitem relacionar os processos inflamatório e oxidativo que ocorrem nestes pacientes. Sabe-se que ERN como o NO \cdot podem ativar diferentes vias de sinalização e induzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β e o TNF- α (Kobayashi 2010; Jacobs e Ignarro 2003; Connelly et al. 2001), e o aumento da produção de NO \cdot pode ser um fator preponderante na patologia das MPSs. Além disso, a correlação observada entre a IL-1 β e o TNF- α é mais um indicador de que uma alteração inflamatória mais global ocorre nestes pacientes.

Em suma, este trabalho teve a importante contribuição de avaliar o efeito a longo prazo da TRE sobre a inflamação e o dano a biomoléculas em pacientes MPS II. Foi visto que há, nos pacientes, um aumento dos marcadores de lipoperoxidação, de ERN e de inflamação. Além disso, foi verificado um aumento de dano oxidativo proteico através da medida de di-Tyr na urina; todavia, os níveis dos marcadores plasmáticos medidos nos pacientes não se mostraram diferentes do grupo controle. Observamos, também, que não há alterações nos marcadores de defesas antioxidantes (enzimáticas e não-enzimáticas) analisados, o que denota um possível benefício do tratamento de longo prazo com a TRE sobre estas defesas. Por fim, as correlações por nós encontradas entre as concentrações urinárias de GAGs, marcadores de inflamação, de estresse oxidativo e de estresse nitrativo sugerem um envolvimento direto dos GAGs na promoção destas alterações, bem como uma interligação entre os distúrbios oxidativo e inflamatório ocorrentes nos pacientes MPS II. Contudo, ressalta-se que estes resultados devem ser interpretados com cautela, visto que somente pacientes sob longos tempos de TRE foram incluídos. Considerando o papel protetor da TRE sobre alguns parâmetros, mas também sua ineficiência com relação a outros, sugere-se necessidade de novas abordagens terapêuticas, que possam ser complementares à mesma. Terapias farmacológicas com anti-inflamatórios, antioxidantes e outras substâncias que diminuam os processos deletérios causados pelos GAGs são algumas das possíveis estratégias de tratamento a serem estudadas.

V. CONCLUSÕES GERAIS

A partir dos resultados obtidos neste estudo em pacientes com MPS II submetidos a longos períodos de TRE, foi possível concluir que os indivíduos estudados:

- a) Apresentam aumento do dano oxidativo a lipídios e a proteínas;
- b) Não possuem diminuição de defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas;
- c) Têm maiores níveis de ERN;
- d) Apresentam aumento de marcadores de inflamação;
- e) Mantêm altos níveis de excreção de GAGs na urina.

Além disso, as correlações encontradas entre os marcadores analisados permitem inferir que:

- f) A produção de ERN é correlacionada com o acúmulo de GAGs;
- g) Os GAGs estão envolvidos, ao menos em parte, com o aumento do dano a proteínas;
- h) O processo inflamatório pode ter relação com o aumento dos níveis de ERN.

Desta maneira, conclui-se que, mesmo sob o efeito a longo prazo da TRE, os pacientes MPS II apresentam dano a biomoléculas, aumento de espécies reativas, e aumento de citocinas pró-inflamatórias. Assim, sugere-se que o uso de fármacos antioxidantes e anti-inflamatórios possa ser uma estratégia promissora, que venha a complementar o tratamento específico com a enzima recombinante nos pacientes com MPS II.

VI. PERSPECTIVAS

Como principal perspectiva deste trabalho, pretende-se analisar a influência do tempo de TRE sobre o estresse oxidativo e a inflamação na MPS II, através da análise de uma ampla gama de biomarcadores, realizando uma comparação entre um grupo controle, um grupo que não realize TRE, um grupo que realize TRE por no mínimo um ano e no máximo quatro anos, e um grupo que realize TRE há mais de quatro anos. Com isso, as perspectivas específicas deste trabalho são:

- a) Avaliar o dano ao DNA em pacientes MPS II através do ensaio cometa;
- b) Avaliar a origem oxidativa do dano ao DNA, através da dosagem de 8-hidróxi-2'-desoxiguanosina na urina;
- c) Avaliar os índices de genotoxicidade, através do teste de micronúcleos em células da mucosa oral;
- d) Avaliar a regulação do estresse oxidativo e da inflamação, através da análise da expressão gênica do Nrf-2, do NF- κ B, da hemeoxigenase-1 e da iNOS;
- e) Avaliar a concentração de marcadores pró- e anti-inflamatórios, tais como as interleucinas-2, -4, -5, -6, -8 e -10, IFN- γ , TNF- α e GM-CSF;
- f) Avaliar o efeito *in vitro*, em fibroblastos de pacientes, de substâncias antioxidantes e anti-inflamatórias;
- g) Quantificar e correlacionar os níveis de heparan sulfato e dermatan sulfato com os demais biomarcadores de estresse oxidativo e inflamação.

VII. REFERÊNCIAS

- Alegra T, Eizerik DP, de Cerqueira CC, Pereira TV, Dornelles AD, Schwartz IV. Efficacy and safety of idursulfase therapy in patients with mucopolysaccharidosis type II with and without comparison to placebo: systematic review and meta-analysis. *Cad Saude Publica*, 2013, 1:S45-S58.
- Arfi A, Richard M, Gandolphe C, Bonnefont-Rousselot D, Thérond P, Scherman D. Neuroinflammatory and oxidative stress phenomena in MPS IIIA mouse model: the positive effect of long-term aspirin treatment. *Mol Genet Metab*, 2011, 103:18-25.
- Ausseil J, Desmaris N, Bigou S, Attali R, Corbineau S, Vitry S, Parent M, Cheillan D, Fuller M, Maire I, Vanier MT, Heard JM. Early neurodegeneration progresses independently of microglial activation by heparan sulfate in the brain of mucopolysaccharidosis IIIB mice. *PLoS One*, 2008, 3:e2296.
- Baehner F, Schmiedeskamp C, Krummenauer F, Miebach E, Bajbouj M, Whybra C, Kohlschütter A, Kampmann C, Beck M. Cumulative incidence rates of the mucopolysaccharidoses in Germany. *J Inherit Metab Dis*, 2005, 28:1011-1017.
- Bagewadi S, Robert J, Mercer J, Jones S, Stephenson J, Wraith JE. Home treatment with elaprase and Naglazyme is safe in patient with mucopolysaccharidoses types II and VI, respectively. *J. Inherit Metab Dis*, 2008, 31:733-73.
- Ballabio A, Gieselmann V. Lysosomal disorder: From storage to cellular damage. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1793:684-696.
- Barschak AG, Sitta A, Deon M, de Oliveira MH, Haeser A, Dutra-Filho CS, Wajner M, Vargas CR. Evidence that oxidative stress is increased in plasma from patients with maple syrup urine disease. *Metab Brain Dis*, 2006, 21:279-286.
- Basu S. Comprehensive Invited Review. F2-Isoprostanes in Human Health and Diseases: From Molecular Mechanisms to Clinical Implications. *Antioxid Redox Signal*, 2008, 10:1405-1434.
- Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev*, 1998, 78:547-581.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry*. WH Freeman, New York, 2006, 6ª edição.
- Berg K, Danes BS, Bearn AG. The linkage relation of the loci for Xm serum system and the X-linked form of Hurler's syndrome (Hunter's syndrome). *Am J Hum Genet*, 1968, 20:398-401.
- Biancini GB, Vanzin CS, Rodrigues DB, Deon M, Ribas GS, Barschak AG, Manfredini V, Netto CBO, Jardim LB, Giugliani R, Vargas CR. Globotriaosylceramide is correlated with oxidative stress and inflammation in Fabry patients treated with enzyme replacement therapy. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1822:226-232.

Bond CS, Clements PR, Ashby S, Collyer CA, Harrop SJ, Hopwood JJ, Guss JM. Structure of a human lysosomal sulfatase. *Structure*, 1997, 5:277-289.

Braugher JM, Duncan LA, Chase RL. The involvement of iron in lipid peroxidation. Importance of ferric to ferrous ratios in initiation. *J Biol Chem*, 1986, 261:10282-10289.

Brunk UT, Neuzil J, Eaton JW. Lysosomal involvement in apoptosis. *Redox Rep*, 2001, 6:91-97.

Bunge S, Clements PR, Byers S, Kleijer WJ, Brooks DA, Hopwood JJ. Genotype-phenotype correlations in mucopolysaccharidosis type I using enzyme kinetics, immunoquantification and in vitro turnover studies. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 30:249-256.

Burrow TA, Hopkin RJ, Leslie ND, Tinkle BT, Grabowski GA. Enzyme reconstitution/replacement therapy for lysosomal storage diseases. *Curr Opin Pediatr*, 2007, 19:628-635.

Cakatay U. Protein oxidation parameters in type 2 diabetic patients with good and poor glycaemic control. *Diabetes Metab*, 2005, 31:551-557.

Chance B, Sies H, Boveris AC. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*, 1979, 59:527-605.

Clarke JT, Greer WL, Strasberg PM, Pearce RD, Skomorowski MA, Ray PN. Hunter disease (mucopolysaccharidosis type II) associated with unbalanced inactivation of the X chromosomes in a karyotypically normal girl. *Am J Hum Genet*, 1991, 49:289-297.

Coelho JC, Wajner M, Burin MG, Vargas CR, Giugliani R. Selective screening of 10.000 high-risk Brazilian patients for the detection of inborn errors of metabolism. *Eur J Pediatr*, 1997, 156:650-654.

Connelly L, Palacios-Callender M, Ameixa C, Moncada S, Hobbs AJ. Biphasic regulation of NF-kappa B activity underlies the pro- and anti-inflammatory actions of nitric oxide. *J Immunol*, 2001, 166:3873-3881.

Coutinho MF, Lacerda L, Alves S. Glycosaminoglycan storage disorders: a review. *Biochem Res Int*, 2012, 1-16.

da Silva EM, Strufaldi MW, Andriolo RB, Silva LA. Enzyme replacement therapy with idursulfase for mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome). *Cochrane Database Syst Rev*, 2016, 5:2.

Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, Colombi R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J Cell Mol Med*, 2006, 10:389-406.

Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani AC, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta*, 2003, 329:23-38.

de Jong JGN, Wevers RA, Liebrand-van Sambeek R. Measuring urinary glycosaminoglycans in the presence of protein: an improved screening procedure for mucopolysaccharidoses based on dimethylmethylene blue. *Clin. Chem*, 1992, 38:803-807.

Deganuto M, Pittis MG, Pines A, Dominissini S, Kelley MR, Garcia R, Quadrifoglio F, Bembi B, Tell G. Altered intracellular redox status in Gaucher disease fibroblasts and impairment of adaptive response against oxidative stress. *J Cell Physiol*, 2007, 212:223-235.

Donida B, Marchetti DP, Biancini GB, Deon M, Manini PR, da Rosa HT, Moura DJ, Saffi J, Bender F, Burin MG, Coitinho AS, Giugliani R, Vargas CR. Oxidative stress and inflammation in mucopolysaccharidosis type IVA patients treated with enzyme replacement therapy. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852:1012-1019.

Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 2002, 82:47-95.

Eliyahu E, Wolfson T, Ge Y, Jepsen KJ, Schuchman EH, Simonaro CM. Anti-TNF- α therapy enhances the effects of enzyme replacement therapy in rats with mucopolysaccharidosis type VI. *PLoS One*, 2011, 6:e22447.

Eng C, Beck M, Martin R. Recognition and diagnosis of mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome). *Pediatrics*, 2008, 121:377-386.

Esko JD, Kimata K, Lindahl U. Proteoglycans and sulfated glycosaminoglycans. Em: Varki A, Cummings RD, Esko JD et al. (Eds.) *Essentials of glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2009, Capítulo 16.

Filippon L, Vanzin CS, Biancini GB, Pereira IN, Manfredini V, Sitta A, Peralba Mdo C, Schwartz IV, Giugliani R, Vargas CR. Oxidative stress in patients with mucopolysaccharidosis type II before and during enzyme replacement therapy. *Mol Genet Metab*, 2011a, 103:121-127.

Filippon L, Wayhs CA, Atik DM, Manfredini V, Herber S, Carvalho CG, Schwartz IV, Giugliani R, Vargas CR. DNA damage in leukocytes from pretreatment mucopolysaccharidosis type II patients; protective effect of enzyme replacement therapy. *Mutat Res*, 2011b, 721:206-210.

Froissart R, da Silva IM, Maire I. Mucopolysaccharidosis type II: an update on mutation spectrum. *Acta Paediatr*, 2007, 96:71-77.

Fuller M, Meikle PJ, Hopwood JJ. Epidemiology of lysosomal storage diseases: an overview. Em: Mehta A, Beck M, Sunder-Plassmann G. (Eds.) *Fabry Disease: Perspectives from 5 years of FOS*. Oxford PharmaGenesis, Oxford, 2006, Capítulo 2

Futerman AH, van Meer G. The cell biology of lysosomal storage disorders, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, 5:554-565.

Germain DP. Enzyme Replacement therapies for lysosomal storage disorders. *Med Sci (Paris)*, 2005, 21:77-83.

Giugliani R, Hwu WL, Tytki-Szymanska A, Whiteman DA, Pano A. A multicenter, open-label study evaluating safety and clinical outcomes in children (1.4-7.5 years) with Hunter syndrome receiving idursulfase enzyme replacement therapy. *Genet Med*, 2014, 16:435-441.

Giugliani R, Rojas VM, Martins AM, Valadares ER, Clarke JT, Góes JE, Kakkis ED, Worden MA, Sidman M, Cox GF. A dose-optimization trial of laronidase (Aldurazyme) in patients with mucopolysaccharidosis I. *Mol Genet Metab*, 2009, 96:13-19.

Giulivi C, Poderoso JJ, Boveris A. Production of nitric oxide by mitochondria. *J Biol Chem*, 1998, 273:11038-11043.

Guerreiro G, Mescka CP, Sitta A, Donida B, Marchetti D, Hammerschmidt T, Faverzani J, Coelho D de M, Wajner M, Dutra-Filho CS, Vargas CR. Urinary biomarkers of oxidative damage in Maple syrup urine disease: the L-carnitine role. *Int J Dev Neurosci*, 2015, 42:10-14.

Guillén-Navarro E, Domingo-Jiménez MR, Alcade-Martín C, Cancho-Candela R, Couce ML, Galán-Gómez E, Alonso-Luengo O. Clinical manifestations in female carriers of mucopolysaccharidosis type II: a Spanish cross-sectional study. *Orphanet J Rare Dis*, 2013, 8:92.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, Oxford, 2007, 4^a ed.

Halliwell B, Whiteman M. 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*, 2004, 142:231-255.

Halliwell B. Reactive species and antioxidants redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol*, 2006, 141:312-322.

Hamano K, Hayashi M, Shioda K, Fukatsu R, Mizutani S. Mechanisms of neurodegeneration in mucopolysaccharidosis II and IIIB: analysis of brain tissue. *Acta Neuropathol*, 2008, 115:547-559.

Harmatz P, Giugliani R, Schwartz IV, Guffon N, Teles EL, Miranda MC, Wraith JE, Beck M, Arash L, Scarpa M, Ketteridge D, Hopwood JJ, Plecko B, Steiner R, Whitley CB, Kaplan P, Yu ZF, Swiedler SJ, Decker C. 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*, 2008, 94:469-475.

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

Higdon A, Diers AR, Oh JY, Landar A, Darley-Usmar VM. Cell signaling by reactive lipid species: new concepts and molecular mechanisms. *Biochem J*, 2012, 442:453-464.

Jacobs AT, Ignarro LJ. Nuclear factor-kappa B and mitogen-activated protein kinases mediate nitric oxide-enhanced transcriptional expression of interferon-beta. *J Biol Chem*, 2003, 278:8018-8027.

Jimenez-Sanchez G, Childs B, Valle D. The effect of mendelian disease in human health. Em: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS. (Eds.) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, McGraw-Hill Inc., New York, 2001, 8ª edição, 167-174.

Kakkis ED, Muenzer J, Tiller GE, Waber L, Belmont J, Passage M, Izykowski B, Phillips J, Doroshov R, Walot I, Hoft R, Neufeld EF. Enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis I. *N Eng J Med*, 2001, 344:182-188.

Kobayashi Y. The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation. *J Leukoc Biol*, 2010, 88:1157-1162.

Lampe C, Atherton A, Burton BK, Descartes M, Giugliani R, Horovitz DD, Kyosen SO, Magalhães TS, Martins AM, Mendelsohn NJ, Muenzer J, Smith LD. Enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis II patients under 1 year of age. *JIMD Rep*, 2014, 14:99-113.

Lancaster Jr JR. Nitroxidative, nitrosative and nitrative stress: kinetic predictions of reactive nitrogen species chemistry under biological conditions. *Chem Res Toxicol*, 2006, 19:1160-1174.

Latini A, Scussiato K, Borba-Rosa R, Leipnitz G, Llesuy S, Belló-Klein A, Dutra-Filho, CS, Wajner M. Induction of oxidative stress by L-2-hydroxyglutaric acid in rat brain. *J Neuosci Res*, 2003, 74:103-110.

Lawson LA, Rokach J, FitzGerald GA. Isoprostanes: formation, analysis and use as indices of lipid peroxidation in vivo. *J Biol Chem*, 1999, 274:24441-24444.

Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent L, Lenz AG, Ahn BW, Shalithiel S, Stadman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*, 1990, 186:464-478.

Mabe P, Leistner S, Schwartz I, Matte U, Giugliani R. Errores innatos del metabolismo lisosomal. Em: Colombo, M, Cornejo V, Raimann E. (Eds.) *Errorres innatos en el metabolismo del niño*. Editorial Universitaria, Santiago de Chile, 2003, 225-256.

Mabe P, Valiente A, Soto V, Cornejo V, Raimann E. Evaluation of reliability for urine mucopolysaccharidosis screening by dimethylmethylene blue and Berry spots tests. *Clin Chim Acta*, 2004, 345:135-140.

Malencik DA, Anderson SR. Dityrosine as a product of oxidative stress and fluorescent probe. *Amino Acids*, 2003, 25:233-247.

Mani AR, Pannala AS, Orié NN, Ollosson R, Harry D, Rice-Evans CA, Moore KP. Nitration of endogenous para-hydroxyphenylacetic acid and the metabolism of nitrotyrosine. *Biochem J*, 2003, 374:521-527.

Marinho HS, Real C, Cyrne L, Soares H, Antunes F. Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. *Redox Biol*, 2014, 2:535-562.

Marks DB, Marks AD, Smith CM. Oxygen metabolism and oxygen toxicity. Em: Velker J. (Ed.) *Basic Medical Biochemistry. A Clinical Approach*. Williams & Wilkins, Baltimore, 1996, 327-340.

Matés JM, Sánchez-Jiménez f. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front Biosci*, 1999, 15:D339-D345.

Maxwell SR. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs*, 1995, 49:345-361.

McGuire PJ, Parikh A, Diaz GA. Profiling of oxidative stress in patients with inborn errors of metabolism. *Mol Genet Metab*, 2009, 98:173-80.

Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA*, 1999, 281:249-254.

Miller NJ, Rice-Evans C. Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS⁺ radical cation assay. *Free Radic Res*, 1997, 26:195-199.

Minotti G, Aust SD. Redox cycling of iron and lipid peroxidation. *Lipids*, 1992, 27:219-226.

Muenzer J, Beck M, Giugliani R, Suzui Y, Tytki-Szymanska A, Valayannopoulos V, Vellodi A, Wraith JE. Idursulfase treatment of Hunter syndrome in children younger than 6 years: results from the Hunter Outcome Survey. *Genet Med*, 2011, 13:102-109.

Muenzer J, Guzsavas-Calikoglu M, McCandless SE, Schuetz TJ, Kimura A. A phase I/II clinical trial of enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome). *Mol Genet Metab*, 2007, 90:329-337.

Muenzer J, Wraith, JE, Beck M, Giugliani R, Harmatz P, Eng CM, Vellodi A, Martin R, Ramaswami U, Guzsavas-Calikoglu M, Vijayaraghavan S, Wendt S, Puga A, Ulbrich B, Shinawi M, Clearly M, Piper D, Conway AM, Kimura A. A phase II/III clinical study of enzyme replacement therapy with idursulfase in mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome), *Genet Med*, 2006, 8:465-473.

Negretto GW, Deon M, Biancini GB, Burin MG, Giugliani R, Vargas CR. Glycosaminoglycans can be associated with oxidative damage in mucopolysaccharidosis II patients submitted to enzyme replacement therapy. *Cell Biol Toxicol*, 2014, 30:189-193.

Nelson J, Crowhurst J, Carey B, Greed L. Incidence of the Mucopolysaccharidoses in Western Australia. *Am J Med Genet Part A*, 2003, 123A:310-313.

Neufeld EF, Muenzer J. The mucopolysaccharidoses. Em: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. (Eds.) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8^a edição, McGraw-Hill Inc., New York, 2001, 3421-3452.

Nilsson MI, MacNeil NG, Kitaoka Y, Suri R, Young SP, Kaczor JJ, Nates NJ, Ansari MU, Wong T, Ahktar M, Brandt L, Hettinga BP, Tarnopolsky MA. Combined aerobic exercise and enzyme replacement therapy rejuvenates the mitochondrial-lysosomal axis and alleviates autophagic blockage in Pompe disease. *Free Radic Biol Med*, 2015, 87:98-112.

Ohashi T. Enzyme replacement therapy for lysosomal storage diseases. *Pediatr Endocrinol Rev*, 2012, 1:26-34.

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 1979, 95:351-358.

Okuyama T, Tanaka A, Suzuki Y, Ida H, Tanaka T, Cox GF, Eto Y, Orii T. Japan Elaprase® treatment (JET) study: idursulfase enzyme replacement therapy in adult patients with attenuated Hunter syndrome (mucopolysaccharidosis II, MPS II). *Mol Genet Metab*, 2010, 99:18-25.

Olsen RK, Cornelius N, Gregersen N. Redox signaling and mitochondrial stress responses; lessons from inborn errors of metabolism. *J Inherit Metab Dis*, 2015, 38:703-719.

Pan HZ, Zhang H, Chang D, Li H, Sui H. The change of oxidative stress products in diabetes mellitus and diabetic retinopathy. *Brit J Ophthalmol*, 2008, 92:548-551.

Parenti G, Pignata C, Vajro P, Salerno M. New strategies for the treatment of lysosomal storage diseases (review). *Int J Mol Med*, 2013, 31:11-20.

Pereira VG, Martins AM, Micheletti C, D'Almeida V. Mutational and oxidative stress analysis in patients with mucopolysaccharidosis type I undergoing enzyme replacement therapy. *Clin Chim Acta*, 2008, 387:75-79.

Piña-Aguilar RE, Zaragoza-Arévalo GR, Rau I, Gal A, Alcántara-Ortigoza MA, López-Martínez MS, Santillán-Hernández Y. Mucopolysaccharidosis type II in a female carrying a heterozygous stop mutation of the iduronate-2-sulfatase gene and showing a skewed X chromosome inactivation. *Eur J Med Genet*, 2013, 56:159-162.

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, Sá-Miranda MC. Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal. *Eur J Hum Genetic*, 2004, 12:87-92.

Polgreen LE, Vehe RK, Rudser K, Kunin-Batson A, Utz JJ, Dickson P, Shapiro E, Whitley CB. Elevated TNF- α is associated with pain and physical disability in mucopolysaccharidosis types I, II and VI. *Mol Genet Metab*, 2016, S1096-7192:30011-30017.

Poorthuis BJHM, Wevers RA, Kleijer WJ, Groener JEM, de Jong JGN, van Weely S, Niezen-Konig KE, van Diggelen OP. The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. *Hum Genet*, 1999, 105:151-156.

Poupětová H, Ledvinová J, Berná L, Dvořáková L, Kožich V, Elleder M. The birth prevalence of lysosomal storage disorders in the Czech Republic: comparison with data in different populations. *J Inherit Metab Dis*, 2010, 33:387-396.

Pryor WA, Jin X, Squadrito GL. One-and-two-electron oxidations of methionine by peroxynitrite. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91:11173-11177.

Ramos-Vasconcelos GR, Alves ALH, Hermes-Lima M. Radicais livres, antioxidantes e a adaptabilidade animal. Em: El-Hani CN e Videira AAP. (Eds.) *O Que é Vida: Para Entender a Biologia do Século XXI*, 9: 209-231. Editora Relume Dumará, Rio de Janeiro, 2000, 209-331.

Rani PJ, Panneerselvam C. Effect of L-carnitine on brain lipid peroxidation and antioxidant enzymes in old rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2002, 57:B134-B137.

Regateiro FJ. *Manual de Genética Médica*. Imprensa da Universidade de Coimbra, Coimbra, 2003, 1ª edição.

Reolon GK, Reinke A, de Oliveira MR, Braga LM, Camassola M, Andrades ME, Moreira JC, Nardi NB, Roesler R, Dal-Pizzol F. Alterations in oxidative markers in the cerebellum and peripheral organs in MPS I mice. *Cell Mol Neurobiol*, 2009, 29:443-448.

Requejo R, Hurd TR, Costa NJ, Murphy MP. Cysteine residues exposed on protein surfaces are the dominant intramitochondrial thiol and may protect against oxidative damage. *FEBS J*, 2010, 277:1465-1480.

Requena JR, Levine RL, Stadtman ER. Recent advances in the analysis of oxidized proteins. *Amino Acids*. 2003, 25:221-226.

Ribas GS, Biancini GB, Mescka C, Wayhs CY, Sitta A, Wajner M, Vargas CR. Oxidative stress parameters in urine from patients with disorders of propionate metabolism: a beneficial effect of L-carnitine supplementation. *Cell Mol Neurobiol*, 2012, 32:77-82.

Ribas GS, Manfredini V, de Marco MG, Vieira RB, Wayhs CY, Vanzin CS, Biancini GB, Wajner M, Vargas CR. Prevention by L-carnitine of DNA damage induced by propionic and L-methylmalonic acids in human peripheral leukocytes in vitro. *Mutat Res*, 2010, 702:123-128.

Rice-Evans C, Miller NJ. Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods Enzymol*, 1994, 234:279-293.

Roberts II LJ, Morrow JD. Measurement of F2-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radic Biol Med*, 2000, 28:505-513.

Rocha JC, Martins MJ. Oxidative stress in phenylketonuria: future directions. *J Inherit Metab Dis*, 2012, 35:391-398.

Rockenbach FJ, Deon M, Marchese DP, Manfredini V, Mescka C, Ribas GS, Habekost CT, Castro CG Jr, Jardim LB, Vargas CR. The effect of bone marrow transplantation on oxidative stress in X-linked adrenoleukodystrophy. *Mol Genet Metab*, 2012, 106:231-236.

Roversi FM, Galdieri LC, Grego BHC, Souza FG, Micheletti C, Martins AM, D'Almeida V. Blood oxidative stress markers in Gaucher disease patients. *Clin Chim Acta*, 2006, 364:316-320.

Saudubray JM, Charpentier C. Clinical Phenotypes: Diagnosis/Algorithms. Em: Scriver CR, Sly WA, Beaudet AL, Valle D. (Eds.) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, McGraw-Hill Inc., New York, 2001, 8^a edição, 1327-1403.

Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med*, 2001, 30:1191-1212.

Scriver CR, Sly WA, Beaudet AL, Valle D. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, McGraw-Hill Inc., New York, 2001, 8^a edição.

Shemesh E, Deroma L, Bembi B, Deegan P, Hollak C, Weinreb NJ, Cox TM. Enzyme replacement therapy and substrate reduction therapy for Gaucher disease. *Cochrane Database Syst Rev*, 2015, 27:3.

Simonaro CM, D'Angelo M, Haskins ME, Schuchman EH. Joint and bone disease in mucopolysaccharidosis VI and VII: identification of new therapeutic targets and biomarkers using animal models. *Pediatr Res*, 2005, 57:701-707.

Simonaro CM, D'Angelo M, He X, Eliyahu E, Shtraizent N, Haskins ME, Schuchman EH. Mechanism of glycosaminoglycan-mediated bone and joint disease: implications for the mucopolysaccharidoses and other connective tissue diseases. *Am J Pathol*, 2008, 172:112-122.

Simonaro CM, Ge Y, Eliyahu E. Involvement of the Toll-like receptor 4 pathway and use of TNF-alpha antagonists for treatment of the mucopolysaccharidoses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107:222-227.

Simonaro CM, Haskins ME, Schuchman EH. 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*, 2001, 81:1319-1328.

Sitta A, Barschak AG, Deon M, de Mari JF, Barden AT, Vanzin CS, Biancini GB, Schwartz IVD, Wajner M, Vargas CR. L-Carnitine Blood Levels and Oxidative Stress in Treated Phenylketonuric Patients. *Cell Mol Neurobiol*, 2009, 29:211-218.

Sly WS. Receptor-mediated transport of acid hydrolases to lysosomes. *Curr Top Cell Regul*, 1985, 26:27-38.

Starke-Reed PE, Oliver CN. Protein oxidation and proteolysis during aging and oxidative stress. *Arch Biochem Biophys*, 1989, 275:559-567.

Taylor KR, Yamasaki K, Radex KA, Di Nardo A, Goodarzi H, Golenbock D, Beutler B, Gallo RL. Recognition of hyaluronan released in sterile injury involves a unique receptor complex dependent on Toll-like receptor 4, CD44 and MD-2. *J Biol Chem*, 2007, 282:18265-18275.

Terman A, Brunk UT. Oxidative stress, accumulation of biological 'garbage', and aging. *Antioxid Redox Signal*, 2006, 8:197-204.

Terman A, Kurz T, Gustafsson B, Brunk UT. Lysosomal labilization. *IUBMB Life*, 2006, 58:531-539.

Tomatsu S, Montaña AM, Oikawa H, Smith M, Barrera L, Chinen Y, Thacker MM, Mackenzie WG, Suzuki Y, Orii T. Mucopolysaccharidosis Type IVA (Morquio A Disease): clinical Review and current treatment. *Curr Pharm Biotechnol*, 2011, 12:931-945.

Tuschi K, Gal A, Paschke E, Kircher S, Bodamer OA. Mucopolysaccharidosis type II in females: case report and review of literature. *Pediatr Neurol*, 2005, 32:270-272.

Valko M, Leibfritz D, Moncola J, Cronin M, Mazura M, Telser I. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39:44-84.

Valstar MJ, Nejis S, Bruggenwirth HT, Olmer R, Ruijter GJ, Wevers RA, van Diggelen OP, Poorthuis BJ, Halley DJ, Wijburg FA. Mucopolysaccharidosis type IIIA: clinical spectrum and genotype-phenotype correlations. *Ann Neurol*, 2010, 68:876-887.

Vargas CR, Wajner M, Sitta A. Oxidative stress in phenylketonuric patients. *Mol Genet Metab*, 2011, 54:S97-S99.

Vieira T, Schwartz I, Munoz V, Pinto L, Steiner C, Ribeiro M, Boy R, Ferraz V, de Paula A, Kim C, Acosta A, Giugliani R. Clinical Report - Mucopolysaccharidoses in Brazil: What Happens From Birth to Biochemical Diagnosis? *Am J Med Genet A*, 2008, 146A:1741-1747.

Villani GRD, Di Domenico C, Musella A, Cecere F, Di Napoli D, Di Natale P. Mucopolysaccharidosis IIIB: Oxidative damage and cytotoxic cell involvement in the neuronal pathogenesis. *Brain Res*, 2009, 1279:99-108.

Villani GRD, Gargiulo N, Faraonio R, Castaldo S, Reyero EG, Di Natale P. Cytokines, neurotrophins, and oxidative stress in brain disease from mucopolysaccharidosis IIIB. *J Neurosci Res*, 2007, 85:612-622.

Vitner EB, Platt FM, Futerman AH. Common and uncommon pathogenic cascades in lysosomal storage diseases. *J Biol Chem*, 2010, 285:20423-20427.

Wendel A. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*, 1981, 77:325-332.

White KK, Hale S, Goldberg MJ. Musculoskeletal health in Hunter disease (MPS II): ERT improves functional outcomes. *J Pediatr Rehabil Med*, 2010, 3:101-107.

Wraith JE, Cooper A, Thomley M, Wilson PJ, Nelson PV, Morris CP, Hopwood JJ. The clinical phenotype of two patients with a complete deletion of the iduronate-2-sulphatase gene (mucopolysaccharidosis II – Hunter syndrome). *Hum Genet*, 1991, 87:205-206.

Wraith JE, Scarpa M, Beck M, Bodamer OA, de Meirleir L, Guffon N, Lund AM, Malm G, Van der Ploeg AT, Zeman J. Mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): a clinical review and recommendations for treatment in the era of enzyme replacement therapy. *Eur J Pediatr*, 2008, 167:267-277.

Xia Y, Yamagata K, Krukoff TL. Differential expression of the CD14/TLR4 complex and inflammatory signaling molecules following i.c.v. administration of LPS. *Brain Res*, 2006, 1005:85-95.

Young ID, Harper PS, Archer IM, Newcombe RG. A clinical and genetic study of Hunter's syndrome. Clinical heterogeneity. *J Med Genet*, 1982, 19:401-407.

Zablocka A, Janusz M. The two faces of reactive oxygen species. *Postepy Hig Med Dosw*, 2008, 26:228-124.

Zhao M, Antunes F, Eaton JW, Brunk UT. Lysosomal enzymes promote mitochondrial oxidant production, cytochrome c release and apoptosis. *Eur J Biochem*, 2003, 270:3778-3786.

VIII. ANEXOS

VIII.1. Anexo 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido para pacientes MPS II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PACIENTES COM MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO II

Estamos convidando a pessoa pela qual você é responsável, que é portadora de Mucopolissacaridose tipo II (MPS II), a participar do projeto de pesquisa intitulado “Investigação de marcadores inflamatórios e de dano oxidativo em pacientes portadores de Mucopolissacaridose tipo II submetidos à terapia de reposição enzimática: avaliação do efeito *in vitro* da genisteína e da vitamina E”. O presente projeto de pesquisa tem por objetivo verificar os efeitos da ação dos radicais livres (por exemplo, formados por radiação solar) e de substâncias antioxidantes (por exemplo, vitaminas) em pacientes com mucopolissacaridose tipo II. Também será avaliado o efeito da terapia de reposição enzimática utilizada para esta 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 você (responsável legal do portador de MPS II), das coletas de sangue periférico, urina e da coleta de células da boca. Estes dados serão coletados nos dias de consultas rotineiras, não sendo necessário o comparecimento em consultas extras. Caso necessário, dados adicionais serão obtidos dos prontuários dos pacientes.

É muito importante que você saiba que os dados (entrevista, resultados das análises de sangue, urina e células da boca) obtidos com a doação, são de relevante importância científica para o melhor entendimento da MPS II, e principalmente para avaliação da terapia de reposição enzimática. Sendo que esses resultados virão beneficiar outros pacientes com a mesma doença.

Os riscos e desconfortos causados pela coleta de sangue e urina são semelhantes aos da coleta para exames laboratoriais de rotina, e a coleta de células bucais é rápida e feita com a esfoliação de células da parte interna da boca com uma escova. O material coletado será utilizado única e exclusivamente para fins do

projeto de pesquisa, sendo garantido o sigilo das informações obtidas e que você, responsável pelo indivíduo, terá acesso às mesmas. 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. Após o término do estudo os materiais biológicos (sangue periférico e urina) que ainda estiverem armazenados poderão ser descartados ou mantidos para futuras pesquisas dentro do mesmo objetivo deste estudo, de acordo com a sua decisão de autorizar o uso futuro. Se autorizado, o material somente será utilizado para novas pesquisas mediante seu consentimento por escrito.

Com relação ao uso dos materiais biológicos, ao final do estudo, você (marque com um X):

autoriza o armazenamento.

não autoriza o armazenamento, solicitando que sejam descartados.

Cabe salientar que a participação no estudo é totalmente voluntária, e que a desistência não trará implicações a você ou à pessoa pela qual você é responsável com relação ao atendimento clínico no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. É importante ressaltar também, que nem você nem a pessoa sob sua tutela receberão nenhum tipo pagamento pela participação no estudo e que todas as despesas relacionadas ao custo dos exames laboratoriais serão cobertas por verbas do próprio projeto de pesquisa, portanto, serão completamente gratuitas para você.

Os pesquisadores responsáveis pelo estudo (Profa. Dra. Carmen Regla Vargas e o mestrando Carlos Eduardo Jacques) estarão à disposição para o esclarecimento de qualquer dúvida durante todo o andamento da pesquisa, no Serviço de Genética Médica do HCPA localizado no 3º andar, Fone: (51) 3359.8011. Ainda, para maiores informações, você pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA, através do telefone (51) 3359.7640, de segunda à sexta-feira, das 8h às 17h.

Este documento será elaborado em duas vias, sendo que uma delas (assinada por nós) será entregue a você, responsável legal pelo participante da pesquisa, e a outra será mantida com o nosso grupo de pesquisa.

“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: _____

Nome do pesquisador: _____

Assinatura do pesquisador: _____

VIII.2. Anexo 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido para indivíduos controle

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PACIENTES CONTROLE – CRIANÇAS

Estamos convidando a pessoa pela qual você é responsável a participar do projeto de pesquisa intitulado “Investigação de marcadores inflamatórios e de dano oxidativo em pacientes portadores de Mucopolissacaridose tipo II submetidos à terapia de reposição enzimática: avaliação do efeito *in vitro* da genisteína e da vitamina E”. O presente projeto de pesquisa tem por objetivo verificar os efeitos da ação dos radicais livres (por exemplo, formados por radiação solar) e de substâncias antioxidantes (por exemplo, vitaminas) em pacientes com a doença genética mucopolissacaridose tipo II.

Para que este estudo seja realizado, é necessária uma comparação entre um grupo de pacientes que apresentam a doença com um grupo de pacientes que não apresentam. Portanto, a pessoa pela qual você é responsável, está sendo convidada a participar deste estudo como controle, ou seja, como não portador de mucopolissacaridose tipo II. Os dados necessários para a realização do projeto serão obtidos através de entrevistas realizadas com você (responsável legal do indivíduo), das coletas de sangue periférico, urina e da coleta de células da boca. Estes dados serão coletados nos dias de exames rotineiros, não sendo necessário o comparecimento em consultas extras.

Para participar, será feita a coleta de sangue, urina e células da boca, juntamente com as coletas solicitadas rotineiramente pelo médico. Os riscos e desconfortos causados pela coleta de sangue e urina são semelhantes aos da coleta para exames laboratoriais de rotina, e a coleta de células bucais é rápida e feita com a esfoliação de células da parte interna da boca com uma escova. A participação neste estudo não trará benefício direto a você ou à pessoa pela qual você é responsável, porém, os dados advindos desta doação são de importância científica relevante para o estabelecimento de novos tratamentos para esta doença, bem como um melhor entendimento desta patologia. O material coletado será única e

exclusivamente utilizado para fins do projeto de pesquisa, sendo reservado a você o 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. Após o término do estudo os materiais biológicos (sangue periférico e urina) que ainda estiverem armazenados poderão ser descartados ou mantidos para futuras pesquisas dentro do mesmo objetivo deste estudo, de acordo com a sua decisão de autorizar o uso futuro. Se autorizado, o material somente será utilizado para novas pesquisas mediante seu consentimento por escrito.

Com relação ao uso dos materiais biológicos, ao final do estudo, você (marque com um X):

autoriza o armazenamento.

não autoriza o armazenamento, solicitando que sejam descartados.

Todas as despesas relacionadas ao custo dos exames laboratoriais serão cobertas por verbas do próprio Projeto de Pesquisa, portanto, completamente gratuitas para você. Caso você queira retirar-se em definitivo da pesquisa, terá total liberdade para fazê-lo, sem que isso prejudique futuros atendimentos no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

Os pesquisadores responsáveis pelo estudo (Profa. Dra. Carmen Regla Vargas e o mestrando Carlos Eduardo Jacques) estarão à disposição para o esclarecimento de qualquer dúvida durante todo o andamento da pesquisa, no serviço de Genética Médica do HCPA localizado no 3º andar, Fone: (51) 3359.8011. Ainda, para maiores informações, você pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA, através do telefone (51) 3359.7640, de segunda à sexta-feira, das 8h às 17h.

Este documento será elaborado em duas vias, sendo que uma delas (assinada por nós) será entregue a você, responsável legal pelo participante da pesquisa, e a outra será mantida com o nosso grupo de pesquisa.

“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:_____

Nome do pesquisador:_____

Assinatura do pesquisador:_____

VIII.3. Anexo 3 – Carta de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa



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

COMISSÃO CIENTÍFICA

A Comissão Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre analisou o projeto:

Projeto: 140506

Data da Versão do Projeto: 09/09/2014

Pesquisadores:

CARMEN REGLA VARGAS

ROBERTO GIUGLIANI

CARLOS EDUARDO DIAZ JACQUES

DESIREE PADILHA MARCHETTI

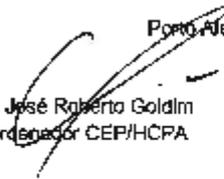
BRUNA DONIDA

Título: Investigação de parâmetros inflamatórios e de dano oxidativo em pacientes portadores de Mucopolissacaridose Tipo II submetidos à terapia de reposição enzimática: avaliação do efeito in vitro da genisteína e da vitamina E

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG)

Porto Alegre, 30 de setembro de 2014.


Prof. José Roberto Goldim
Coordenador CEP/HCPA

VIII.4. Anexo 4 – Comprovante de submissão do Artigo 01

BBA - Molecular Basis of Disease: Submission Confirmation

De: **BBA - Molecular Basis of Disease (ELS)**
(ees.bbadis.0.36e900.0a7daaa7@eesmail.elsevier.com)
Enviada: quarta-feira, 27 de janeiro de 2016 17:17:45
Para: carloseduardo.jacques@hotmail.com
Cc: donida.bruna@gmail.com; carolmescka@yahoo.com.br; daianegbr@hotmail.com;
desireepmarchetti@gmail.com; nandalbitencourt@gmail.com; mburin@hcpa.edu.br;
cfsouza@hcpa.edu.br; rgiugliani@hcpa.edu.br; crvargas@hcpa.edu.br

Title: Oxidative and nitrative stress and pro-inflammatory cytokines in
Mucopolysaccharidosis type II patients: effect of long-term enzyme replacement therapy
and relation with glycosaminoglycan accumulation
Corresponding Author: Mr. Carlos Eduardo Diaz Jacques
All Authors: Carlos Eduardo Diaz Jacques; Bruna Donida, MSc; Caroline P Mescka, PhD;
Daiane B Rodrigues, BS; Desirée P Marchetti, MSc; Fernanda H Bitencourt, MSc; Maira G
Burin, PhD; Carolina F Souza, MD, PhD; Roberto Giugliani, MD, PhD; Carmen R Vargas, PhD
Regular Paper

Dear Mr. Diaz Jacques,

This is to confirm that the above-mentioned manuscript has been received for
consideration in BBA - Molecular Basis of Disease.

You will be able to check on the progress of your manuscript by logging on to the Elsevier
Editorial System as an author:

<http://ees.elsevier.com/bbadis/>

Your username is: carloseduardo.jacques@hotmail.com

If you need to retrieve password details, please go to:

http://ees.elsevier.com/BBADIS/automail_query.asp

Your paper will be given a manuscript number shortly and you will soon receive an e-mail
with this number for your reference.

No additional authors will be added post submission unless editors receive agreement from
all authors and detailed information is supplied as to why the author list should be
amended.

Thank you for submitting your work to BBA - Molecular Basis of Disease. Should you have
any questions, please feel free to contact our office.

Sincerely,

Editorial Office
BBA - Molecular Basis of Disease

For further assistance, please visit our customer support site at
<http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923> Here you can search for solutions on a
range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via
interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any
further assistance from one of our customer support representatives.