

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

**Efeitos da inibição da catepsina B sobre a doença cardiovascular
na mucopolissacaridose tipo I**

Esteban Alberto Gonzalez

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular

Orientador: Prof Dr Guilherme Baldo

Co-Orientadora: Profª Dra Ursula da Silveira Matte

Porto Alegre, março de 2016

Este trabalho foi desenvolvido no Centro de Terapia Gênica do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). O estudo foi financiado pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) e pelo CNPq. Todos os experimentos apresentados nesta dissertação estão incluídos no projeto de pesquisa aprovado por seus aspectos éticos e metodológicos pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sob o registro nº 14-0417.

Agradecimentos

Ao Professor Guilherme Baldo, pela orientação, pela confiança, pelo ensino, pelo constante acompanhamento e por sempre estar presente para brindar-me sua ajuda. Agradeço-lhe por tudo o que fez para contribuir no meu crescimento intelectual, profissional e pessoal.

À Profa Ursula Matte, pela orientação, por brindar sempre sua ajuda tanto no âmbito acadêmico quanto no pessoal.

Ao Prof Roberto Giugliani por ter me dado a oportunidade de formar parte do laboratório do Centro de Terapia Gênica.

Aos todos meus colegas e amigos do Centro de Terapia Gênica por sua amizade, companheirismo e ajuda.

A todos os amigos que colaboraram com sugestões e a produção dos resultados deste trabalho (em especial, a Giselle Martins).

À Profa Angela Tavares, por sua disponibilidade, ensinamentos e ajuda nas ecocardiografias.

Hospital de Clinicas de Porto Alegre, em especial ao equipe da experimentação animal (em especial a Marta Cioatto), e o serviço de patologia experimental, que tiveram participação crucial durante o desenvolvimento do trabalho.

À UFRGS e PPGBM, em especial ao Elmo Cardoso, por sempre brindar sua ajuda.

Ao CNPq, pela bolsa de mestrado.

A minha família: meu pai, minha mãe, meus irmãos e minha avó, por sempre estar presentes, por me acompanhar em todas as minhas decisões e por ser o melhor de mim.

A minha namorada, pelo amor e apoio.

A Deus, por tudo...

SUMÁRIO

CAPITULO I INTRODUÇÃO	8
Mucopolissacaridoses	9
As Mucopolissacaridoses: características gerais	9
A Mucopolissacaridose tipo I	11
Tratamentos disponíveis para a MPS I	12
Modelos animais para MPS I	14
MPS I e a doença cardíaca	17
A Matriz Extracelular e suas alterações na MPS	18
As catepsinas na patogênese da MPS	21
CAPITULO II OBJETIVOS	24
Objetivo geral	25
Objetivos específicos	25
CAPITULO III MANUSCRITO	26
CAPITULO IV DISCUSSÃO	59
CAPITULO V CONCLUSÕES	68
CAPITULO VI REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

LISTA DE ABREVIATURAS

AH – Ácido hialurônico

CS – Condroitin sulfato

CTS – Catepsina

DS – Dermatan sulfato

ECM – Matriz extracelular

GAGs – Glicosaminoglicanos

HS – Heparan sulfato

IDUA – α -L-iduronidase

KS – Keratan sulfato

MMP – Metaloproteinases de matriz

MPS – Mucopolissacaridoses

SNC – Sistema nervoso central

TCTH – Transplante de células-tronco hematopoiéticas

TRE – terapia de reposição enzimática

Resumo:

A mucopolisacaridose tipo I é uma doença lisossomal com características multisistêmicas. No sistema cardiovascular observa-se aumento do coração, disfunção das válvulas cardíacas, rigidez e dilatação aórtica. Trabalhos anteriores demonstraram que camundongos MPS I superexpressam catepsina B em múltiplos tecidos, incluindo aqueles do sistema cardiovascular. Neste trabalho hipotetizamos que a catepsina B poderia melhorar as anormalidades encontradas no coração, aorta e valvas de animais com MPS I.

Em primeiro lugar, encontramos que a atividade de elastase total em aortas MPS I era elevada. Também, demonstramos a ocorrência de liberação de catepsina B dos lisossomos em fibroblastos MPS I, o que poderia degradar os componentes da matriz extracelular da aorta, do coração e das válvulas cardíacas. Em seguida, utilizamos um inibidor de catepsina B *in vivo* em camundongos MPS I. Após 4 meses de tratamento, a inibição parcial de atividade catepsina B em camundongos tratados reduziu a dilatação da aorta, bem como o espessamento da válvula cardíaca e levou a melhorias nos parâmetros ecocardiográficos, porém nenhum destes parâmetros foram completamente normalizados. Com base nestes resultados, concluímos que as alterações no lisossomo nesta doença levam ao escape de catepsina B para fora da organela, onde esta proteína pode ter múltiplas funções patológicas. A atividade catepsina B pode ser, pelo menos em parte, responsável pelas anormalidades cardiovasculares observadas nesta doença. Este estudo destaca, pela primeira vez, a possibilidade de utilizar inibidores de catepsina como agente terapêutico numa doença de depósito lisossomal.

Abstract:

Mucopolysaccharidosis type I is a lysosomal storage disorder with multisystemic features, including heart enlargement, heart valve dysfunction, and aortic stiffness and dilatation. Previous studies have shown that MPS I mice overexpress cathepsin B in multiple tissues, including those from the cardiovascular system. Here we hypothesized that inhibition of cathepsin B could ameliorate heart, aorta and valve abnormalities found in MPS I.

Firstly we found that total elastase activity in MPS I aorta is elevated. Following that, we demonstrated that cathepsin B leaks from the lysosome in MPS I fibroblasts, and therefore could be degrading extracellular matrix components from aorta, heart, and heart valves. We then used a cathepsin B inhibitor *in vivo* in MPS I mice. After 4 months of treatment, partial inhibition of cathepsin B activity in treated mice reduced aortic dilatation, as well as heart valve thickening and lead to improvements in echocardiographic parameters, although none of these were completely normalized. Based on these results, we conclude that alterations in the lysosome in this disease lead to leakage of cathepsin B to outside the organelle, where this protein can have multiple pathological roles. Cathepsin B activity may be, at least in part, responsible for the cardiovascular abnormalities observed in this disease. This study highlights for the first time the possibility of using cathepsin inhibitors as a therapeutic agent in a lysosomal storage disease.

CAPITULO I INTRODUÇÃO

Mucopolissacaridoses

As Mucopolissacaridoses: características gerais

As Mucopolissacaridoses (MPS) compreendem um grupo de doenças hereditárias causadas pela deficiência na atividade de enzimas lisossômicas envolvidas no catabolismo dos glicosaminoglicanos (Neufeld and Muenzer 2001).

Os glicosaminoglicanos (GAGs, antigamente chamados mucopolissacarídeos) são polissacarídeos lineares, produto da degradação proteolítica dos proteoglicanos (com exceção do ácido hialurônico). Eles formam parte dos principais componentes da matriz extracelular e da superfície das células. A degradação destas moléculas é realizada no interior do lisossomo pela ação de diferentes enzimas hidrolases, glicosidases, sulfatases e transferases não hidrolíticas. Quando alguma das enzimas lisossômicas que participam na degradação de GAGs perde atividade (total ou parcial), ocorre um acúmulo progressivo e ininterrupto de substratos. Isso resulta na alteração da função celular e diferentes condições patológicas, o que conduz à redução da expectativa de vida (Coutinho et al. 2012; Volpi et al. 2013).

As MPS podem se classificar em 11 tipos diferentes, dependendo da enzima deficiente e o tipo de substrato(s) acumulado(s), os quais podem ser do tipo: Dermatan sulfato (DS), Heparan sulfato (HS), Keratan sulfato (KS) e Condroitin sulfato (CS) (Tabela 1) (Neufeld and Muenzer 2001).

Tabela 1: Classificação das Mucopolissacaridoses – Adaptado de Neufeld e Muenzer (2001) e Giugliani (2016).

MPS	Nome da Síndrome	Gene Mutado	Herança	Substrato Acumulado	Principais Manifestações
I	Hurler/ Scheie	IDUA	Autossômica recessiva	HS, DS	Multissistêmicas, SNC
II	Hunter	IDS	Recessiva ligada ao X	HS, DS	Multissistêmicas, SNC
III A	Sanfillipo A	SGSH	Autossômica recessiva	HS	SNC
III B	Sanfillipo B	NAGLU	Autossômica recessiva	HS	SNC
III C	Sanfillipo C	HGSNAT	Autossômica recessiva	HS	SNC
III D	Sanfillipo D	GMS	Autossômica recessiva	HS	SNC
IV A	Morquio A	GALNS	Autossômica recessiva	KS, CS	Esqueléticas
IV B	Morquio B	GLB1	Autossômica recessiva	KS, CS	Esqueléticas
VI	Maroteaux-Lamy	ARSB	Autossômica recessiva	DS, CS	Multissistêmicas
VII	Sly	GUSB	Autossômica recessiva	HS, DS, CS	Multissistêmicas, SNC
IX	Natowicz	HYAL1	Autossômica recessiva	AH	Lesões articulares

Abreviações: AH – Ácido hialurônico; CS – Condroitin sulfato; DS – Dermatan sulfato; HS – Heparan sulfato; KS – Keratan sulfato; SNC – Sistema nervoso central.

As MPS se caracterizam por apresentar um curso progressivo e crônico. Usualmente se encontra um amplo espectro de gravidade clínica dentro de uma determinada deficiência enzimática (Neufeld and Muenzer 2001), devido à atividade residual da enzima. Os sintomas mais típicos incluem organomegalia, disostose multiplex e características faciais anormais. Outras manifestações comuns encontradas nas MPS incluem problemas na pele, na dentição, na visão assim como espessamento na traqueia (Giugliani et al. 2010). Clinicamente é possível se distinguir alguns grupos de MPS de outros se baseando em achados em comum, que dependem do substrato acumulado. Os pacientes com acúmulo de Heparan Sulfato (MPS I, II, III, VII) podem apresentar alterações no sistema nervoso central, manifestando-se pelo atraso psicomotor. O acúmulo de Dermatan Sulfato ou Keratan Sulfato (MPS I, II, IV, VI, VII) parece estar relacionado a anormalidades esqueléticas e articulares, como disostose multiplex, baixa estatura e rigidez articular, assim como doenças cardiovasculares.

O diagnóstico e o tratamento precoce da doença melhoram o prognóstico nas MPS para as quais existem alternativas de tratamento (Kothapalli et al. 2005). Tendo em vista que os GAGs não degradados se acumulam e sua quantidade em excesso é excretada na urina dos pacientes (Byers et al. 1998), a triagem inicial após suspeita clínica de MPS pode ser realizada por análise de GAGs na urina. Porém, o diagnóstico definitivo da doença é dado por ensaios de atividade enzimática em fibroblastos, leucócitos ou plasma de pacientes com suspeita clínica.

A Mucopolissacaridose tipo I

A Mucopolissacaridose tipo I (MPS I) é uma doença autossômica recessiva causada pela deficiência de atividade de α -L-iduronidase (IDUA) resultando no acúmulo dos GAGs Heparan e Dermatan Sulfato no lisossomo (Bach et al. 1972). Como consequência, a doença resulta numa disfunção celular progressiva, crônica e multissistêmica (Neufeld and Muenzer 2001).

Historicamente, a MPS I tem sido classificada de acordo com os sinais clínicos apresentados nos pacientes como: Síndrome de Hurler, Síndrome Hurler-Scheie ou Síndrome de Scheie, embora hoje se considere que a doença apresenta um espectro contínuo de fenótipos.

A forma fenotípica mais grave de MPS I (Síndrome de Hurler) é caracterizada pelo desenvolvimento neurocognitivo prejudicado, engrossamento progressivo de características faciais, organomegalia, insuficiência respiratória, doenças cardiovasculares, opacidade da córnea, degeneração da retina, e manifestações musculoesqueléticas, tais como rigidez articular e disostose multiplex. Os sintomas surgem após o nascimento e progridem rapidamente, podendo levar à morte dos pacientes não tratados na primeira década de vida (Pastores et al. 2007; Tolar and Orchard 2008; Giugliani et al. 2010).

Os pacientes com a forma intermediária (Síndrome de Hurler-Scheie) apresentam, em geral, manifestações fenotípicas menos graves em comparação à forma severa, com deficiência cognitiva leve ou inexistente. A expectativa de vida neste subtipo se reduz até a segunda ou terceira década de vida quando não tratados (Pastores et al. 2007; Giugliani et al. 2010).

Já na forma mais leve (Síndrome de Scheie), os sintomas apresentam-se tardiamente na vida e progridem lentamente. Os pacientes têm inteligência normal e sobrevivem até a idade adulta (Pastores et al. 2007).

Tratamentos disponíveis para a MPS I

Atualmente, os principais tratamentos disponíveis se baseiam no conhecimento de que as enzimas lisossômicas podem ser secretadas e captadas pelas células vizinhas via receptores de manose-6-fosfato. Estes tratamentos compreendem o transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) e a terapia de reposição enzimática (TRE), ambas dirigidas à restauração da atividade enzimática comprometida (Tolar and Orchard 2008). Além dessas abordagens, outras alternativas de tratamentos estão sendo testadas tanto em fase

experimental *in vitro* assim como ensaios pré-clínicos em animais (Giugliani et al. 2016).

O tratamento com TCTH consiste na ablação da medula do paciente e utilização de células-tronco da medula óssea ou de cordão umbilical de um doador sem MPS, para a reconstituição do sistema hematopoiético. Quando bem-sucedido, o TCTH pode prevenir e/ou reverter muitas, mas não todas, das características clínicas presente na MPS I. Este é o tratamento de escolha para crianças com a forma mais grave de MPS I. O tratamento deve ser realizado no início do curso da doença, antes do começo da deterioração do desenvolvimento cognitivo (geralmente antes dos 2 anos de idade), porém existe um risco significativo de morbidade e mortalidade associado (Cimaz and La Torre 2014). Em países como o Brasil, muitas vezes este tratamento não é possível de ser realizado devido ao diagnóstico tardio (Vieira et al. 2008).

O primeiro caso de TCTH alogênico realizado com sucesso envolveu um menino de um ano de vida com a forma grave de MPS I na década de 1980. Em geral, um dos benefícios mais importantes deste tratamento é a preservação do desenvolvimento intelectual, o aumento da sobrevida dos pacientes, e a redução de boa parte das alterações somáticas. No entanto, alterações esqueléticas, visuais e nas válvulas cardíacas foram reportadas como tendo pouca melhora após o transplante (Aldenhoven et al. 2008).

Outro tratamento atualmente disponível é a TRE. A TRE para MPS I consiste na administração periódica (semanal ou quinzenal) de Laronidase (Genzyme Corporation, Cambridge, MA), uma proteína análoga à alfa-L-iduronidase humana. Esta enzima recombinante tem sido amplamente difundida para o tratamento das formas menos graves de MPS I. Os pacientes tratados com TRE demonstram melhoras clínicas das manifestações somáticas e também na qualidade de vida (Martins et al. 2009; Al-Sanna et al. 2015).

Estudos com modelos animais de MPS I e estudos clínicos indicam que é improvável que as doses administradas na TRE atinjam níveis terapêuticos que atravessem a barreira hematoencefálica, para corrigir a patologia do SNC e melhorar a função cognitiva (Tolar and Orchard 2008; Cimaz and La Torre 2014).

A terapia com a enzima, da mesma maneira que o TCTH, parece não corrigir as alterações presentes nas válvulas cardíacas, na aorta ou as anormalidades esqueléticas. Melhoras na função do miocárdio geralmente ocorrem, mas não são completas, assim como acontece com as articulações (Sifuentes et al. 2007; Valayannopoulos and Wijburg 2011; Al-Sannaa et al. 2015). O início precoce da terapia, antes do estabelecimento dos danos irreversíveis, pode ser mais eficaz em retardar a progressão da doença (Muenzer et al. 2009; Cimaz and La Torre 2014; Al-Sannaa et al. 2015).

Outros problemas relacionados com a TRE envolvem o alto custo desta terapia, a necessidade de infusões repetidas, e a formação de anticorpos contra a enzima, que ocorre em cerca de 90% dos pacientes com MPS I (Brooks et al. 2003). Todas estas limitações e desvantagens têm levado à busca de novas terapias, algumas focadas em novos alvos terapêuticos baseadas na patogênese da doença.

Modelos animais para MPS I

Inúmeras questões relacionadas à fisiopatogênese da doença ainda não foram respondidas. Modelos animais tornam possível investigar as diferentes questões e tem sido amplamente utilizados tanto para elucidar a fisiopatogênese de doenças humanas, assim como para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas.

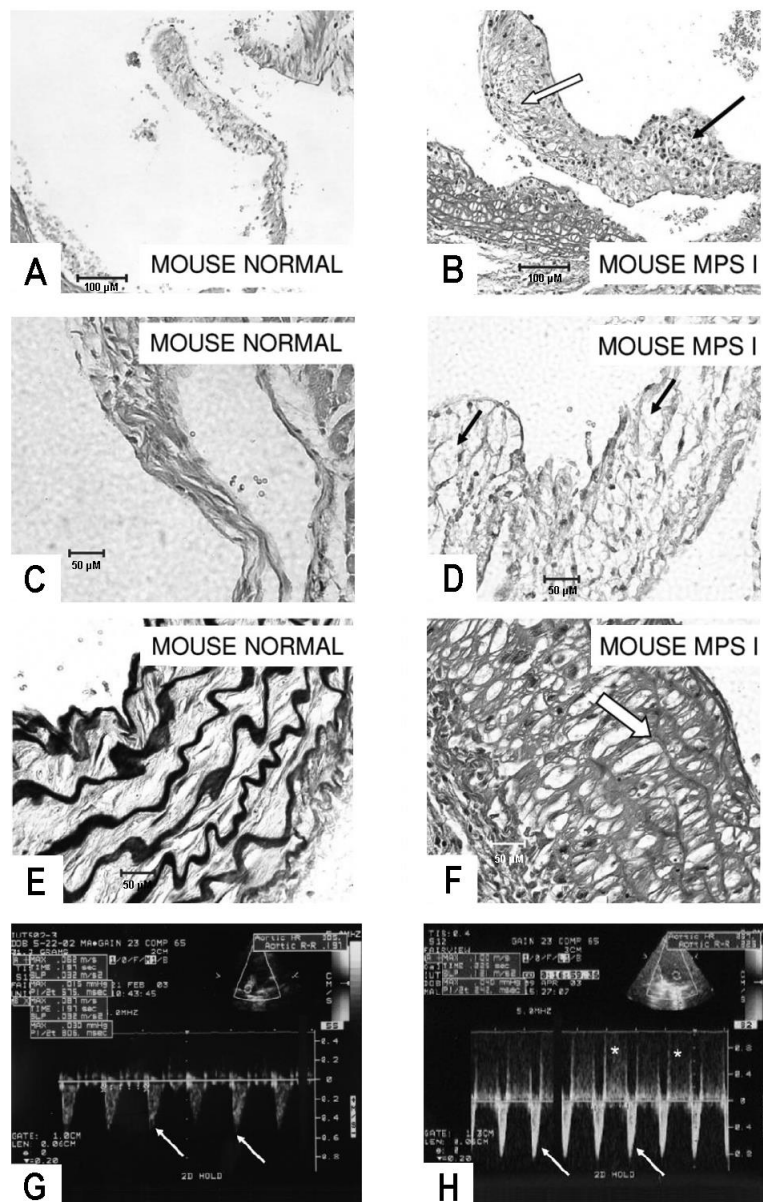
Os primeiros modelos murinos de MPS I foram criados pela disrupção direcionada do locus *Idua* e representam a forma grave da doença. Os animais *Idua* *-/-*, homozigotos mutantes, não apresentam atividade enzimática de IDUA e mostram um incremento nos níveis de GAGs na urina (Clarke et al. 1997; Ohmi et al. 2003).

Atualmente existem três modelos murinos de MPS I desenvolvidos tanto pela interrupção do gene *Idua* quanto pela inserção de uma mutação análoga à mais frequentemente encontrada nos pacientes e associada ao fenótipo grave da

doença (p.W402X) (Clarke et al. 1997; Ohmi et al. 2003; Wang et al. 2010). O modelo utilizado neste trabalho foi criado em 2003 (Ohmi et al. 2003) através da interrupção do gene *Idua* por um cassete contendo o gene de resistência à neomicina em células-tronco embrionárias de camundongos. Assim, há completa supressão da produção da proteína IDUA.

Estudos seguintes utilizando os modelos murinos identificaram que, mesmo não sendo fenocópias completas da doença humana, eles mimetizam muitas das manifestações somáticas tanto do SNC, como das vísceras (Russell et al. 1998; Tolar and Orchard 2008). As manifestações cardíacas desses modelos (Figura 1) incluem insuficiência aórtica, aumento do ventrículo esquerdo, e diminuição da função ventricular. Espessamento das válvulas assim como dilatação aórtica com quebras de elastina, também foram reportadas em animais com 6 e 10 meses de idade (Jordan et al. 2005; Braunlin et al. 2006; Ma et al. 2008; Baldo et al. 2013). Diversos trabalhos têm descrito alterações ósseas como espessamento do fêmur, alterações oculares, auditivas e comportamentais, entre outras (Pan et al. 2008; Metcalf et al. 2010; Baldo et al. 2012). O conhecimento e a caracterização destas alterações no modelo animal permitiram que este também fosse usado para verificar eficácia de novos tratamentos para MPS I em estágios pré-clínicos (Metcalf et al. 2010).

Figura 1: Manifestações cardíacas em animais MPS I avaliadas por técnicas histológicas e ecocardiográficas. As válvulas aórtica (A-B) e atrioventriculares (C-D) encontram-se marcadamente espessadas nos camundongos MPS I. Múltiplas áreas de deposição intracelular de GAGs (setas pretas) podem ser encontradas. (E-F) Coloração Van Gieson identifica quebras na estrutura da elastina (setas brancas). (G, H) Sinal Doppler da válvula aórtica. As setas representam o sinal de velocidade de fluxo aórtico. O fluxo regurgitante através da válvula aórtica é identificado (asterisco) em camundongos MPS I de 6-10 meses de idade. (fontes: (Braunlin et al. 2006).

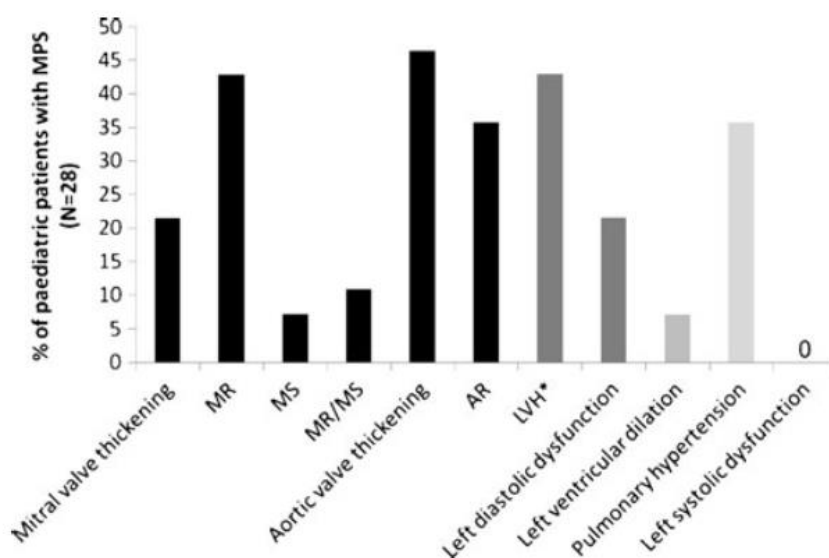


MPS I e a doença cardíaca

O comprometimento cardíaco tem sido descrito em pacientes com todos os tipos de MPS (Dangel 1998; Neufeld and Muenzer 2001; Braunlin et al. 2011) afetando principalmente as válvulas, miocárdio, artérias coronárias e grandes vasos (Figura 2). Diferentes estudos têm indicado que a doença cardiovascular pode apresentar-se mais cedo, com maior frequência e gravidade nas MPS que apresentam acúmulo de dermatan sulfato (MPS I, II e VI) possivelmente porque ele naturalmente forma parte das válvulas e os vasos sanguíneos (Dangel 1998; Leal et al. 2010).

Nas MPS I, a doença cardíaca é comum e apresenta gravidade dependente da idade (Giugliani et al. 2007; Muenzer et al. 2009; Braunlin et al. 2011). Em geral, em pacientes com síndrome de Hurler, a patologia cardíaca se desenvolve mais cedo e progride mais rápido, enquanto que as formas mais atenuadas de MPS I pode ter início tardio com progressão lenta (Braunlin et al. 2011). Anomalias anatômicas e funcionais das válvulas cardíacas, hipertrofia ventricular esquerda, cardiomiopatias, e anomalias nas artérias coronárias são algumas das manifestações comumente achadas nos pacientes (Mohan et al. 2002). Outras das manifestações cardíacas incluem a dilatação da aorta ascendente e a perda de sua elasticidade (Nemes et al. 2008; Bolourchi et al. 2016). A regurgitação mitral parece ser a lesão valvular mais comum e particularmente a primeira anormalidade cardíaca a aparecer, embora o mesmo também aconteça na válvula aórtica (Fesslová et al. 2009). Estas e outras anomalias cardíacas podem contribuir para o desenvolvimento da insuficiência cardíaca, uma das causas principais de morte em pacientes com MPS (Yano et al. 2009).

Figura 2: Frequência das principais anormalidades cardíacas e valvulares encontradas em pacientes com todos tipos de MPS. (Fonte: Braunlin et al., 2011). MR-regurgitação da válvula mitral; MS- estenose da mitral. MR/MS- ambas; AR-regurgitação da válvula aórtica. LVH- hipertrofia de ventrículo esquerdo (paredes septal e posterior).



A Matriz Extracelular e suas alterações na MPS

Embora a patogênese das MPS não seja completamente compreendida, algumas das manifestações cardíacas podem ser explicadas pelo simples acúmulo progressivo de GAGs (ex. espessamento das estruturas). Porém, cada vez mais trabalha-se com a hipótese de que as alterações no metabolismo de GAGs desencadeiam processos celulares anormais que contribuem para a patogênese da doença (Braunlin et al. 2011).

A composição da matriz extracelular (ECM) possui papel fundamental na função da parede cardiovascular e na homeostase valvular (Cheng et al. 2012), e alterações na matriz encontram-se diretamente relacionadas com a patogênese cardíaca observada na MPS. No entanto, antes de observarmos como alterações

nesta estrutura podem ser importantes para a patogênese da MPS, algumas informações sobre a ECM do sistema cardiovascular normal, são essenciais.

A ECM é formada por uma rede complexa composta de diferentes tipos de proteínas como o colágeno, elastina, glicoproteínas e proteoglicanos, entre outros. Sua função principal é prover aos tecidos as diferentes propriedades mecânicas e bioquímicas específicas (Gelse et al. 2003). O desequilíbrio no *turnover* das proteínas da ECM pode conduzir a diferentes transtornos cardíacos como estenoses, hipertrofia do ventrículo esquerdo, aneurisma e falha cardíaca (Spinale 2002; Nagase et al. 2006; Cleutjens and Creemers 2016). Estas alterações têm sido atribuídas à perda do controle de enzimas proteolíticas que degradam os principais componentes da ECM, tais como o colágeno e a elastina. O aumento na atividade destas proteases posterior ao defeito primário tem sido descrito como um possível mecanismo patológico presente nas MPS (Ma et al. 2008; Metcalf et al. 2010; Baldo et al. 2011; Bigg et al. 2013).

A composição e estrutura da ECM variam consideravelmente entre os diferentes tipos de tecidos, dando lugar a características funcionais e biológicas únicas de acordo com a localização e o requerimento específico destes.

A matriz do miocárdio é constituída principalmente por colágeno, que mantém sua integridade funcional (Bishop et al. 1990). As válvulas cardíacas estão formadas por uma ECM compartimentalizada em diferentes camadas, ricas em elastina, proteoglicanos e colágeno, sendo esta estrutura essencial para a funcionalidade do tecido (Combs and Yutzey 2009; Hinton and Yutzey 2011). Já na ECM vascular, o colágeno e a elastina são os principais componentes das paredes arteriais dos grandes vasos, tais como a aorta (Cattell et al. 1996). Cada componente provê as propriedades estruturais e biomecânicas necessárias para realizar as funções específicas de cada órgão. As fibras de elastina e o colágeno fibrilar tipo I e III (os mais abundantes no tecido cardiovascular) formam a rede rígida da matriz intersticial altamente reticulada. Eles oferecem elasticidade (elastina) e a resistência à tração e rigidez (colágeno). Os proteoglicanos, devido à sua carga negativa, atraem água e conferem resistência à compressão. Finalmente, glicoproteínas participam na organização matricial e são essenciais

para a fixação das células (Didangelos et al. 2010). Por terem papéis tão definidos, a expressão, regulação, ou distribuição anormal de proteínas do ECM tem sido associada com anormalidades no desenvolvimento e a enfermidades. Na MPS I, tanto alterações como quebras de elastina quanto a perda de colágeno já foram descritas na aorta, válvulas cardíacas e mesmo em outros órgãos, como as articulações (Ma et al. 2008; De Oliveira et al. 2013; Baldo et al. 2013).

A clivagem dos componentes da ECM é um processo crítico durante o seu remodelamento, e permite a regulação da sua abundância, composição e estrutura (Bonnans et al. 2014). Este processo pode ser realizado por diferentes famílias de proteases. As metaloproteinases da matriz (MMP) constituem as principais enzimas envolvidas na degradação de proteínas da ECM. Em condições normais, a atividade destas proteases é baixa, mas se elevam em processos de remodelamento, crescimento e reparação (Jugdutt 2003; Bonnans et al. 2014), assim como em doenças e inflamação tecidual. Estudos em animais MPS I e VII têm demonstrado a superexpressão de MMPs, como a MMP-12, na aorta (Metcalf et al. 2010). No entanto, o mecanismo pelo qual esta expressão aumentada acontece não é conhecido.

Além disso, as catepsinas também podem participar na degradação das proteínas da ECM. Elas compreendem uma família de proteases sintetizadas como precursores enzimáticos que são ativadas no interior do lisossomo. Sua principal função é a degradação de proteínas que chegam ao lisossomo desde fora da célula (via endocitose ou fagocitose) ou de outros compartimentos celulares (autofagia) (Bohley and Seglen 1992; Mort and Buttle 1997; Lutgens et al. 2007). Situações nas quais as catepsinas são secretadas para podem causar degradação das proteínas da ECM (Green and Lund 2005), embora muitas células possam inclusive internalizar certos componentes da ECM, como o colágeno, e degradá-los nos lisossomos (Mohamed and Sloane 2006).

As catepsinas na patogênese da MPS

Pelas suas características, além da sua função principal na degradação proteolítica fisiológica, as catepsinas têm sido relacionadas com uma grande variedade de processos fisiológicos e patológicos na última década (Conus and Simon 2008). A desregulação na expressão e na atividade de catepsinas parece estar associada com diversas condições patológicas como a artrite reumatoide e arteriosclerose, a progressão de tumores e metástases (Roshy et al. 2003; Conus and Simon 2008) e a dilatação cardíaca (Ge et al. 2006).

Nas MPS, evidências de aumento na expressão de catepsina B, S e K tem sido demonstradas na aorta e válvulas de animais com MPS I e VII (Ma et al. 2008; Metcalf et al. 2010; Bigg et al. 2013). Devido a elevada atividade de elastase no pH neutro e sua superexpressão, foi proposto que a catepsina S poderia ser o principal responsável pela perda de elasticidade observada na aorta de animais MPS. No entanto, Baldo et al. (2011) demonstraram que tanto a catepsina S como a MMP-12 não são essenciais para a dilatação aórtica na MPS VII, e que outras catepsinas superexpressas, tais como a catepsina B, poderiam ter um papel fundamental.

A catepsina B é uma conhecida cisteína protease lisossômica envolvida em muitos processos de remodelação da matriz extracelular. Esta enzima é codificada pelo gene *Ctsb* e pela base da estrutura da região promotora e seu perfil de expressão, trata-se de um gene *housekeeping* (Qian et al. 1991). A catepsina B é sintetizada como pré-pró-catepsina B e já no retículo endoplasmático sofre uma remoção do peptídeo-sinal tornando-a pró-catepsina. No aparato de Golgi, a enzima é modificada pós-traducionalmente (glicosilação) e dirigida ao compartimento lisossomal por meio de receptores de manose-6-fosfato. Uma vez no lisossomo, o pH ácido permite a liberação do pró-peptídeo e ativação da enzima (Mort and Buttle 1997; Turk et al. 2000). No entanto, a remoção proteolítica do pró-peptídeo também pode ser realizada pela ação de diversas proteases, como a catepsina D, ou de forma autocatalítica sob condições ácidas (Rowan et al. 1992; Mach et al. 1994). Portanto, a proteólise controlada é

uma etapa crucial no controle da atividade proteolítica das catepsinas, assim como de numerosas outras proteases (Turk et al. 2000).

A atividade da catepsina B é dependente principalmente do pH, sendo otimamente ativa no pH ligeiramente ácido e instável em pH neutro. No entanto, certos GAGs podem ligar-se especificamente à catepsina B e desta forma protegê-la da inativação no pH alcalino (Costa et al. 2010). Esta interação também pode potencializar a atividade endopeptidase da catepsina B aumentando até 5 vezes a vida média da enzima no pH alcalino (Almeida et al. 2001).

A atividade de protease das catepsinas é normalmente desenvolvida no interior do lisossomo, mas a sua localização extralisossomal e extracelular coincide geralmente com o aumento da expressão e/ou atividade, indicando que não somente o pH é responsável pela sua atividade (Turk et al. 2012). Diversos estudos demonstram que a catepsina B extracelular consegue degradar os principais componentes da ECM tanto no pH neutro e como no pH ácido, incluindo substratos como elastina e colágeno (Buck et al. 1992; Turk et al. 2012). Esta atividade do tipo elastase e colagenase é responsável pela remodelação da ECM contribuindo assim com as diversas patologias quando desregulada.

Foi demonstrado que a catepsina B encontra-se altamente expressa e ativa em aortas de camundongos MPS I e cachorros MPS I e MPS VII. Sugeriu-se que esta enzima poderia estar associada ao incremento das quebras na estrutura de elastina que conduzem ao aneurisma aórtico nestas doenças (Baldo et al., 2011). Aumentos na expressão e na atividade de catepsina B também têm sido descritos nas válvulas de cachorros com MPS VII (Bigg et al. 2013) e camundongos com MPS I, bem como no miocárdio destes animais (Baldo, G comunicação pessoal). Além disso, por se tratar de uma colagenase, sugere-se que poderia estar relacionada com a perda de colágeno nestas estruturas (Baldo, G comunicação pessoal). Estas evidências reforçam a idéia de que a catepsina B poderia ser um dos principais responsáveis pelas alterações na estrutura e função do sistema cardiovascular nas MPS.

Diversos estudos têm utilizado diferentes inibidores de catepsina B para determinar a função biológica desta enzima *in vivo*. Neste sentido, o Ca-074 metil éster (Ca-074Me) foi produzido como um inibidor seletivo da catepsina B capaz de difundir passivamente pela membrana plasmática (Buttle et al. 1992; Montaser et al. 2002). Em contraste com outros compostos, tem sido demonstrado que Ca-074Me pode inibir até 95% da atividade da catepsina B (Buttle et al. 1992). Estudos utilizando matriz extracelular reconstituída indicam que a inibição de catepsina B via Ca-074Me em modelo *in vitro* de tumores malignos, reduz a sua invasão; sugerindo uma importante função para a catepsina B na degradação da matriz (Szpaderska and Frankfater 2001).

Baseado nestes achados, uma abordagem farmacológica utilizando este inibidor (Ca-074Me) poderia colaborar na elucidação da função da catepsina B na patologia cardiovascular presente no modelo murino de MPS I.

CAPITULO II OBJETIVOS

Objetivo geral

O objetivo principal deste trabalho foi verificar os efeitos do uso de um inibidor de catepsina B sobre a doença cardiovascular em camundongos com Mucopolissacaridose tipo I.

Objetivos específicos

- Caracterizar a doença cardiovascular em animais MPS I de 6 meses de idade quanto a quebras na elastina na aorta ascendente, dilatação na aorta e no miocárdio, funcionalidade do miocárdio e espessamento de válvulas.

- Medir a atividade de elastase e colagenase em homogeneizados de coração e aorta de animais normais e MPS I.

- Em fibroblastos de pacientes normais e MPS I cultivados, verificar a localização intracelular da catepsina B e a existência de escape da mesma para fora do lisossomo.

- Avaliar a atividade de catepsinas totais e de catepsina B nos diferentes tecidos cardíacos em animais normais, MPS I, tratados com o inibidor da enzima ou apenas com seu veículo de diluição;

- Mensurar a dilatação da aorta e quantificar quebras de elastina nos diferentes grupos após tratamento;

- Avaliar a espessura das válvulas cardíacas após tratamento;

- Comparar dimensões e função cardíaca, utilizando técnicas ecocardiográficas, em animais tratados versus não-tratados.

CAPITULO III MANUSCRITO

Cathepsin B inhibition attenuates cardiovascular pathology in MPS I mice

Manuscrito a ser submetido para o jornal "Basic Research in Cardiology"

Cathepsin B inhibition attenuates cardiovascular pathology in MPS I mice

Esteban Alberto Gonzalez^{1,2}, Gisele Renata Martins², Angela Maria Vicente Tavares³, Michelle Viegas², Edina Poletto^{1,2}, Roberto Giugliani^{1,2}, Ursula Matte^{1,2},
Guilherme Baldo^{1,2,3}

1. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular-UFRGS
2. Centro de Terapia Genica-HCPA
3. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia- UFRGS

Corresponding author:

Guilherme Baldo

Centro de Terapia Genica- HCPA

Ramiro Barcelos, 2350

Porto Alegre-RS Zip code: 900.350-903

Email: gbaldo@hcpa.edu.br

Abstract:

Mucopolysaccharidosis type I is a lysosomal storage disorder with multisystemic features, including heart enlargement, heart valve dysfunction, and aortic stiffness and dilatation. Previous studies have shown that MPS I mice overexpress cathepsin B in multiple tissues, including those from the cardiovascular system. Here we hypothesized that inhibition of cathepsin B could ameliorate heart, aorta and valve abnormalities found in MPS I.

Firstly we found that total elastase activity in MPS I aorta is elevated. Following that, we demonstrated that cathepsin B leaks from the lysosome in MPS I fibroblasts, and therefore could be degrading extracellular matrix components from aorta, heart, and heart valves. We then used a cathepsin B inhibitor *in vivo* in MPS I mice. After 4 months of treatment, partial inhibition of cathepsin B activity in treated mice reduced aortic dilatation, as well as heart valve thickening and lead to improvements in echocardiographic parameters, although none of these were completely normalized. Based on these results, we conclude that alterations in the lysosome in this disease lead to leakage of cathepsin B to outside the organelle, where this protein can have multiple pathological roles. Cathepsin B activity may be, at least in part, responsible for the cardiovascular abnormalities observed in this disease. This study highlights for the first time the possibility of using cathepsin inhibitors as a therapeutic agent in a lysosomal storage disease.

Introduction

Mucopolysaccharidosis type I (MPS I) is an autosomal recessive disorder caused by deficiency of lysosomal enzyme alpha-L-iduronidase (IDUA), which is involved in the catabolism of glycosaminoglycans (GAG) heparan and dermatan sulphate. The disease is characterized by multiple organ dysfunction, which includes organomegaly, bone and joint deformities, short stature, facial features and in severe cases, mental retardation. Death can occur from multiple causes in the first decades of life.

Heart and valve disease are present in all MPS and death from heart failure is common. MPS I patients suffer from heart enlargement and loss of contractility (Nemes et al. 2008), heart valve thickening and regurgitation, and aortic stiffness and dilatation (Braunlin et al. 2011; Schroeder et al. 2012). Studies in animal models (both dogs and mice) have shown that MPS I animals have enlarged hearts with reduced contractility, dilated ascending aortas with increased elastin breaks, and heart valve thickening and regurgitation (Baldo et al. 2011; Bigg et al. 2013; Baldo et al. 2013).

The extracellular matrix (ECM) plays many roles in cardiovascular wall and valve homeostasis (Cheng et al. 2012). Elastin and collagen are the main compounds of the cardiovascular ECM and play a vital role in biomechanical and functional properties in myocardium, aorta and heart valves. Although the proportions of elastin and collagen vary considerably in these tissues, distribution and properties of these connective tissue proteins are important for structural integrity and function. An imbalance in the turnover of ECM proteins in the myocardium and vasculature can lead to heart disorders such as stenosis, left ventricular hypertrophy, heart failure and aortic aneurysm (Spinale 2002; Nagase et al. 2006; Cleutjens and Creemers 2016). These changes have been attributed to lack of control of proteolytic enzymes that degrade the major components of the ECM. The increase in protease activity (especially in cathepsin B) subsequent to the primary defect has been described as a possible pathological mechanism present

in different types of MPS (Ma et al. 2008; Metcalf et al. 2010; Baldo et al. 2011; Bigg et al. 2013).

Cathepsin B (CtsB) is a lysosomal protease pH-dependent responsible for normal proteolytic degradation that can degrade ECM components in controlled remodeling processes. Several studies indicate imbalances in production and activity of this enzyme as responsible of many different diseases. Recently it was demonstrated that this enzyme is overexpressed and maintains high activity in cardiovascular tissues of MPS I and MPS VII animal models (Metcalf et al. 2010; Baldo et al. 2011; Bigg et al. 2013). Therefore, it is possible that abnormalities in the structure of the elastin and collagen that lead to cardiac dysfunction in MPS is due to overexpression of CtsB.

Based on these studies, the present work was designed to verify the effects of using a pharmacological inhibitor of CtsB to evaluate the role of this enzyme on cardiac dysfunction in MPS I mice.

2. Materials and Methods

2.1 *In vitro* assay

2.1.1 Immunofluorescence

Skin fibroblasts from human MPS I patients and normal controls were obtained from patients referred to our institution after informed consent. The cells were grown in DMEM with 10% FCS and after culture was established, an aliquot of 1×10^4 cells were cultured on a 6-well plate for 24h. Subsequently they were fixed and permeabilized in methanol for 10 min. Successive washes were performed with phosphate buffered saline (PBS) and blocking with 2% bovine serum albumin (BSA) in PBS. Cells were incubated overnight (at -4°C) with monoclonal anti-cathepsin B (ab58802; Abcam) and polyclonal anti-Lamp-1 (sc8098; Santa Cruz Biotechnology) antibodies diluted in BSA. After this, cells were washed 3 times with buffer, and then incubated for 1h at room temperature with secondary antibody: Goat anti-Mouse IgG (H+L) FITC conjugated and Rabbit anti-Goat IgG (H+L) Alexa Fluor® 555 conjugated. After antibody labeling, cells were washed 4 times in PBS, incubated in Fluoroshield with DAPI and washed again in PBS and distilled water. Cells were observed with a confocal laser-scanning microscope.

2.1 *In vivo* experiments

2.1.1 Animals

All animal studies were approved by our ethics committee and MPS I mice on a C57BL/6 background were used. Animals were genotyped at 21 days of life using specific primers as previously described (Baldo et al. 2012). MPS I (Idua $-/-$) both male and female mice were used.

Animals were assigned to four groups: Group I (Normal), Idua $+/-$ mice (n=10); Group II (MPS), untreated Idua $-/-$ mice (n=12); Group III (Vehicle), Idua $-/-$ mice treated daily with vehicle (10% DMSO; Nuclear, Brazil) for 12 weeks (n=6); Group IV (Ca-074Me), Idua $-/-$ mice treated with cathepsin B inhibitor (Ca074-Me;

Apexbio, USA) 10mg/kg/day for 16 weeks (n=6). All animals were kept under standard housing conditions, on cycles of 12h light / 12 h night, with temperature ($19 \pm 1^\circ\text{C}$) and humidity controller ($50 \pm 10\%$). All mice were sacrificed at 6 months.

2.1.2 Treatment

The inhibitor was prepared in a stock solution at a concentration of 10 mg/ml in dimethyl sulfoxide (DMSO). The management solution was diluted 1:10 in saline and administered at dosage of 10mg/kg/day. Group III mice received equal volume of vehicle (DMSO 10% in saline). Treatment by intraperitoneal injection begun at 8 weeks of age and continued for 16 weeks.

2.1.3 Elastase activity assay

For elastase assay samples were homogenized in buffer (100 mM Tris HCl, pH 8 to 25°C) at 0.2 μg tissue/ μl for heart samples or 50 μl of solution for aortic samples. Elastase activity was measured using substrate N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-*p*-nitroanilide (Sigma-Aldrich, USA) in a continuous spectrophotometric rate determination. Substrate solution (4,4mM SucAla₃-*p*NA solution) was prepared in Tris-HCl buffer. The amount of product was determined by absorbance using kinetic reading and comparison with 0.02 units of elastase solution from porcine pancreas (Sigma-Aldrich, USA). Readings were performed for 2 h every 5 min at A₄₁₀ nm. The results were expressed as U/mg protein. One unit of elastase hidrolizes 1 nmole of N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-*p*-nitroanilide per hour at pH 7.5 at 25° .

2.1.4 Collagenase activity assay

For collagenase assay samples were homogenized in buffer (50 mM Tricine with 10mM Calcium Chloride and 400nM Sodium Chloride, pH 7.5 to 25°C) at concentracion 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Collagenase activity was measured using FALGPA substrate (1mM N (3-[2Furil]acryloyl)-Leu-Gly-Pro-Ala solution in buffer) (Sigma-

Aldrich, USA) in a continuous spectrophotometric rate determination. The amount of product was determined by absorbance using kinetic reading and comparison with 0.2 units of collagenase solution from *Clostridium histolyticum* (Sigma-Aldrich, USA). Readings were performed by recording the decrease in A345 nm for 2h for every 5 min. The results were expressed as U/mg protein. One unit of collagenase hydrolyzes 1 nmole of FALPA per hour at 25° at pH 7.5 in presence of calcium ions.

2.1.5 Cathepsin activity assay

Cathepsin B activity was measured in pH 7.4 using the specific fluorimetric substrate Z-Arg-Arg-AMC (Enzo Life Sciences, USA). Samples were homogenized in acetate buffer (100 mM sodium acetate, 0,1% Triton X, EDTA 2,5 mM, DTT 2,5mM pH 7.4) and incubated with the substrate at a final concentration of 50µM. Fluorescence was measured using Spectramax M3 every 5 min for 30 min at an excitation of 355nm and an emission 460nm using kinetic reading and comparison with 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) standards. Result were expressed as nmol/h/mg protein. Protein content of each sample was measured by the Lowry technique for all assays.

Total cathepsin activity was measured using the Z-Phe-Arg substrate (Enzo Life Sciences, USA) 10 µM at pH 7.4 with the same buffer and parameters used for CtsB assay. Inhibitors were from Calbiochem (San Diego, CA) and included cathepsin B inhibitor Ac-Leu-Val-Lysinal (#219385), cathepsin K inhibitor I [1,3-Bis (N-carbobenzoyloxy-L-leucyl) amino acetone; #219377] and cathepsin S Z-FL-COCHO (#219393). The inhibitors were added to some assays in final concentrations of 1000nM or 100nM, as indicated. Result were expressed as nmol/h/mg protein.

2.1.6 Echocardiographic analysis

Animals underwent echocardiography at six-months, 3 days prior to euthanasia. Animals were anesthetized with isoflurane and placed in left lateral decubitus position to obtain cardiac images. An EnVisor HD System, Philips Medical (Andover, MA, USA), with a 12–4 MHz transducer was used, at 2 cm depth with fundamental and harmonic imaging. Images were captured by a trained operator with experience in mouse echocardiography. After the procedure, mice were allowed to recover and monitored for 1h.

Left ventricular (LV) dimensions from diastolic and systolic transverse areas (cm²) were obtained by tracing the endocardial border at three levels: basal (at the tip of the mitral valve leaflets), middle (at the papillary muscle level) and apical (distal from the papillary muscle but before the final curve cavity). Likewise the dimensions of diastolic and systolic diameters (cm) were measured using the M-Mode, at three planes. Final value for each animal was obtained by taking the average of all three planes (Tavares et al. 2010). The assessment of LV systolic function was performed using the following equation: LV fraction shortening (LVFS) = (diastolic diameter – systolic diameter) / diastolic diameter × 100.

2.1.7 Aortic measures, tissue collection and histological analysis

At 6 months (at 16 weeks of treatment) mice were anesthetized with isoflurane, serum was collected by retro-orbital puncture and mice were euthanized by cervical dislocation. Measures from ascending aortas were captured using a pachymeter under magnifying glass. After that, all organs were isolated and divided in two parts. One was frozen in a -80°C freezer for biochemical analysis and the other portion was fixed in buffered formalin.

Organs were processed and embedded in paraffin according to our hospital's routine. For paraffin-embedded, 5µm-thick sections of heart valves were stained with Hematoxylin-Eosin (HE, for general structure), Alcian Blue (for GAG visualization) and Picrosirius-red (for collagen content) and analyzed. While thin

section of ascending aorta were stained with HE and Verhoef Van Gieson (VVG) which stains elastin in black.

Heart valves sections stained with Picrosirius-red were analyzed under polarized light to quantify and determine the collagen's intact structure. The sections were analyzed with polarized light, resulting in a yellow to red color for structurally-intact collagen due to its ability to rotate light, but no color for most proteins or collagen that is not intact (Bigg et al. 2013). For quantification of the collagen signal, photographs were taken at the same exposure. Valve regions were subtracted from image and analyzed using color threshold tool to determine red and yellow signal. Custom settings for each photograph were performed to capture all wanted signals. Collagen content was calculated as a percentage of the area with signal in relation with total valve area for each image. Mean intensity was determined by the average value of the intensity in the red channel and was used as a measure of collagen's intact structure. All analyses were performed using the ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

Thickness of the heart valves from the left ventricle in section stained with Alcian blue/HE was measured using Cell[^]F imaging systems software (Olympus, Europe), taking at least 8 measures from the valve and calculating the average.

Breaks in elastin fiber structure from ascending aorta section stained with VVG were analyzed for at least 3 different fields in at least 4 points each using Cell[^]F imaging systems software (Olympus, Europe). They were quantified as the number of breaks per mm of aorta.

2.1.8 Statistical analysis

SPSS Statistics software version 20.0 (IBM) was used for statistical analyzes. One-way ANOVA and Tukey's Post Hoc were perform to comparisons between all groups. Student t test was used in tests we had only 2 groups. Non-parametrical tests were used when indicated. Statistical tests were two-sided and P-values of <0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1 Characterization of cardiovascular abnormalities in MPS I mice

Firstly, we characterized the cardiovascular disease in MPS I mice at 6 months, comparing to normal mice.

MPS I aortas were dilated, at 167% of the diameter of the normal aortas ($1.79 \text{ mm} \pm 0.25$ vs $1.07 \text{ mm} \pm 0.12$; $p < 0.01$), full of white inclusions (due to GAG deposition) and presented increased elastin breaks, as well as increased aortic wall diameters.

Heart valves were thickened, on average 316% of normal valves ($79.7 \text{ } \mu\text{m}$ vs $25.7 \text{ } \mu\text{m}$; $p < 0.01$). Histological sections also showed the presence of large vacuoles indicating GAG storage highly evident in MPS I mice.

Systolic function at 6 months was markedly reduced in MPS I mice compared with normal mice. LVFS (36% vs 27% $p < 0.01$) indicated left ventricle insufficiency. The diameter in the left ventricle was increased by 28% and 14% ($p < 0.05$) in systole and diastole respectively, indicating heart enlargement. Representative images of the abnormalities can be found in Figure 1.

3.2 Elastase and collagenase activity

Since we observed increased elastin breaks in MPS I mice, next we measured total elastase activity in the tissues. Elastase activity was measured in aortic and heart samples using the substrate SucAla₃-pNA. Heart valves were not used for this experiment because due to their small size, it was not possible to collect enough tissue for this assay. At 6 months, MPS I aortic tissue had detectable levels of elastase activity compared to almost undetectable levels in normal mice (0.18 U/mg vs 0.02 U/mg ; $p = 0.02$). Heart tissue had similar levels of elastase activity in both groups (Fig. 2). Total collagenase activity was also not different in heart tissue (supplementary figure 1).

3.3 Immunofluorescence assay

Previous studies demonstrated elevated cathepsin B activity in MPS I tissues. However, to degrade extracellular matrix, this enzyme needs to be located outside the lysosomes. To determine the intracellular distribution of Cathepsin B, human fibroblasts from a MPS I patient were incubated with anti-Cathepsin B and anti-Lamp-1 antibody. Positive vesicles were visualized by immunofluorescence (IF) microscopy. Lamp-1-positive vesicles were localized mainly in the perinuclear region with some peripheral cytoplasmic staining. Some Cathepsin B staining colocalized with Lamp-1. However, at the same time, Cathepsin B-positive staining was observed in the cytosol, indicating its upregulation and leakage of this protease from the lysosomes (Fig. 3). In contrast, the normal controls showed a few lysosomal vesicles containing cathepsin b and almost no ctsB outside of the lysosome.

3.4 Aortic dilatation and structure

Based on the results shown so far, we decided to treat MPS I mice with Ca074Me, an irreversible inhibitor of cathepsin B. Treated mice presented aortas significantly better than untreated mice ($1.47 \text{ mm} \pm 0.14$), a 18% and 21% reduction in the diameter of the aortic root in relation to MPS I group ($p=0.04$) and DMSO group ($1.87 \text{ mm} \pm 0.22$; $p<0.01$), respectively. Although improved, they were still not normalized (38% increased in relation to normal group, $p<0.01$). On the other hand, DMSO group showed no significant differences with MPS I mice ($p=0.52$) (Fig. 4).

Ascending aortas were stained with HE and VVG to identify and quantify elastin breaks. VVG staining shows the elastin fibers in black and breaks were detected by loss of continuity. MPS I mice showed significant increase in the number of breaks per mm compared to normal mice ($p<0.01$). Treated mice showed intermediate levels, not being statistically different from either normal or MPS I mice. DMSO-treated mice had elastin breaks similar to untreated levels (Fig. 5).

3.5 Heart valve thickness and collagen structure

Similarly to what was observed in the aortas, treated mice presented a significant reduction in the thickness of the heart valves from the left ventricle, although they were not normalized ($p=0.02$) (Fig. 6). In MPS I mice, the collagen signal area relative to the total valve area was far lower (35% in normal vs 17% in untreated MPS I; $p=0.01$). Treated mice were between normal and untreated groups, without significance to both. Mean red signal (collagen signal intensity) was significantly reduced in MPS I in relation to the normal. Treated and DMSO groups showed intermediate results that did not have statistical difference between groups. (Fig. 7).

3.6 Heart dimensions and function

Echocardiographic analyses revealed that treated mice presented parameters of contractility (LVSF) similar to normal (36% in normal mice vs 40% treated mice, $p<0.05$ compared to untreated groups). In addition, heart dimensions in systole and diastole were similar to normal ($p>0.05$). At the time of sacrifice, hearts from treated mice were clearly smaller than DMSO and untreated animals (Fig. 8).

3.7 Cathepsin B activity

Aortic and heart tissues from mice were collected at 6 months and processed for analysis of cathepsin activity.

Cathepsin B activity in aortic tissue of untreated and DMSO-treated mice were highly elevated compared to normal (164 U/mg vs 76 U/mg; $p<0.01$). Similar results of cathepsin B activity were found in heart tissue (161 U/mg vs 20 U/mg; $p<0.01$). In animals treated with the inhibitor, we observed only a 15% reduction in CtsB activity in the aorta and a 65% in the heart tissue compared to untreated mice, although still highly elevated (1.8 fold and 2.7 fold, respectively) compared to normal mice.

We then analyzed total cathepsin activity in the tissue and results were similar to those found for CtsB assay. We used specific inhibitors of CtsB, CtsS and CtsK aiming to identify the cathepsin responsible for such activity. The use of CtsB inhibitor even at the lowest concentration of the assay blocked more than 90% of total cathepsin activity in both organs, confirming that most of the activity of cathepsins in these tissues were still due to cathepsin B, despite the use of the inhibitor in vivo (Figure 9).

4. Discussion

The cardiovascular abnormalities are an important component of the MPS disease spectrum, and are a major cause of morbidity and mortality in affected patients. Although current treatments (enzyme replacement therapy and hematopoietic stem cell transplant) are able to address several disease problems, the cardiovascular system is only partially improved (Braunlin et al. 2011). In special, the aorta and the heart valves seem to be hard to correct, and in most cases treated patients do not present improvements in these organs. Therefore, the study of the pathogenesis of heart disease in MPS is essential to develop treatments that are more efficient.

In the present work, we identified the aorta as a dilated structure with increased elastin breaks, as other studies have also shown (Ma et al. 2008; Baldo et al. 2013). In addition, we identified an increase in elastase activity in the aorta, which could explain the elastin breaks. However, it is important to point that, even in MPS aortas, the level of elastase activity was barely detectable, and the biological relevance of this finding is still uncertain. Even low, the chronic increase in the activity of elastases could explain why aortic dilatation progresses with time.

Cathepsin B was chosen as candidate despite the fact of not being a potent elastase or collagenase due to its high activity in the MPS I tissues, previously demonstrated, and because it is active at neutral pH (although not as stable as in acidic pH) (Baldo et al. 2011). However, in normal conditions it should be mainly confined within lysosomes in the perinuclear cytoplasmic region. Our first step was to observe its location in a MPS I cell. As fibroblasts proliferate in MPS I hearts (Renteria and Roberts 1976) and are easy to culture *in vitro*, we used human MPS I fibroblasts to perform the experiments. Co-localization with Lamp-1 showed that part of the enzyme is indeed within lysosomes, however clearly a green signal didn't colocalize with Lamp-1, suggesting leakage of lysosomal CtsB to outside the lysosome. In addition, we observe a enhanced signal to CtsB and a lysosomal distribution to the peripheral cytoplasmic and plasma membrane region or even excretion into the extracellular space. A previous study has shown that

abnormalities in MPS I lysosomes include leakage of enzymes (Pereira et al. 2010) to outside these organelles. Our results confirm that one of these enzymes is indeed CtsB, which can potentially degrade substrates outside the lysosomes in multiple pathological processes, including cancer and heart dysfunction (Ge et al. 2006; Gondi and Rao 2013).

In the present study, Ca-074Me treatment led to partial improvements in both aorta and heart valves. The aorta achieve partial improvements regarding to the diameter. Structural abnormalities on elastin fibers show intermediate values (not difference between normal or MPS I group). Although this reduction has not been sufficient to normalize, we verified small CtsB inhibition, suggesting a poor distribution of the inhibitor in this tissue, despite its high dose. Other treatments, such as ERT, also show difficulty of access in this tissue due to its low vascularization (Baldo et al., 2013). Therefore, we conclude that the low effectiveness of treatment is possibly due to poor inhibition and chronic effect of CtsB activity.

Cardiac valve are thickened in MPS I mice at 6 months (Baldo et al, personal communication). These pathologic alterations results in regurgitation and may lead to dysfunction(Braunlin et al. 2011). Our data indicate that Ca-074Me treatment decreased significantly the valve thickening, which may lead to improvements in valve function. However, changes in collagen metabolism and composition may contribute to modify the ventricular function (Bishop et al. 1990). Picrosirius-red and polarized light allowed us to quantify and determine the collagen structure in the valve (Rich and Whittaker 2005; Coen et al. 2013). MPS I valves presented less collagen by total valve area and greater impairment in its structure. Other groups have shown similar results in cardiac valve in MPS VII dog (Bigg et al. 2013). The treatment with Ca-074 showed discreet improvements in thickness (reduction) and in the collagen content (increase) although the results are still inconclusive. As cardiac valves in MPS I are difficult to correct by current therapies (Baldo et al. 2013), the results obtained regarding valve thickening may be very important.

Treatment was able to improve myocardial contractility, and reduced cardiac diameter, suggesting that inhibition of CtsB improves cardiac function and reduces heart enlargement in MPS I. Another similar study indicated that Ca-074Me attenuated cardiac dysfunction and remodeling following myocardial infarction (Liu et al. 2013). Our data show a significant reduction in CtsB activity in the treated mice. Although the activity CtsB was 2 fold higher than in normal mice, the reduction was sufficient to translate into a better organ function. This data suggests a better and more efficient distribution of the inhibitor in this tissue, when compared to the distribution in the aorta, and that cathepsin B has indeed a role in the heart enlargement observed in MPS I animal models and patients.

We also evaluated the possibility that other cathepsins were active and contribute to the cardiovascular pathogenesis in MPS I. CTsK and CtsS, are proteases overexpressed in MPS, known to have elastase and collagenase activity in the extracellular pH and therefore may participate in the degradation of ECM (Li et al. 2004; Brömme and Wilson 2011; Turk et al. 2012). Inhibition assay for these enzymes, demonstrated that cathepsin activity in MPS I aortas was primarily due to CtsB. Singularly CtsS inhibitor decreased total cathepsin activity in a dose-dependent manner but it indicates a non-specific inhibition and selectivity for cathepsin B ($K_i = 76$ nM) at high concentration. However, we cannot discard the possibility that cathepsin B activity contributes to the activation of other proteases, such as various MMPs (Gondi and Rao 2013). This MMPs have been reported to have high activity and can be involved in the degradation of ECM (Ma et al. 2008; Metcalf et al. 2010) so together they can contribute in pathological process.

Therefore, our study supports that cathepsin B has an important role in the remodeling of the ECM and the pathogenesis of cardiovascular disease in MPS I. The leakage to the cytosol or extracellular secretion may consequently degrade the ECM in cardiovascular organs. Inhibition of cathepsin B activity with Ca-074Me, may be bring benefits in organs of difficult access to current therapies, and may be explored as a potential therapeutic approach to be used in the MPS.

Figures

Figure 1: Representative figures of cardiovascular abnormalities in MPS I mice at 6 month. A-B) An example of the aortic diameter and thickness of aortic wall in HE staining in normal (A) and MPS I (B) mice. C-D) VVG stain indicating elastin breaks (arrows) in normal (C) and MPS I (D) mice. E-F) Thickening of the left ventricle heart valves and GAG storage in AB/HE staining in normal (E) and MPS I (F) mice. Arrows indicate GAG storage. G-H) Echocardiographic analysis of LV dimension obtained with M-mode in normal (G) and MPS I (H).

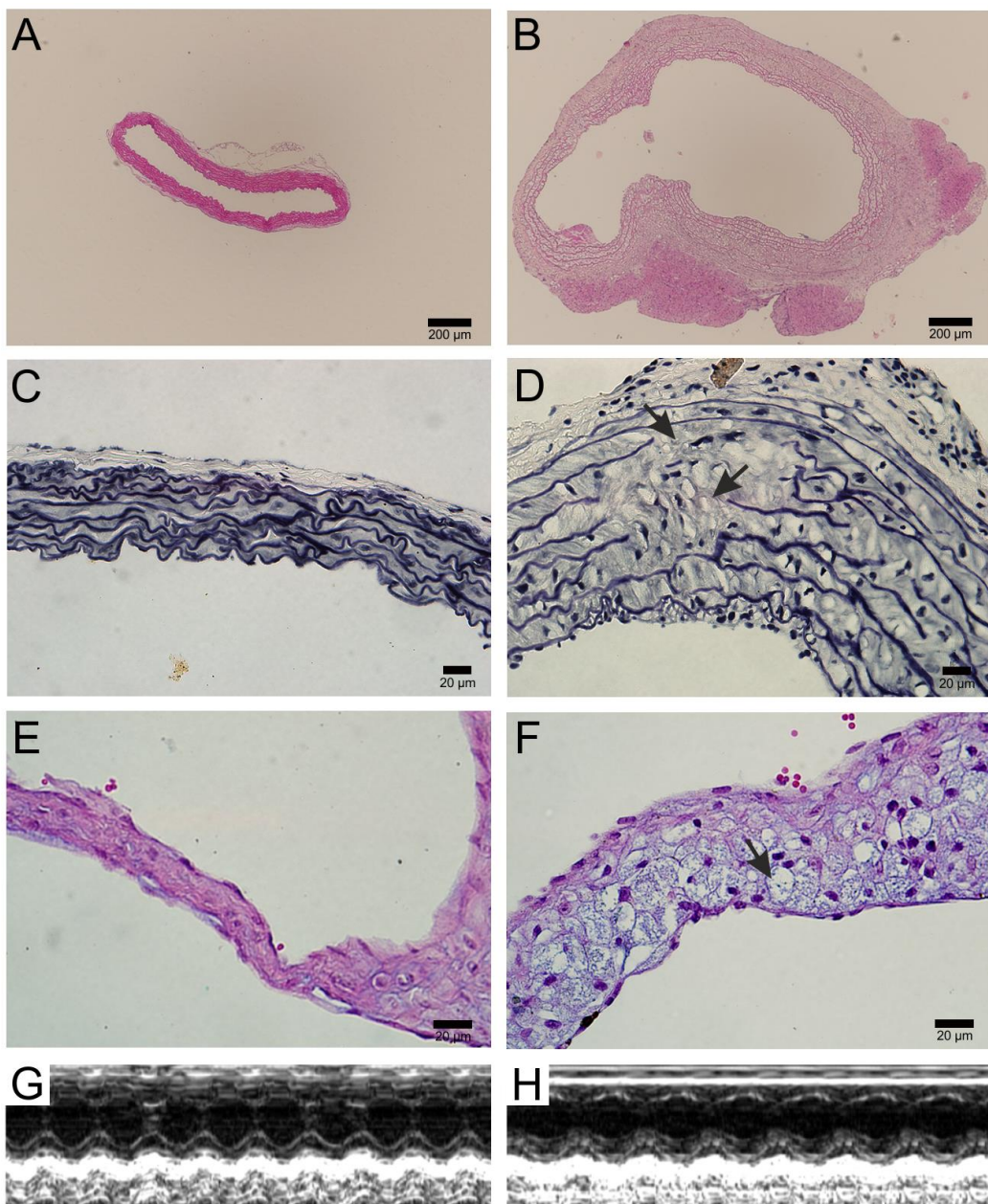


Figure 2: Elastase activity in aortic and heart samples. Elastase activity was measured using the substrate SucAla₃-pNA at pH 8 (n= 5-7/group). Results were expressed as U/mg protein. One unit of elastase hidrolizes 1 nmole of substrate per hour at pH 7.5 at 25°C. (*) p<0.05 compared to normal.

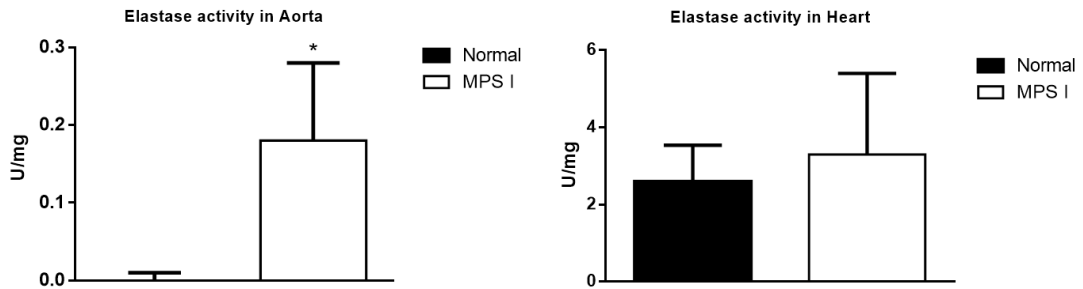


Figure 3: Cathepsin B detection by immunofluorescence in Normal (upper row) and MPS I (bottom row) fibroblasts. Representative images showing location of cathepsin B (green), Lamp-1 (red) and an overlay of both channels (merge). Note that in MPS I fibroblast, cathepsin B diffuses throughout the cytosol and is overexpressed. Inserts denote the differences in detail.

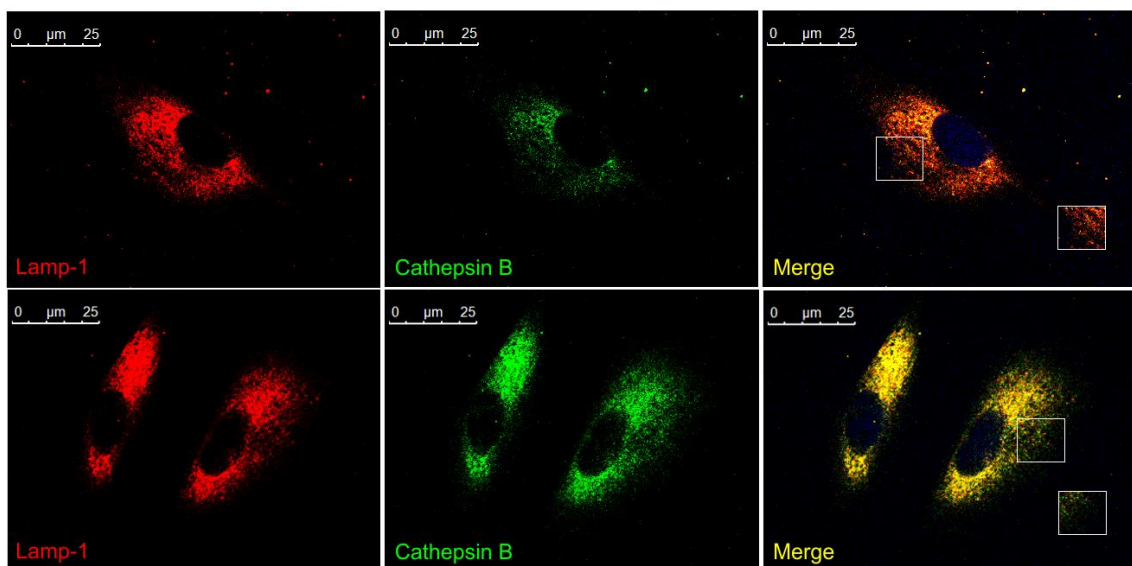


Figure 4: Aortic dilatation at 6 months. Representative images obtained with VVG staining from groups: A) Normal, B) MPS I, C) Vehicle, D) Inhibitor Ca-074Me. E) Aortic diameter measured after euthanasia. (*) $p < 0.05$ compared to normal. (#) $p < 0.05$ compared to vehicle.

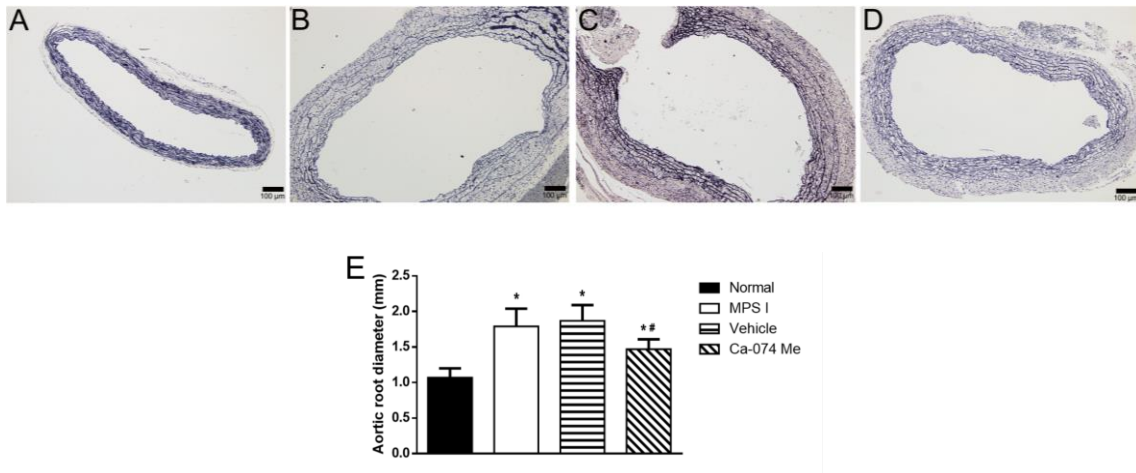


Figure 5: Elastin breaks in ascending aortas. Representative images of characteristic abnormalities in elastic fiber in: A) Normal, B) MPS I, C) Vehicle, D) Inhibitor Ca-074Me. Aortas were stained with VVG and analyzed for at least 3 different fields in at least 4 points each and the mean value was recorded (E). (*) $p < 0.05$ compared to normal.

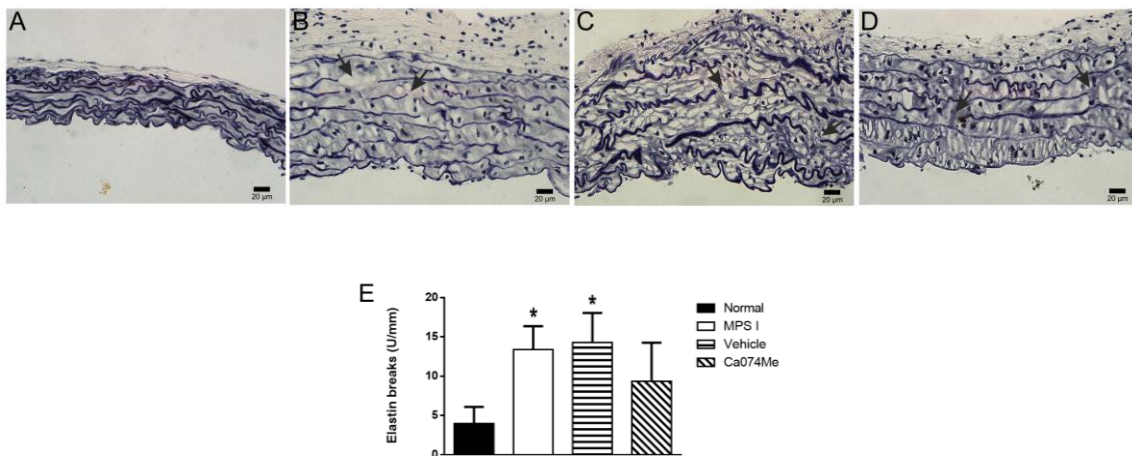


Figure 6: Heart Valve thickening at 6 months. Representative images of left ventricular valve thickness in different groups. A) Normal mice, B) untreated MPS I mice, C) Mice treated with vehicle, D) Mice treated with Ca074Me. E) Average thickness of LV valve measured from least 8 points. (*) $p < 0.05$ compared to normal. (#) $p < 0.05$ compared to MPS I.

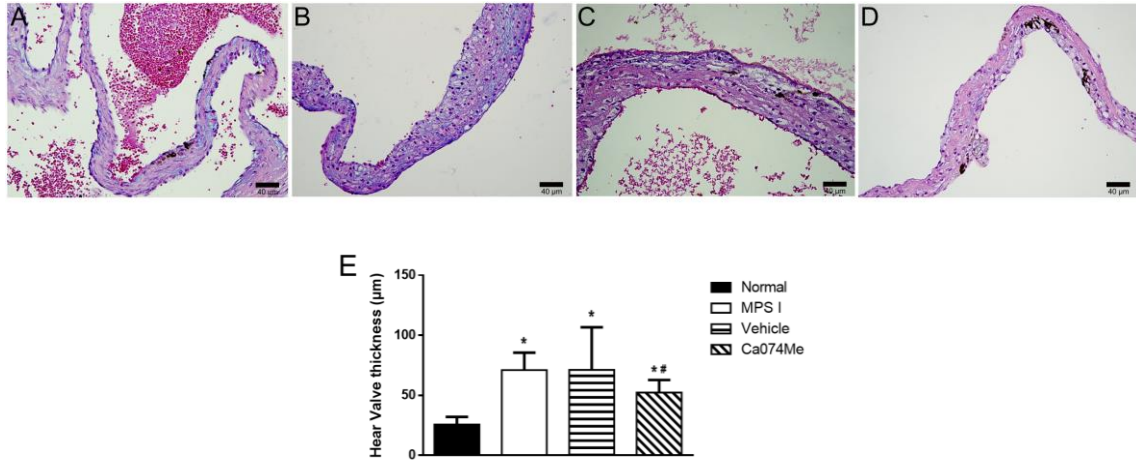


Figure 7: Collagen structure in LV heart valve at 6 months. Representative images of collagen integrity in left ventricular valve using Picrosirius red staining and polarized light. A) Normal mice, B) untreated mice MPS I, C) Mice treated with vehicle, D) Mice treated with Ca074Me. E) Mean percentage of the area with red signal respect to the total valve area for each group. F) Intensity for the red signal, a parameter of collagen integrity, expressed in arbitrary units. (*) $p < 0.05$ compared to normal.

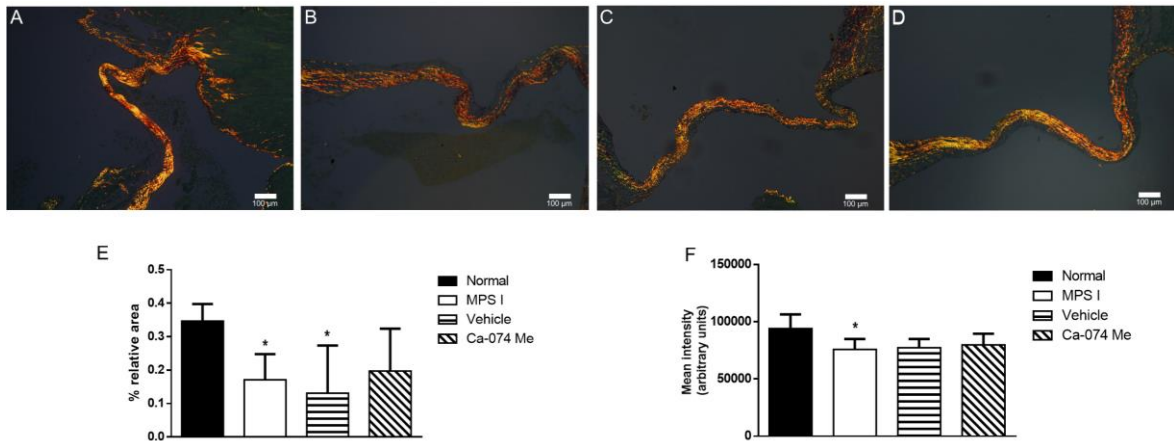


Figure 8. Heart parameters. Myocardium analysis by echocardiography. A) left ventricular shortening fraction (LVSF) B) Systolic diameter (cm), C) diastolic diameter (cm). D) Representative photo of the hearts at 6 months. (*) $p < 0.05$ compared to normal. (#) $p < 0.05$ compared to MPS I and vehicle.

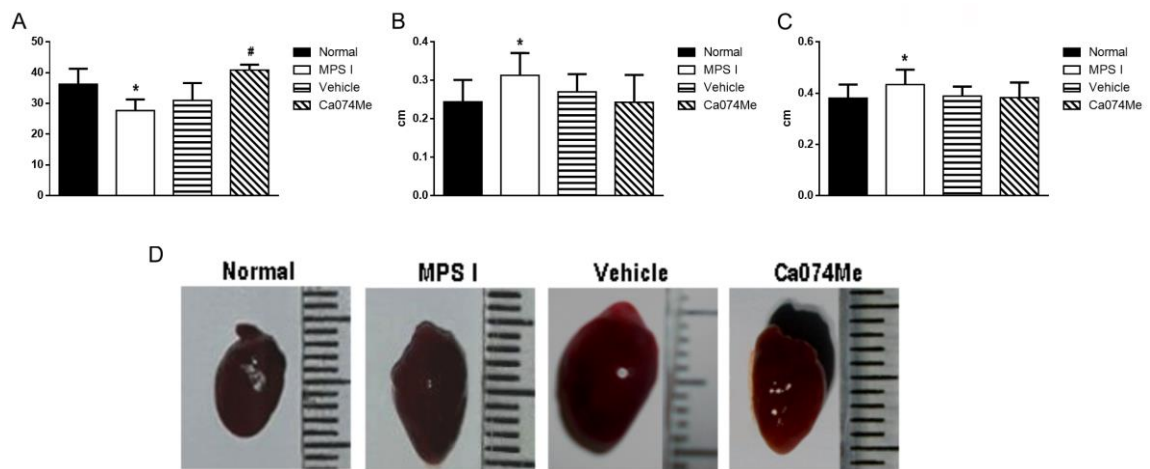
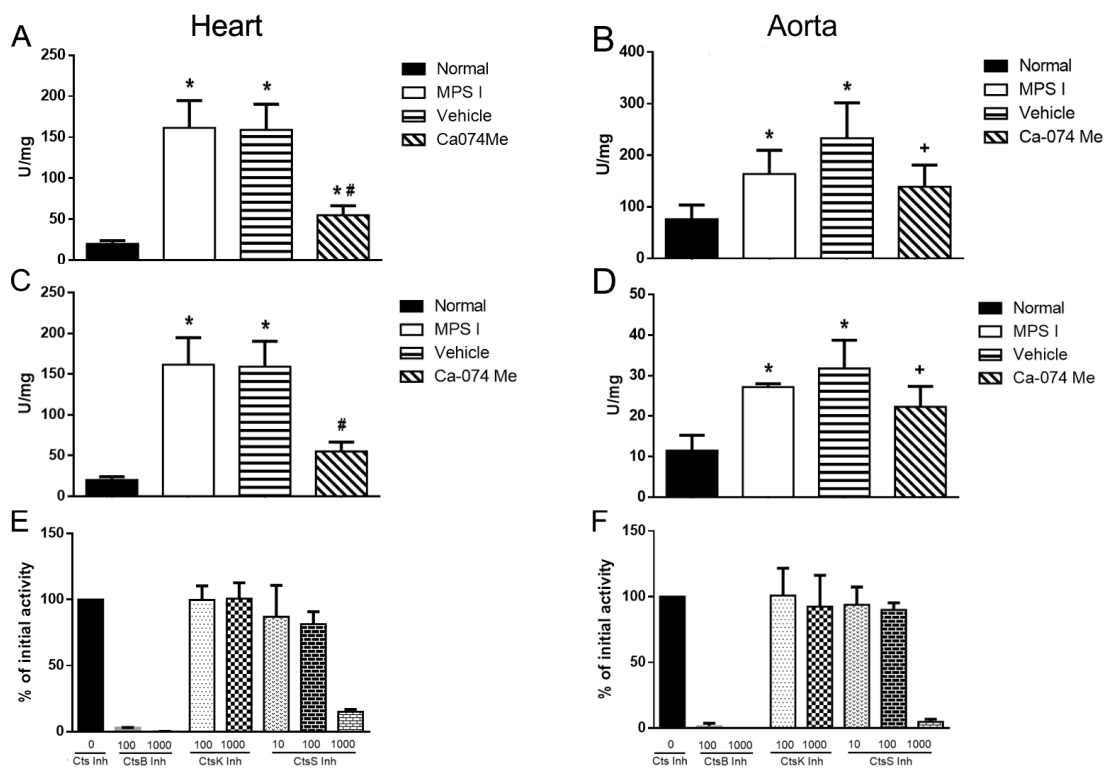
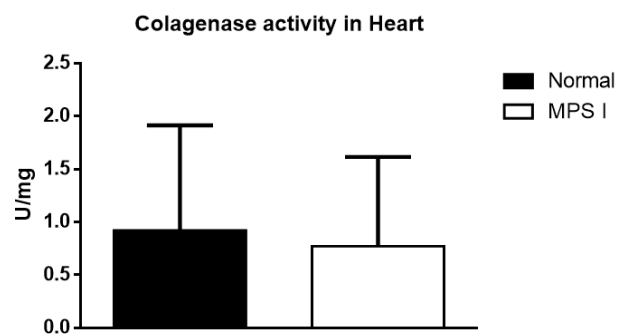


Figure 9: Cathepsin activity in cardiovascular tissues. Aorta and heart samples were homogenized in acetate buffer at pH 7.4. A-B) CtsB activity was determined using CtsB specific substrate Z-Arg-Arg-AMC. C-D) Total cathepsin activity performed with the non-specific substrate Z-Phe-Arg-AMC. E-F) Effect of inhibition on activity of Ca074-Me group using substrate Z-Phe-Arg. Samples from treated mice were incubated with or without inhibitor of CtsB, CtsK and CtsS at the indicated concentration. The activity is relative to the initial activity without adding inhibitor. (*) $p < 0.05$ compared to normal. (#) $p < 0.05$ compared to MPS I and vehicle. (+) $p < 0.05$ compared to vehicle.



Supplementary figures

Figure 1 (supp.). Collagenase activity in heart tissue at 6 months. Collagenase activity was determined using FALGPA substrate. Results were expressed as U/mg. One unit of collagenase hydrolyze 1 nmole of FALPA per hour.



References

Aldenhoven M, Boelens J and de Koning TJ (2008) The Clinical Outcome of Hurler Syndrome after Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 14:485–498. doi: 10.1016/j.bbmt.2008.01.009

Almeida PC, Nantes IL, Chagas JR, Rizzi CCA, Faljoni-Alario A, Carmona E, Juliano L, Nader HB and Tersariol ILS (2001) Cathepsin B activity regulation. Heparin-like glycosaminoglycans protect human cathepsin B from alkaline pH-induced inactivation. *J Biol Chem* 276:944–951. doi: 10.1074/jbc.M003820200

Al-Sannaa NA, Bay L, Barbouth DS, Benhayoun Y, Goizet C, Guelbert N, Jones SA, Kyosen SO, Martins AM, Phornphutkul C et al. (2015) Early treatment with laronidase improves clinical outcomes in patients with attenuated MPS I: a retrospective case series analysis of nine sibships. *Orphanet J Rare Dis* 10:131. doi: 10.1186/s13023-015-0344-4

Bach G, Friedman R, Weissmann B and Neufeld EF (1972) The defect in the Hurler and Scheie syndromes: deficiency of α -L-iduronidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 69:2048–2051. doi: 10.1073/pnas.69.8.2048

Baldo G, Mayer FQ, Martinelli B, Dilda A, Meyer F, Ponder KP, Giugliani R and Matte U (2012) Evidence of a progressive motor dysfunction in Mucopolysaccharidosis type I mice. *Behav Brain Res* 233:169–175. doi: 10.1016/j.bbr.2012.04.051

Baldo G, Mayer FQ, Martinelli BZ, de Carvalho TG, Meyer FS, de Oliveira PG, Meurer L, Tavares A, Matte U and Giugliani R (2013) Enzyme replacement therapy started at birth improves outcome in difficult-to-treat organs in mucopolysaccharidosis I mice. *Mol Genet Metab* 109:33–40. doi: 10.1016/j.ymgme.2013.03.005

Baldo G, Wu S, Howe R a, Ramamoothy M, Knutsen RH, Fang J, Mecham RP, Liu Y, Wu X, Atkinson JP et al. (2011) Pathogenesis of aortic dilatation in mucopolysaccharidosis VII mice may involve complement activation. *Mol Genet Metab* 104:608–19. doi: 10.1016/j.ymgme.2011.08.018

Banerjee T, Mukherjee S, Ghosh S, Biswas M, Dutta S, Pattari S, Chatterjee S and Bandyopadhyay A (2014) Clinical significance of markers of collagen metabolism in rheumatic mitral valve disease. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0090527

Bigg PW, Baldo G, Sleeper MM, Donnell PAO, Bai H, Rokkam VRP, Liu Y, Wu S, Giugliani R, Casal ML et al. (2013) Pathogenesis of mitral valve disease in

- mucopolysaccharidosis VII dogs. *Mol Genet Metab* 110:319–328. doi: 10.1016/j.ymgme.2013.06.013
- Bishop JE, Greenbaum R, Gibson DG, Yacoub M and Laurent GJ (1990) Enhanced deposition of predominantly type I collagen in myocardial disease. *J Mol Cell Cardiol* 22:1157–1165. doi: 10.1016/0022-2828(90)90079-H
- Bohley P and Seglen PO (1992) Proteases and proteolysis in the lysosome. *Experientia* 48:151–157. doi: 10.1007/BF01923508
- Bolourchi M, Chen Y, Renella P, Nguyen D V. and Wang R (2016) Aortic root dilatation in mucopolysaccharidosis. *Mol Genet Metab* 117:S29. doi: 10.1016/j.ymgme.2015.12.203
- Bonnans C, Chou J and Werb Z (2014) Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15:786–801. doi: 10.1038/nrm3904
- Braunlin E, Mackey-Bojack S, Panoskaltzis-Mortari A, Berry JM, McElmurry RT, Riddle M, Sun L-Y, Clarke L a, Tolar J and Blazar BR (2006) Cardiac functional and histopathologic findings in humans and mice with mucopolysaccharidosis type I: implications for assessment of therapeutic interventions in hurler syndrome. *Pediatr Res* 59:27–32. doi: 10.1203/01.pdr.0000190579.24054.39
- Braunlin EA, Harmatz PR, Scarpa M, Furlanetto B, Kampmann C, Loehr JP, Ponder KP, Roberts WC, Rosenfeld HM and Giugliani R (2011) Cardiac disease in patients with mucopolysaccharidosis: Presentation, diagnosis and management. *J Inherit Metab Dis* 34:1183–1197. doi: 10.1007/s10545-011-9359-8
- Brömme D and Wilson S (2011) Role of Cysteine Cathepsins in Extracellular Proteolysis. In: Parks WC and Mecham RP (eds) *Extracellular Matrix Degradation*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 23–51
- Brooks DA, Kakavanos R and Hopwood JJ (2003) Significance of immune response to enzyme-replacement therapy for patients with a lysosomal storage disorder. *Trends Mol Med* 9:450–453. doi: 10.1016/j.molmed.2003.08.004
- Buck MR, Karustis DG, Day NA, Honn K V and Sloane BF (1992) Degradation of extracellular-matrix proteins by human cathepsin B from normal and tumour tissues. *Biochem J* 282 (Pt 1:273–8.
- Buttle DJ, Murata M, Knight CG and Barrett AJ (1992) CA074 methyl ester: a proinhibitor for intracellular cathepsin B. *Arch Biochem Biophys* 299:377–80.
- Byers S, Rozaklis T, Brumfield LK, Ranieri E and Hopwood JJ (1998) Glycosaminoglycan accumulation and excretion in the mucopolysaccharidoses: characterization and basis of a diagnostic test for MPS. *Mol Genet Metab* 65:282–

290. doi: 10.1006/mgme.1998.2761

Cattell MA, Anderson JC and Hasleton PS (1996) Age-related changes in amounts and concentrations of collagen and elastin in normotensive human thoracic aorta. *Clin Chim Acta* 245:73–84. doi: 10.1016/0009-8981(95)06174-6

Cheng XW, Shi G-P, Kuzuya M, Sasaki T, Okumura K and Murohara T (2012) Role for cysteine protease cathepsins in heart disease: focus on biology and mechanisms with clinical implication. *Circulation* 125:1551–62. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.066712

Cimaz R and La Torre F (2014) Mucopolysaccharidoses. *Curr Rheumatol Rep* 16:389. doi: 10.1007/s11926-013-0389-0

Clarke LA, Russell CS, Pownall S, Warrington CL, Borowski A, Dimmick JE, Toone J and Jirik FR (1997) Murine mucopolysaccharidosis type I: targeted disruption of the murine alpha-L-iduronidase gene. *Hum Mol Genet* 6:503–11. doi: 10.1093/hmg/6.4.503

Cleutjens JPM and Creemers EEJM (2016) Integration of concepts: Cardiac extracellular matrix remodeling after myocardial infarction. *J Card Fail* 8:S344–S348. doi: 10.1054/jcaf.2002.129261

Coen M, Menegatti E, Salvi F, Mascoli F, Zamboni P, Gabbiani G and Bochaton-Piallat ML (2013) Altered collagen expression in jugular veins in multiple sclerosis. *Cardiovasc Pathol* 22:33–38. doi: 10.1016/j.carpath.2012.05.005

Combs MD and Yutzey KE (2009) Heart valve development: Regulatory networks in development and disease. *Circ Res* 105:408–421. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.201566

Conus S and Simon H-U (2008) Cathepsins: key modulators of cell death and inflammatory responses. *Biochem Pharmacol* 76:1374–82. doi: 10.1016/j.bcp.2008.07.041

Costa MGS, Batista PR, Shida CS, Robert CH, Bisch PM and Pascutti PG (2010) How does heparin prevent the pH inactivation of cathepsin B? Allosteric mechanism elucidated by docking and molecular dynamics. *BMC Genomics* 11 Suppl 5:S5. doi: 10.1186/1471-2164-11-S5-S5

Coutinho MF, Lacerda L and Alves S (2012) Glycosaminoglycan Storage Disorders: A Review. *Biochem Res Int* 2012:1–16. doi: 10.1155/2012/471325

Dangel JH (1998) Cardiovascular changes in children with mucopolysaccharide storage diseases and related disorders- clinical and echocardiographic findings in 64 patients. *Eur J Pediatr* 157:534–538. doi: 10.1007/s004310050872

De Oliveira PG, Baldo G, Mayer FQ, Martinelli B, Meurer L, Giugliani R, Matte U

and Xavier RM (2013) Characterization of joint disease in mucopolysaccharidosis type I mice. *Int J Exp Pathol* 94:305–311. doi: 10.1111/iep.12033

Didangelos A, Yin X, Mandal K, Baumert M, Jahangiri M and Mayr M (2010) Proteomics characterization of extracellular space components in the human aorta. *Mol Cell Proteomics* 9:2048–2062. doi: 10.1074/mcp.M110.001693

Fesslová V, Corti P, Sersale G, Rovelli A, Russo P, Mannarino S, Butera G and Parini R (2009) The natural course and the impact of therapies of cardiac involvement in the mucopolysaccharidoses. *Cardiol Young* 19:170–178. doi: 10.1017/S1047951109003576

Ge J, Zhao G, Chen R, Li S, Wang S, Zhang X, Zhuang Y, Du J, Yu X, Li G et al. (2006) Enhanced myocardial cathepsin B expression in patients with dilated cardiomyopathy. *8:284–289*. doi: 10.1016/j.ejheart.2005.09.004

Gelse K, Pöschl E and Aigner T (2003) Collagens - Structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev* 55:1531–1546. doi: 10.1016/j.addr.2003.08.002

Giugliani R, Federhen A, Rojas MVM, Vieira T, Artigalás O, Pinto LL, Azevedo AC, Acosta A, Bonfim C, Lourenço CM et al. (2010) Mucopolysaccharidosis I, II, and VI: Brief review and guidelines for treatment. *Genet Mol Biol* 33:589–604. doi: 10.1590/S1415-47572010005000093

Giugliani R, Federhen A, Vairo F, Vanzella C, Pasqualim G, da Silva LMR, Giugliani L, de Boer APK, de Souza CFM, Matte U et al. (2016) Emerging drugs for the treatment of mucopolysaccharidoses. *Expert Opin Emerg Drugs* 8214:1–18. doi: 10.1517/14728214.2016.1123690

Giugliani R, Harmatz P and Wraith JE (2007) Management guidelines for mucopolysaccharidosis VI. *Pediatrics* 120:405–418. doi: 10.1542/peds.2006-2184

Gondi CS and Rao JS (2013) Cathepsin B as a cancer target. *Expert Opin Ther Targets* 17:281–91. doi: 10.1517/14728222.2013.740461

Green KA and Lund LR (2005) ECM degrading proteases and tissue remodelling in the mammary gland. *BioEssays* 27:894–903. doi: 10.1002/bies.20281

Hinton RB and Yutzey KE (2011) Heart Valve Structure and Function in Development and Disease. *Annu Rev Physiol* 73:29–46. doi: 10.1146/annurev-physiol-012110-142145

Hoegen T, Tremel N, Klein M, Angele B, Wagner H, Kirschning C, Pfister H-W, Fontana A, Hammerschmidt S and Koedel U (2011) The NLRP3 inflammasome contributes to brain injury in pneumococcal meningitis and is activated through ATP-dependent lysosomal cathepsin B release. *J Immunol* 187:5440–51. doi: 10.4049/jimmunol.1100790

Jordan MC, Zheng Y, Ryazantsev S, Rozengurt N, Roos KP and Neufeld EF (2005) Cardiac manifestations in the mouse model of mucopolysaccharidosis I. *Mol Genet Metab* 86:233–243. doi: 10.1016/j.ymgme.2005.05.003

Jugdutt BI (2003) Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix: when is enough enough? *Circulation* 108:1395–403. doi: 10.1161/01.CIR.0000085658.98621.49

Junqueira LC, Bignolas G and Brentani RR (1979) Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J* 11:447–55.

Kothapalli N, Camporeale G, Kueh A, Chew YC, Oommen AM, Griffin JB and Zemleni J (2005) Biological functions of biotinylated histones. *J Nutr Biochem* 16:446–448. doi: 10.1016/j.jnutbio.2005.03.025

Lah TT and Kos J (1998) Cysteine proteinases in cancer progression and their clinical relevance for prognosis. *Biol Chem* 379:125–30.

Lattouf R, Younes R, Lutomski D, Naaman N, Godeau G, Senni K and Changotade S (2014) Picrosirius Red Staining: A Useful Tool to Appraise Collagen Networks in Normal and Pathological Tissues. *J Histochem Cytochem* 62:751–758. doi: 10.1369/0022155414545787

Leal GN, de Paula AC, Leone C and Kim C a (2010) Echocardiographic study of paediatric patients with mucopolysaccharidosis. *Cardiol Young* 20:254–261. doi: 10.1017/S104795110999062X

Li Z, Yasuda Y, Li W, Bogyo M, Katz N, Gordon RE, Fields GB and Br??mme D (2004) Regulation of Collagenase Activities of Human Cathepsins by Glycosaminoglycans. *J Biol Chem* 279:5470–5479. doi: 10.1074/jbc.M310349200

Liu A, Gao X, Zhang Q and Cui L (2013) Cathepsin B inhibition attenuates cardiac dysfunction and remodeling following myocardial infarction by inhibiting the NLRP3 pathway. *Mol Med Rep* 8:361–6. doi: 10.3892/mmr.2013.1507

Lutgens SPM, Cleutjens KBJM, Daemen MJ a P and Heeneman S (2007) Cathepsin cysteine proteases in cardiovascular disease. *FASEB J* 21:3029–41. doi: 10.1096/fj.06-7924com

Ma X, Tittiger M, Knutsen RH, Kovacs A, Schaller L, Mecham RP and Ponder KP (2008) Upregulation of elastase proteins results in aortic dilatation in mucopolysaccharidosis I mice. *Mol Genet Metab* 94:298–304. doi: 10.1016/j.ymgme.2008.03.018

Mach L, Mort JS and Gloszl J (1994) Maturation of human procathepsin B. Proenzyme activation and proteolytic processing of the precursor to the mature

proteinase, in vitro, are primarily unimolecular processes. *J Biol Chem* 269:13030–13035.

Martins AM, Dualibi AP, Norato D, Takata ET, Santos ES, Valadares ER, Porta G, de Luca G, Moreira G, Pimentel H et al. (2009) Guidelines for the management of mucopolysaccharidosis type I. *J Pediatr* 155:S32–46. doi: 10.1016/j.jpeds.2009.07.005

Metcalf J a, Linders B, Wu S, Bigg P, O'Donnell P, Sleeper MM, Whyte MP, Haskins M and Ponder KP (2010) Upregulation of elastase activity in aorta in mucopolysaccharidosis I and VII dogs may be due to increased cytokine expression. *Mol Genet Metab* 99:396–407. doi: 10.1016/j.ymgme.2009.12.003

Mohamed MM and Sloane BF (2006) Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer* 6:764–775. doi: 10.1038/nrc1949

Mohan UR, Hay a a, Cleary M a, Wraith JE and Patel RG (2002) Cardiovascular changes in children with mucopolysaccharide disorders. *Acta Paediatr* 91:799–804. doi: 10.1080/08035250213211

Montaser M, Lalmanach G and Mach L (2002) CA-074, but not its methyl ester CA-074Me, is a selective inhibitor of cathepsin B within living cells. *Biol Chem* 383:1305–1308. doi: 10.1515/BC.2002.147

Montes GS and Junqueira LC (1991) The use of the Picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86 Suppl 3:1–11. doi: 10.1590/S0074-02761991000700002

Mort JS and Buttle DJ (1997) Cathepsin B. *Int J Biochem Cell Biol* 29:715–720. doi: 10.1016/S1357-2725(96)00152-5

Muenzer J, Wraith JE and Clarke LA (2009) Mucopolysaccharidosis I: Management and Treatment Guidelines. *Pediatrics* 123:19–29. doi: 10.1542/peds.2008-0416

Nagase H, Visse R and Murphy G (2006) Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 69:562–573. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.12.002

Nemes A, Timmermans RGM, Wilson JHP, Soliman OII, Krenning BJ, ten Cate FJ and Geleijnse ML (2008) The mild form of mucopolysaccharidosis type I (Scheie syndrome) is associated with increased ascending aortic stiffness. *Heart Vessels* 23:108–111. doi: 10.1007/s00380-007-1013-x

Neufeld EF and Muenzer J (2001) The Mucopolysaccharidoses. *Online Metab Mol Bases Inherit Dis* 3421–3454. doi: 10.1036/ommbid.165

Ohmi K, Greenberg DS, Rajavel KS, Ryazantsev S, Li HH and Neufeld EF (2003)

Activated microglia in cortex of mouse models of mucopolysaccharidoses I and IIIB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:1902–7. doi: 10.1073/pnas.252784899

Pan D, Sciascia A, Vorhees C V. and Williams MT (2008) Progression of multiple behavioral deficits with various ages of onset in a murine model of Hurler syndrome. *Brain Res* 1188:241–253. doi: 10.1016/j.brainres.2007.10.036

Pastores GM, Arn P, Beck M, Clarke JTR, Guffon N, Kaplan P, Muenzer J, Norato DYJ, Shapiro E, Thomas J et al. (2007) The MPS I registry: Design, methodology, and early findings of a global disease registry for monitoring patients with Mucopolysaccharidosis Type I. *Mol Genet Metab* 91:37–47. doi: 10.1016/j.ymgme.2007.01.011

Pereira VG, Gazarini ML, Rodrigues LC, Da Silva FH, Han SW, Martins AM, Tersariol ILS and D'Almeida V (2010) Evidence of lysosomal membrane permeabilization in mucopolysaccharidosis type I: Rupture of calcium and proton homeostasis. *J Cell Physiol* 223:335–342. doi: 10.1002/jcp.22039

Premzl A, Zavašnik-Bergant V, Turk V and Kos J (2003) Intracellular and extracellular cathepsin B facilitate invasion of MCF-10A neoT cells through reconstituted extracellular matrix in vitro. *Exp Cell Res* 283:206–214. doi: 10.1016/S0014-4827(02)00055-1

Qian F, Frankfater a, Chan SJ and Steiner DF (1991) The structure of the mouse cathepsin B gene and its putative promoter. *DNA Cell Biol* 10:159–68.

Renteria VG and Roberts WC (1976) The heart in the Hurler syndrome observations. *Am J Cardiol* 38:487–501.

Rich L and Whittaker P (2005) Collagen and Picrosirius Red Staining : a Polarized Light Assessment of Fibrillar Hue and Spatial Distribution. *Braz J Morphol Sci* 22:97–104.

Roshy S, Sloane BF and Moin K (2003) Pericellular cathepsin B and malignant progression. *Cancer Metastasis Rev* 22:271–86.

Rowan AD, Mason P, Mach L and Mort JS (1992) Rat procathepsin B: Proteolytic processing to the mature form in vitro. *J Biol Chem* 267:15993–15999.

Russell C, Hendson G, Jevon G, Matlock T, Yu J, Aklujkar M, Ng KY and Clarke L a (1998) Murine MPS I: insights into the pathogenesis of Hurler syndrome. *Clin Genet* 53:349–61. doi: 10.1111/j.1399-0004.1998.tb02745.x

Schroeder L, Orchard P, Whitley CB, Berry JM, Tolar J, Miller W and Braunlin EA (2012) Cardiac Ultrasound Findings in Infants with Severe (Hurler Phenotype) Untreated Mucopolysaccharidosis (MPS) Type I. *JIMD Reports*. pp 87–94

Sifuentes M, Doroshov R, Hoft R, Mason G, Walot I, Diament M, Okazaki S, Huff

K, Cox GF, Swiedler SJ et al. (2007) A follow-up study of MPS I patients treated with laronidase enzyme replacement therapy for 6 years. *Mol Genet Metab* 90:171–180. doi: 10.1016/j.ymgme.2006.08.007

Spinale FG (2002) Matrix metalloproteinases: Regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res* 90:520–530. doi: 10.1161/01.RES.0000013290.12884.A3

Stephens EH, Nguyen TC, Itoh A, Ingels NB, Miller DC and Grande-Allen KJ (2008) The effects of mitral regurgitation alone are sufficient for leaflet remodeling. *Circulation*. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.757526

Szpaderska AM and Frankfater A (2001) An intracellular form of cathepsin b contributes to invasiveness in cancer. *Cancer Res* 61:3493–3500.

Tavares AMV, da Rosa Araujo AS, Baldo G, Matte U, Khaper N, Bell-Klein A, Rohde LE and Clausell N (2010) Bone marrow derived cells decrease inflammation but not oxidative stress in an experimental model of acute myocardial infarction. *Life Sci* 87:699–706. doi: 10.1016/j.lfs.2010.10.008

Tolar J and Orchard PJ (2008) alpha-L-iduronidase therapy for mucopolysaccharidosis type I. *Biologics* 2:743–51.

Turk B, Turk D and Turk V (2000) Lysosomal cysteine proteases: More than scavengers. *Biochim Biophys Acta - Protein Struct Mol Enzymol* 1477:98–111. doi: 10.1016/S0167-4838(99)00263-0

Turk V, Stoka V, Vasiljeva O, Renko M, Sun T, Turk B and Turk D (2012) Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics* 1824:68–88. doi: 10.1016/j.bbapap.2011.10.002

Valayannopoulos V and Wijburg FA (2011) Therapy for the mucopolysaccharidoses. *Rheumatology* 50:49–59. doi: 10.1093/rheumatology/ker396

Vieira T, Schwartz I, Muoz V, Pinto L, Steiner C, Ribeiro M, Boy R, Ferraz V, De Paula A, Kim C et al. (2008) Mucopolysaccharidoses in Brazil: What happens from birth to biochemical diagnosis? *Am J Med Genet Part A* 146:1741–1747. doi: 10.1002/ajmg.a.32320

Volpi N, Maccari F, Galeotti F, Zampini L, Santoro L, Padella L, Galeazzi T, Gabrielli O and Coppa G V. (2013) Plasmatic dermatan sulfate and chondroitin sulfate determination in mucopolysaccharidoses. *J Pharm Biomed Anal* 85:40–45. doi: 10.1016/j.jpba.2013.06.026

Wang D, Shukla C, Liu X, Schoeb TR, Clarke LA, Bedwell DM and Keeling KM (2010) Characterization of an MPS I-H knock-in mouse that carries a nonsense

mutation analogous to the human IDUA-W402X mutation. *Mol Genet Metab* 99:62–71. doi: 10.1016/j.ymgme.2009.08.002

Yano S, Moseley K and Pavlova Z (2009) Postmortem studies on a patient with mucopolysaccharidosis type I: histopathological findings after one year of enzyme replacement therapy. *J Inherit Metab Dis* 32 Suppl 1:S53–7. doi: 10.1007/s10545-009-1057-4

CAPITULO IV DISCUSSÃO

As alterações cardiovasculares são muito comuns em todas as formas de MPS, sendo uma das principais causas de morte nos pacientes sem tratamento. O depósito progressivo de GAGs (principalmente de Dermatan sulfato) está associado ao espessamento das válvulas cardíacas, hipertrofia do ventrículo esquerdo, cardiomiopatias, assim como dilatação da aorta (Braunlin et al. 2011; Schroeder et al. 2012). Estudos indicam que os principais tratamentos disponíveis podem melhorar muitos dos aspectos patológicos da doença, mas apresentam baixa eficácia referente ao sistema cardiovascular (Braunlin et al. 2011).

Atualmente, trabalhos tem tentado buscar a identificação das principais proteínas responsáveis pelas alterações nas estruturas cardíacas que levam a anormalidades nestes tecidos. Neste contexto, estudos apontam ao desequilíbrio no *turnover* de proteases que degradam os principais componentes da ECM como os responsáveis pelas anomalias no tecido cardíaco (Metcalf et al. 2010; Bigg et al. 2013). Por conseguinte, o estudo da patogênese da doença cardíaca nas MPS é essencial para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes.

No presente trabalho, identificamos um aumento na dilatação da aorta ascendente, concomitante ao aumento no número de quebras na estrutura da elastina no modelo animal de MPS I. As anormalidades observadas descritas aqui estão de acordo com estudos prévios, que demonstraram progressiva dilatação da aorta e das quebras de elastina a partir dos 1,5 meses de idade, que progride até os 8. O número de quebras da elastina também mostrou ser progressivo (Ma et al. 2008). Esta dilatação pode gerar, em última instância, um aneurisma com ruptura do vaso, com ruptura do mesmo, podendo levar à morte do paciente. Um estudo recente demonstrou que a dilatação de aorta é comum em todos os tipos de MPS, chegando a atingir 50% de frequência (Bolourchi et al. 2016). Portanto, o modelo animal mimetiza as anormalidades na aorta encontradas nos pacientes.

Buscando mecanismos para explicar as quebras na elastina observadas, reportamos um aumento significativo na atividade total de elastases da aorta dos animais MPS I, um achado inédito. No entanto, é importante ressaltar que o nível de atividade de elastases foi indetectável em 6 de 7 amostras normais e apenas pouco acima dos limites de detecção nos animais MPS, e a relevância biológica

desta descoberta ainda é incerta. No miocárdio, apesar do aumento parcial na atividade de colagenases e elastases, não foi possível detectar diferenças significativas devido à alta taxa de variação dentro do grupo afetado. Cabe ressaltar ainda que, nos 2 casos, os substratos utilizados são sintéticos, e portanto a afinidade de cada enzima pelo substrato pode variar e não ser a mesma encontrada *in vivo*. Isso é válido especialmente no caso do colágeno, por se tratar de uma família de estruturas diferentes.

Dentro dos possíveis candidatos responsáveis pela atividade de elastase e colagenase que alteram a estrutura da ECM nos animais MPS I, a catepsina B tem sido identificada como uma forte candidata. Estudos prévios demonstraram que esta enzima apresenta uma elevada atividade e expressão nos tecidos cardíacos de modelos animais de MPS (Bigg et al. 2013) e mantém-se ativa mesmo no pH neutro extracelular (Baldo et al. 2011), embora sua estabilidade seja inferior a de outras enzimas, como a catepsina K e S. Em condições normais, a atividade desta protease tem sido confinada basicamente aos lisossomos. Não obstante, em situações especiais ela pode se encontrar ativa fora do lisossomo e potencialmente degradar as proteínas extracelulares, associando-se com múltiplas condições patológicas, como a capacidade de invasão do câncer e a disfunção cardíaca, entre outras (Lah and Kos 1998; Liu et al. 2013).

Utilizando cultura de fibroblastos humanos normais e MPS I, identificamos a localização da catepsina B. Optamos por realizar o estudo em fibroblastos porque eles também estão presentes no coração e pela disponibilidade das células humanas no laboratório. A co-localização da enzima com Lamp-1, uma proteína de membrana lisossomal, indica que a maioria dos lisossomos possuem catepsina B no seu interior, além de evidenciar uma superexpressão desta protease nos fibroblastos MPS I. Porém, parte do sinal para catepsina B não foi co-localizado com Lamp-1, indicando a translocação da enzima do lisossomo para fora deste. Normalmente, a atividade proteolítica de catepsina B é localizada nos lisossomos, principalmente nos situados na região perinuclear do citoplasma (Premzl et al. 2003). No entanto, nas células MPS I além do aumento nos níveis de catepsina B, existe uma redistribuição para a região periférica e na membrana plasmática, podendo inclusive possivelmente ser excretada no espaço

extracelular. Esses dados estão de acordo com um estudo anterior que demonstrou que a permeabilização da membrana do lisossomo pode ocorrer na MPS I, permitindo o vazamento de cisteína proteases lisossômicas (Pereira et al. 2010) para fora da organela. Dessa forma, a catepsina B poderia clivar diferentes substratos, assim como desencadear diferentes vias de sinalização, contribuindo para a fisiopatogênese da MPS I. Esta alteração na distribuição anormal dos lisossomos (e neste caso da catepsina B) também já foi relatado como importante para a patogênese de outras condições patológicas, como em células tumorais, contribuindo em processos de degradação do ECM (Premzl et al. 2003)

A partir destes dados, surgiu a ideia de inibir a atividade de catepsina B nos animais MPS I. Duas opções eram possíveis: a criação de um animal duplo nocaute (nocaute para *Idua* e *Ctsb*) ou o uso do inibidor farmacológico Ca-074Me. O uso dos animais nocautes foi descartado por 3 motivos: 1) o custo; 2) a dificuldade de importar os animais e 3) o fato do modelo animal nocaute para catepsina B disponível ter sido criado em outra linhagem de camundongos, o que pode alterar o tamanho das aortas quando os 2 forem cruzados. Portanto, embora o processo de importação também fosse complicado, decidiu-se usar o inibidor farmacológico.

Inicialmente, o estudo previa o uso do inibidor na dose de 5 mg/kg/dia, conforme estudo previamente publicado (Hoegen et al. 2011). Um estudo piloto foi realizado com a administração uma única dose do inibidor e sacrifício dos animais 24h após. Foi observado que nesta dose não havia inibição da atividade da enzima nos tecidos analisados: aorta, coração, fígado e baço. Portanto, um novo estudo piloto foi realizado, e verificou-se que com a dose de 10 mg/kg/dia (Liu et al. 2013) havia inibição parcial da atividade nos tecidos, conforme a tabela abaixo.

Tabela 2: Determinação da atividade catepsina B utilizando o substrato fluorogênico Z-Arg-Arg-AMC a pH 7.4 após 24h da administração de uma única dose do inibidor Ca-074Me. Os resultados são expressos em nmol/h/mg e nmol/h/mL no soro.

	Controle MPS (n=3)	Doses de tratamento (Ca-074Me)	
		5 mg/kg (n=2)	10 mg/kg (n=2)
Aorta	106,3 ± 122,5	287 ± 98,3	26,9 ± 7
Coração	68,7 ± 3,8	79,9 ± 35,1	45,1 ± 17,1
Fígado	111,4 ± 19,4	95,9 ± 8,6	39,9 ± 14,3
Soro	8,5 ± 7,5	5,3 ± 7,2	2,7 ± 0,7

Inicialmente, o estudo previa a utilização de 8 animais MPS I (por grupo) para o tratamento com o inibidor de catepsina B (Ca-074Me) e para a administração do veículo de diluição (DMSO 10%). No entanto, durante o tratamento com Ca-074Me dois animais foram eutanasiados por causas não relacionadas ao inibidor. O motivo principal foi devido a anormalidades ósseas na dentição que levaram a uma dificuldade na alimentação e conseqüentemente perda progressiva de peso.

Iniciado o tratamento, percebemos um ganho progressivo de peso, similar nos dois grupos de animais com intervenção (30,24 ± 2,26 em DMSO vs 30,81 ± 2,13 em grupo Ca-074Me; p>0,05). No grupo veículo, não foram detectados problemas relacionados à administração crônica do DMSO. Dos oito animais do grupo, seis foram considerados nas análises deste projeto e dois animais atualmente continuam recebendo DMSO e encontram-se em etapas finais do procedimento.

Após o tratamento por quatro meses, observamos uma melhora parcial no diâmetro da aorta. Além disso, o número de quebras de elastina apresentou valores intermediários, não sendo diferente significativamente nem dos animais MPS nem dos animais normais. Embora tenhamos conseguido melhorias neste tecido, não foi possível normalizar as manifestações. Buscando motivos para esta

melhora parcial, identificamos que a inibição da catepsina B no tecido foi baixa, sugerindo-se uma pobre distribuição do inibidor. Outros tratamentos, como a TRE, também demonstraram dificuldade de acesso à aorta devido a sua baixa vascularização (Baldo et al. 2013). Portanto, sugere-se que o benefício limitado do tratamento possa ser devido principalmente à fraca inibição da catepsina B no tecido e ao efeito crônico da atividade de catepsina B.

Devido à possibilidade de outras proteases encontrarem-se ativas nos tecidos cardiovasculares, realizamos ensaios para determinar a atividade de diferentes catepsinas que tem sido reportadas por ser altamente expressas nas MPS e que possuem atividade em pH neutro. Dentre elas, as catepsinas K e S são proteases secretadas, que manifestam elevada atividade colagenase e elastase no pH extracelular, podendo participar na degradação de componentes da ECM (Li et al. 2004; Brömme and Wilson 2011; Turk et al. 2012). Nossos resultados indicam que o uso de inibidores para catepsina K *in vitro*, no sobrenadante das amostras de camundongos tratados com Ca074-Me, não alterara a atividade total de catepsinas no tecido. O uso de inibidor de catepsina S evidenciou uma diminuição de atividade de catepsinas totais na dose mais alta (1000nM). No entanto, nessa dose, esse inibidor de catepsina S já não é específico, inibindo também a catepsina B (Ki para catepsina B é de 76 nM). Não obstante, quando colocamos o inibidor Ca074-Me específico para catepsina B, comprovamos uma inibição total da atividade na concentração já na dose de 100nM. Estes resultados sugerem que catepsina B é a principal catepsina ativa na aorta mesmo após a inibição parcial, e que grande parte desta atividade poderia ser inibida com Ca-074Me, caso se distribuísse uniformemente pelo tecido. A atividade ainda presente de catepsina B poderia facilitar a alteração da ECM por si só ou ativando outras proteases, como diversas MMPs (Gondi and Rao 2013). Outros estudos reportam um incremento na atividade de certas MMPs como responsáveis pelas modificações na ECM (Ma et al. 2008; Metcalf et al. 2010) e não podemos descartar a hipótese de que outras proteases também possam ser responsáveis pelas alterações observadas nos tecidos. Estudos subsequentes do nosso grupo pretendem verificar a atividade de outras proteases neste tecido, como as MMPs. Caso se confirme que múltiplas proteases estão

superexpressas no tecido, será aplicada uma abordagem diferenciada, que estude a via pela qual esta superexpressão acontece e o efeito do seu bloqueio.

Outro órgão que merece especial atenção, por também ter sido identificado por apresentar pouco ou nenhum benefício tanto com a TRE quanto com a HSCT, é a válvula cardíaca (Braunlin et al. 2006). De acordo com outros estudos, a análise histológica evidenciou o aumento da espessura das válvulas cardíacas aos seis meses de idade em camundongos MPS I. Este espessamento é comum nas MPS (Dangel 1998) podendo resultar em regurgitação, e levar à sobrecarga no volume e a dilatação do ventrículo esquerdo, conduzindo finalmente à disfunção cardíaca (Braunlin et al. 2011). O tratamento com Ca074-Me conseguiu diminuir significativamente a espessura das válvulas do ventrículo esquerdo, o que nos sugere que poderia reduzir a disfunção das mesmas. Infelizmente não pudemos analisar regurgitação das válvulas por limitações de equipamento.

Sendo o colágeno um dos principais componentes das válvulas, as alterações no seu metabolismo e sua estrutura podem contribuir para prejudicar a função das mesmas (Bishop et al. 1990). Portanto, a coloração de *Picrosirius-red* e microscopia com luz polarizada nos permitiu estudar e quantificar o colágeno nas válvulas cardíacas.

Para determinar a quantidade de colágeno presente na válvula, medimos a área total da mesma, assim como a área com sinal de colágeno, e calculamos a sua razão. Desta forma, evidenciamos que os camundongos MPS I apresentam uma diminuição no conteúdo de colágeno. Além disso, a estrutura do colágeno é outro parâmetro importante a ser analisado, já que está associado com a correta função valvular. No nosso estudo, avaliamos a intensidade de cor vermelha nas lâminas, e utilizamos esta intensidade como um indicativo da integridade do colágeno presente no tecido (Bigg et al, 2013). Nossos resultados indicam que camundongos MPS I apresentam um aumento na deterioração da estrutura de colágeno. Resultados similares foram reportados em válvulas de cachorros com MPS VII (Bigg et al. 2013). Infelizmente, a medida de atividade de collagenases nas válvulas não pôde ser realizada, devido ao tamanho insuficiente das amostras. Em conjunto, os camundongos MPS I apresentam menos colágeno em

função da área total e um maior comprometimento da estrutura do mesmo nas válvulas.

O tratamento com Ca-074Me foi capaz de alterar os níveis de colágeno para valores intermediários entre os grupos normais e MPS, embora sem diferença estatisticamente significativa entre eles, o mesmo acontecendo com a sua estrutura. Tendo em vista que as válvulas cardíacas são um tecido de difícil correção pelas terapias atuais (Giugliani et al. 2016), nossos achados tornam-se ainda mais importantes, já que as melhoras nesta estrutura possivelmente tenham impacto na funcionalidade valvular e cardíaca.

Outro fator importante que pode influenciar na função valvular é o tipo de colágeno fibrilar presente nas válvulas. Trabalhos prévios sugerem que no processo de remodelação do colágeno das válvulas, pode acontecer uma substituição entre os tipos de colágenos existentes no tecido (Stephens et al. 2008; Banerjee et al. 2014). Por exemplo, colágeno tipo I (o mais abundante nesta estrutura) pode ser substituído por outro tipo de colágeno, com diferentes propriedades funcionais, como o colágeno tipo III (Stephens et al. 2008). A coloração de Picrosirius red e luz polarizada tem sido sugerida por alguns grupos como a metodologia clássica para diferenciar entre os diferentes tipos de colágeno (Junqueira et al. 1979; Montes and Junqueira 1991; Coen et al. 2013). No entanto, a utilização desta metodologia é controversa (Lattouf et al. 2014). Portanto, estudos subsequentes incluirão a utilização de anticorpos para determinar a abundância de cada tipo de colágeno das válvulas de camundongos MPS I e contrastar estes resultados com análises utilizando a metodologia clássica.

Nos camundongos MPS I o miocárdio já se encontra dilatado aos 6 meses (Baldo et al. 2013). A função do ventrículo esquerdo se encontra diminuída, observando-se uma redução da fração de encurtamento e o aumento na câmara do ventrículo esquerdo (Baldo et al., 2013; Baldo et al., in press). O tratamento com o inibidor demonstrou melhorar a contratilidade do miocárdio, e reduzir o diâmetro do ventrículo, sugerindo um efeito positivo da inibição da catepsina B sobre a função cardíaca. Cabe uma ressalva que, quando observamos os animais

tratados apenas com DMSO, também há uma redução no diâmetro do ventrículo. Isso poderia ser explicado de algumas formas: 1) considerando a hipótese de que o DMSO possui efeito sobre a dilatação cardíaca, reduzindo-a ou 2) que as medidas obtidas na ecocardiografias com o transdutor disponível não sejam tão precisas devido ao tamanho do mesmo. O aspecto do coração no momento da eutanásia, conforme pode ser visto na figura do manuscrito, claramente demonstra que o coração do animal tratado com DMSO ainda se encontra aumentado. Dessa forma a segunda hipótese aqui levantada é favorecida. Em concordância com estes achados, outros estudos tem indicado que a utilização de Ca074Me diminui a insuficiência cardíaca prevenindo assim a falha cardíaca e remodelação após infarto de miocárdio (Liu et al. 2013).

A medida da atividade de catepsina B e catepsinas totais sobre o miocárdio foi significativamente diminuída. Porém a atividade foi 2 vezes superior em relação a camundongos normais, sugerindo uma distribuição melhor e mais eficaz do inibidor sobre este órgão, quando comparada à distribuição na aorta. Um trabalho prévio já tinha utilizado a mesma dose de inibidor *in vivo*, também observando diminuição da atividade de catepsina neste órgão (Liu et al, 2013). A inibição, embora incompleta, foi capaz de reduzir as anormalidades cardíacas observadas no modelo.

Em conclusão, os nossos dados sugerem que a catepsina B possui um papel relevante na remodelação da ECM e patogênese da doença cardiovascular na MPS I. Nos fibroblastos MPS I, a catepsina B é superexpressa e ativa, sendo redistribuída até a periferia celular, o citosol, ou podendo inclusive ser excretada no espaço pericelular, com a consequente capacidade para degradar/modificar a ECM dos órgãos cardiovasculares.

O tratamento de inibição de catepsina B com Ca-074Me, trouxe benefícios nos órgãos de difícil acesso para as terapias atuais. Por outro lado, o tratamento foi parcialmente efetivo na aorta e nas válvulas, sendo necessário ajuste na doses ou novas opções de entrega do fármaco para estes tecidos, que permitam diminuir a atividade catepsina B.

CAPITULO V CONCLUSÕES

Os camundongos MPS I aos 6 meses de idade possuem aumento nas quebras na elastina na aorta ascendente, dilatação na aorta e no miocárdio, com diminuição da sua contratilidade. Ainda, ocorre espessamento de válvulas e perda de colágeno nestas estruturas.

A atividade de elastase nas aortas de animais com MPS I está aumentada em comparação aos normais. A atividade no coração, bem como a atividade de collagenases nos 2 órgãos não demonstrou diferenças entre os grupos.

Em fibroblastos cultivados de pacientes normais e MPS I verificamos que, parte da catepsina B se encontra no lisossomo, e que ocorre uma superexpressão desta nas células MPS I, com escape de uma fração da enzima para fora do lisossomo.

A atividade de catepsina B estava aumentada nos grupos MPS sem tratamento, e mesmo no grupo com tratamento a atividade foi apenas parcialmente inibida. A inibição no coração parece ser mais eficaz que na aorta, o que explica parte dos resultados encontrados. Animais tratados com DMSO não tiveram qualquer diferença com relação aos animais MPS não tratados.

O tratamento com inibidor de catepsina B foi capaz de reduzir significativamente o tamanho da raiz da aorta. As quebras de elastina se mostraram intermediárias nos animais tratados, entre as observadas nos animais normais e nos animais MPS I, porém sem diferença com relação a ambos os grupos não-tratados.

A espessura das válvulas cardíacas também foi reduzida, porém não completamente normalizada, nos animais tratados, e os níveis de colágeno foram intermediários.

O uso de inibidor de catepsina B demonstrou ser capaz de melhorar as dimensões e a função cardíaca, podendo ser este um potencial agente terapêutico para as MPS.

CAPITULO VI REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aldenhoven M, Boelens J and de Koning TJ (2008) The Clinical Outcome of Hurler Syndrome after Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 14:485–498. doi: 10.1016/j.bbmt.2008.01.009

Almeida PC, Nantes IL, Chagas JR, Rizzi CCA, Faljoni-Alario A, Carmona E, Juliano L, Nader HB and Tersariol ILS (2001) Cathepsin B activity regulation. Heparin-like glycosaminoglycans protect human cathepsin B from alkaline pH-induced inactivation. *J Biol Chem* 276:944–951. doi: 10.1074/jbc.M003820200

Al-Sannaa NA, Bay L, Barbouth DS, Benhayoun Y, Goizet C, Guelbert N, Jones SA, Kyosen SO, Martins AM, Phornphutkul C et al. (2015) Early treatment with laronidase improves clinical outcomes in patients with attenuated MPS I: a retrospective case series analysis of nine sibships. *Orphanet J Rare Dis* 10:131. doi: 10.1186/s13023-015-0344-4

Bach G, Friedman R, Weissmann B and Neufeld EF (1972) The defect in the Hurler and Scheie syndromes: deficiency of α -L-iduronidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 69:2048–2051. doi: 10.1073/pnas.69.8.2048

Baldo G, Mayer FQ, Martinelli B, Dilda A, Meyer F, Ponder KP, Giugliani R and Matte U (2012) Evidence of a progressive motor dysfunction in Mucopolysaccharidosis type I mice. *Behav Brain Res* 233:169–175. doi: 10.1016/j.bbr.2012.04.051

Baldo G, Mayer FQ, Martinelli BZ, de Carvalho TG, Meyer FS, de Oliveira PG, Meurer L, Tavares A, Matte U and Giugliani R (2013) Enzyme replacement therapy started at birth improves outcome in difficult-to-treat organs in mucopolysaccharidosis I mice. *Mol Genet Metab* 109:33–40. doi: 10.1016/j.ymgme.2013.03.005

Baldo G, Wu S, Howe R a, Ramamoothy M, Knutsen RH, Fang J, Mecham RP, Liu Y, Wu X, Atkinson JP et al. (2011) Pathogenesis of aortic dilatation in mucopolysaccharidosis VII mice may involve complement activation. *Mol Genet Metab* 104:608–19. doi: 10.1016/j.ymgme.2011.08.018

Banerjee T, Mukherjee S, Ghosh S, Biswas M, Dutta S, Pattari S, Chatterjee S and Bandyopadhyay A (2014) Clinical significance of markers of collagen metabolism in rheumatic mitral valve disease. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0090527

Bigg PW, Baldo G, Sleeper MM, Donnell PAO, Bai H, Rokkam VRP, Liu Y, Wu S, Giugliani R, Casal ML et al. (2013) Pathogenesis of mitral valve disease in mucopolysaccharidosis VII dogs. *Mol Genet Metab* 110:319–328. doi: 10.1016/j.ymgme.2013.06.013

Bishop JE, Greenbaum R, Gibson DG, Yacoub M and Laurent GJ (1990)

Enhanced deposition of predominantly type I collagen in myocardial disease. *J Mol Cell Cardiol* 22:1157–1165. doi: 10.1016/0022-2828(90)90079-H

Bohley P and Seglen PO (1992) Proteases and proteolysis in the lysosome. *Experientia* 48:151–157. doi: 10.1007/BF01923508

Bolourchi M, Chen Y, Renella P, Nguyen D V. and Wang R (2016) Aortic root dilatation in mucopolysaccharidosis. *Mol Genet Metab* 117:S29. doi: 10.1016/j.ymgme.2015.12.203

Bonnans C, Chou J and Werb Z (2014) Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15:786–801. doi: 10.1038/nrm3904

Braunlin E, Mackey-Bojack S, Panoskaltzis-Mortari A, Berry JM, McElmurry RT, Riddle M, Sun L-Y, Clarke L a, Tolar J and Blazar BR (2006) Cardiac functional and histopathologic findings in humans and mice with mucopolysaccharidosis type I: implications for assessment of therapeutic interventions in hurler syndrome. *Pediatr Res* 59:27–32. doi: 10.1203/01.pdr.0000190579.24054.39

Braunlin EA, Harmatz PR, Scarpa M, Furlanetto B, Kampmann C, Loehr JP, Ponder KP, Roberts WC, Rosenfeld HM and Giugliani R (2011) Cardiac disease in patients with mucopolysaccharidosis: Presentation, diagnosis and management. *J Inherit Metab Dis* 34:1183–1197. doi: 10.1007/s10545-011-9359-8

Brömme D and Wilson S (2011) Role of Cysteine Cathepsins in Extracellular Proteolysis. In: Parks WC and Mecham RP (eds) *Extracellular Matrix Degradation*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 23–51

Brooks DA, Kakavanos R and Hopwood JJ (2003) Significance of immune response to enzyme-replacement therapy for patients with a lysosomal storage disorder. *Trends Mol Med* 9:450–453. doi: 10.1016/j.molmed.2003.08.004

Buck MR, Karustis DG, Day NA, Honn K V and Sloane BF (1992) Degradation of extracellular-matrix proteins by human cathepsin B from normal and tumour tissues. *Biochem J* 282 (Pt 1):273–8.

Buttle DJ, Murata M, Knight CG and Barrett AJ (1992) CA074 methyl ester: a proinhibitor for intracellular cathepsin B. *Arch Biochem Biophys* 299:377–80.

Byers S, Rozaklis T, Brumfield LK, Ranieri E and Hopwood JJ (1998) Glycosaminoglycan accumulation and excretion in the mucopolysaccharidoses: characterization and basis of a diagnostic test for MPS. *Mol Genet Metab* 65:282–290. doi: 10.1006/mgme.1998.2761

Cattell MA, Anderson JC and Hasleton PS (1996) Age-related changes in amounts and concentrations of collagen and elastin in normotensive human thoracic aorta.

Clin Chim Acta 245:73–84. doi: 10.1016/0009-8981(95)06174-6

Cheng XW, Shi G-P, Kuzuya M, Sasaki T, Okumura K and Murohara T (2012) Role for cysteine protease cathepsins in heart disease: focus on biology and mechanisms with clinical implication. *Circulation* 125:1551–62. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.066712

Cimaz R and La Torre F (2014) Mucopolysaccharidoses. *Curr Rheumatol Rep* 16:389. doi: 10.1007/s11926-013-0389-0

Clarke LA, Russell CS, Pownall S, Warrington CL, Borowski A, Dimmick JE, Toone J and Jirik FR (1997) Murine mucopolysaccharidosis type I: targeted disruption of the murine alpha-L-iduronidase gene. *Hum Mol Genet* 6:503–11. doi: 10.1093/hmg/6.4.503

Cleutjens JPM and Creemers EEJM (2016) Integration of concepts: Cardiac extracellular matrix remodeling after myocardial infarction. *J Card Fail* 8:S344–S348. doi: 10.1054/jcaf.2002.129261

Coen M, Menegatti E, Salvi F, Mascoli F, Zamboni P, Gabbiani G and Bochaton-Piallat ML (2013) Altered collagen expression in jugular veins in multiple sclerosis. *Cardiovasc Pathol* 22:33–38. doi: 10.1016/j.carpath.2012.05.005

Combs MD and Yutzey KE (2009) Heart valve development: Regulatory networks in development and disease. *Circ Res* 105:408–421. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.201566

Conus S and Simon H-U (2008) Cathepsins: key modulators of cell death and inflammatory responses. *Biochem Pharmacol* 76:1374–82. doi: 10.1016/j.bcp.2008.07.041

Costa MGS, Batista PR, Shida CS, Robert CH, Bisch PM and Pascutti PG (2010) How does heparin prevent the pH inactivation of cathepsin B? Allosteric mechanism elucidated by docking and molecular dynamics. *BMC Genomics* 11 Suppl 5:S5. doi: 10.1186/1471-2164-11-S5-S5

Coutinho MF, Lacerda L and Alves S (2012) Glycosaminoglycan Storage Disorders: A Review. *Biochem Res Int* 2012:1–16. doi: 10.1155/2012/471325

Dangel JH (1998) Cardiovascular changes in children with mucopolysaccharide storage diseases and related disorders- clinical and echocardiographic findings in 64 patients. *Eur J Pediatr* 157:534–538. doi: 10.1007/s004310050872

De Oliveira PG, Baldo G, Mayer FQ, Martinelli B, Meurer L, Giugliani R, Matte U and Xavier RM (2013) Characterization of joint disease in mucopolysaccharidosis type I mice. *Int J Exp Pathol* 94:305–311. doi: 10.1111/iep.12033

Didangelos A, Yin X, Mandal K, Baumert M, Jahangiri M and Mayr M (2010)

Proteomics characterization of extracellular space components in the human aorta. *Mol Cell Proteomics* 9:2048–2062. doi: 10.1074/mcp.M110.001693

Fesslová V, Corti P, Sersale G, Rovelli A, Russo P, Mannarino S, Butera G and Parini R (2009) The natural course and the impact of therapies of cardiac involvement in the mucopolysaccharidoses. *Cardiol Young* 19:170–178. doi: 10.1017/S1047951109003576

Ge J, Zhao G, Chen R, Li S, Wang S, Zhang X, Zhuang Y, Du J, Yu X, Li G et al. (2006) Enhanced myocardial cathepsin B expression in patients with dilated cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291:H284–H289. doi: 10.1016/j.ejheart.2005.09.004

Gelse K, Pöschl E and Aigner T (2003) Collagens - Structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev* 55:1531–1546. doi: 10.1016/j.addr.2003.08.002

Giugliani R, Federhen A, Rojas MVM, Vieira T, Artigalás O, Pinto LL, Azevedo AC, Acosta A, Bonfim C, Lourenço CM et al. (2010) Mucopolysaccharidosis I, II, and VI: Brief review and guidelines for treatment. *Genet Mol Biol* 33:589–604. doi: 10.1590/S1415-47572010005000093

Giugliani R, Federhen A, Vairo F, Vanzella C, Pasqualim G, da Silva LMR, Giugliani L, de Boer APK, de Souza CFM, Matte U et al. (2016) Emerging drugs for the treatment of mucopolysaccharidoses. *Expert Opin Emerg Drugs* 8214:1–18. doi: 10.1517/14728214.2016.1123690

Giugliani R, Harmatz P and Wraith JE (2007) Management guidelines for mucopolysaccharidosis VI. *Pediatrics* 120:405–418. doi: 10.1542/peds.2006-2184

Gondi CS and Rao JS (2013) Cathepsin B as a cancer target. *Expert Opin Ther Targets* 17:281–91. doi: 10.1517/14728222.2013.740461

Green KA and Lund LR (2005) ECM degrading proteases and tissue remodelling in the mammary gland. *BioEssays* 27:894–903. doi: 10.1002/bies.20281

Hinton RB and Yutzey KE (2011) Heart Valve Structure and Function in Development and Disease. *Annu Rev Physiol* 73:29–46. doi: 10.1146/annurev-physiol-012110-142145

Hoegen T, Tremel N, Klein M, Angele B, Wagner H, Kirschning C, Pfister H-W, Fontana A, Hammerschmidt S and Koedel U (2011) The NLRP3 inflammasome contributes to brain injury in pneumococcal meningitis and is activated through ATP-dependent lysosomal cathepsin B release. *J Immunol* 187:5440–51. doi: 10.4049/jimmunol.1100790

Jordan MC, Zheng Y, Ryazantsev S, Rozengurt N, Roos KP and Neufeld EF (2005) Cardiac manifestations in the mouse model of mucopolysaccharidosis I. *Mol Genet Metab* 86:233–243. doi: 10.1016/j.ymgme.2005.05.003

Jugdutt BI (2003) Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix: when is enough enough? *Circulation* 108:1395–403. doi: 10.1161/01.CIR.0000085658.98621.49

Junqueira LC, Bignolas G and Brentani RR (1979) Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J* 11:447–55.

Kothapalli N, Camporeale G, Kueh A, Chew YC, Oommen AM, Griffin JB and Zemleni J (2005) Biological functions of biotinylated histones. *J Nutr Biochem* 16:446–448. doi: 10.1016/j.jnutbio.2005.03.025

Lah TT and Kos J (1998) Cysteine proteinases in cancer progression and their clinical relevance for prognosis. *Biol Chem* 379:125–30.

Lattouf R, Younes R, Lutomski D, Naaman N, Godeau G, Senni K and Changotade S (2014) Picrosirius Red Staining: A Useful Tool to Appraise Collagen Networks in Normal and Pathological Tissues. *J Histochem Cytochem* 62:751–758. doi: 10.1369/0022155414545787

Leal GN, de Paula AC, Leone C and Kim C a (2010) Echocardiographic study of paediatric patients with mucopolysaccharidosis. *Cardiol Young* 20:254–261. doi: 10.1017/S104795110999062X

Li Z, Yasuda Y, Li W, Bogyo M, Katz N, Gordon RE, Fields GB and Br??mme D (2004) Regulation of Collagenase Activities of Human Cathepsins by Glycosaminoglycans. *J Biol Chem* 279:5470–5479. doi: 10.1074/jbc.M310349200

Liu A, Gao X, Zhang Q and Cui L (2013) Cathepsin B inhibition attenuates cardiac dysfunction and remodeling following myocardial infarction by inhibiting the NLRP3 pathway. *Mol Med Rep* 8:361–6. doi: 10.3892/mmr.2013.1507

Lutgens SPM, Cleutjens KBJM, Daemen MJ a P and Heeneman S (2007) Cathepsin cysteine proteases in cardiovascular disease. *FASEB J* 21:3029–41. doi: 10.1096/fj.06-7924com

Ma X, Tittiger M, Knutsen RH, Kovacs A, Schaller L, Mecham RP and Ponder KP (2008) Upregulation of elastase proteins results in aortic dilatation in mucopolysaccharidosis I mice. *Mol Genet Metab* 94:298–304. doi: 10.1016/j.ymgme.2008.03.018

Mach L, Mort JS and Glossl J (1994) Maturation of human procathepsin B. Proenzyme activation and proteolytic processing of the precursor to the mature proteinase, in vitro, are primarily unimolecular processes. *J Biol Chem* 269:13030–13035.

Martins AM, Dualibi AP, Norato D, Takata ET, Santos ES, Valadares ER, Porta G,

de Luca G, Moreira G, Pimentel H et al. (2009) Guidelines for the management of mucopolysaccharidosis type I. *J Pediatr* 155:S32–46. doi: 10.1016/j.jpeds.2009.07.005

Metcalf J a, Linders B, Wu S, Bigg P, O'Donnell P, Sleeper MM, Whyte MP, Haskins M and Ponder KP (2010) Upregulation of elastase activity in aorta in mucopolysaccharidosis I and VII dogs may be due to increased cytokine expression. *Mol Genet Metab* 99:396–407. doi: 10.1016/j.ymgme.2009.12.003

Mohamed MM and Sloane BF (2006) Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer* 6:764–775. doi: 10.1038/nrc1949

Mohan UR, Hay a a, Cleary M a, Wraith JE and Patel RG (2002) Cardiovascular changes in children with mucopolysaccharide disorders. *Acta Paediatr* 91:799–804. doi: 10.1080/08035250213211

Montaser M, Lalmanach G and Mach L (2002) CA-074, but not its methyl ester CA-074Me, is a selective inhibitor of cathepsin B within living cells. *Biol Chem* 383:1305–1308. doi: 10.1515/BC.2002.147

Montes GS and Junqueira LC (1991) The use of the Picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86 Suppl 3:1–11. doi: 10.1590/S0074-02761991000700002

Mort JS and Buttle DJ (1997) Cathepsin B. *Int J Biochem Cell Biol* 29:715–720. doi: 10.1016/S1357-2725(96)00152-5

Muenzer J, Wraith JE and Clarke LA (2009) Mucopolysaccharidosis I: Management and Treatment Guidelines. *Pediatrics* 123:19–29. doi: 10.1542/peds.2008-0416

Nagase H, Visse R and Murphy G (2006) Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 69:562–573. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.12.002

Nemes A, Timmermans RGM, Wilson JHP, Soliman OII, Krenning BJ, ten Cate FJ and Geleijnse ML (2008) The mild form of mucopolysaccharidosis type I (Scheie syndrome) is associated with increased ascending aortic stiffness. *Heart Vessels* 23:108–111. doi: 10.1007/s00380-007-1013-x

Neufeld EF and Muenzer J (2001) The Mucopolysaccharidoses. *Online Metab Mol Bases Inherit Dis* 3421–3454. doi: 10.1036/ommbid.165

Ohmi K, Greenberg DS, Rajavel KS, Ryazantsev S, Li HH and Neufeld EF (2003) Activated microglia in cortex of mouse models of mucopolysaccharidoses I and IIIB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:1902–7. doi: 10.1073/pnas.252784899

Pan D, Sciascia A, Vorhees C V. and Williams MT (2008) Progression of multiple

behavioral deficits with various ages of onset in a murine model of Hurler syndrome. *Brain Res* 1188:241–253. doi: 10.1016/j.brainres.2007.10.036

Pastores GM, Arn P, Beck M, Clarke JTR, Guffon N, Kaplan P, Muenzer J, Norato DYJ, Shapiro E, Thomas J et al. (2007) The MPS I registry: Design, methodology, and early findings of a global disease registry for monitoring patients with Mucopolysaccharidosis Type I. *Mol Genet Metab* 91:37–47. doi: 10.1016/j.ymgme.2007.01.011

Pereira VG, Gazarini ML, Rodrigues LC, Da Silva FH, Han SW, Martins AM, Tersariol ILS and D'Almeida V (2010) Evidence of lysosomal membrane permeabilization in mucopolysaccharidosis type I: Rupture of calcium and proton homeostasis. *J Cell Physiol* 223:335–342. doi: 10.1002/jcp.22039

Premzl A, Zavašnik-Bergant V, Turk V and Kos J (2003) Intracellular and extracellular cathepsin B facilitate invasion of MCF-10A neoT cells through reconstituted extracellular matrix in vitro. *Exp Cell Res* 283:206–214. doi: 10.1016/S0014-4827(02)00055-1

Qian F, Frankfater a, Chan SJ and Steiner DF (1991) The structure of the mouse cathepsin B gene and its putative promoter. *DNA Cell Biol* 10:159–68.

Roshy S, Sloane BF and Moin K (2003) Pericellular cathepsin B and malignant progression. *Cancer Metastasis Rev* 22:271–86.

Rowan AD, Mason P, Mach L and Mort JS (1992) Rat procathepsin B: Proteolytic processing to the mature form in vitro. *J Biol Chem* 267:15993–15999.

Russell C, Hendson G, Jevon G, Matlock T, Yu J, Aklujkar M, Ng KY and Clarke L a (1998) Murine MPS I: insights into the pathogenesis of Hurler syndrome. *Clin Genet* 53:349–61. doi: 10.1111/j.1399-0004.1998.tb02745.x

Schroeder L, Orchard P, Whitley CB, Berry JM, Tolar J, Miller W and Braunlin EA (2012) Cardiac Ultrasound Findings in Infants with Severe (Hurler Phenotype) Untreated Mucopolysaccharidosis (MPS) Type I. *JIMD Reports*. pp 87–94

Sifuentes M, Doroshov R, Hoft R, Mason G, Walot I, Diament M, Okazaki S, Huff K, Cox GF, Swiedler SJ et al. (2007) A follow-up study of MPS I patients treated with laronidase enzyme replacement therapy for 6 years. *Mol Genet Metab* 90:171–180. doi: 10.1016/j.ymgme.2006.08.007

Spinale FG (2002) Matrix metalloproteinases: Regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res* 90:520–530. doi: 10.1161/01.RES.0000013290.12884.A3

Stephens EH, Nguyen TC, Itoh A, Ingels NB, Miller DC and Grande-Allen KJ (2008) The Effects of Mitral Regurgitation Alone Are Sufficient for Leaflet Remodeling. *Circulation* 118:S243–S249. doi:

10.1161/CIRCULATIONAHA.107.757526

Szpaderska AM and Frankfater A (2001) An intracellular form of cathepsin b contributes to invasiveness in cancer. *Cancer Res* 61:3493–3500.

Tolar J and Orchard PJ (2008) alpha-L-iduronidase therapy for mucopolysaccharidosis type I. *Biologics* 2:743–51.

Turk B, Turk D and Turk V (2000) Lysosomal cysteine proteases: More than scavengers. *Biochim Biophys Acta - Protein Struct Mol Enzymol* 1477:98–111. doi: 10.1016/S0167-4838(99)00263-0

Turk V, Stoka V, Vasiljeva O, Renko M, Sun T, Turk B and Turk D (2012) Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics* 1824:68–88. doi: 10.1016/j.bbapap.2011.10.002

Valayannopoulos V and Wijburg FA (2011) Therapy for the mucopolysaccharidoses. *Rheumatology* 50:49–59. doi: 10.1093/rheumatology/ker396

Vieira T, Schwartz I, Mu??oz V, Pinto L, Steiner C, Ribeiro M, Boy R, Ferraz V, De Paula A, Kim C et al. (2008) Mucopolysaccharidoses in Brazil: What happens from birth to biochemical diagnosis? *Am J Med Genet Part A* 146:1741–1747. doi: 10.1002/ajmg.a.32320

Volpi N, Maccari F, Galeotti F, Zampini L, Santoro L, Padella L, Galeazzi T, Gabrielli O and Coppa G V. (2013) Plasmatic dermatan sulfate and chondroitin sulfate determination in mucopolysaccharidoses. *J Pharm Biomed Anal* 85:40–45. doi: 10.1016/j.jpba.2013.06.026

Wang D, Shukla C, Liu X, Schoeb TR, Clarke LA, Bedwell DM and Keeling KM (2010) Characterization of an MPS I-H knock-in mouse that carries a nonsense mutation analogous to the human IDUA-W402X mutation. *Mol Genet Metab* 99:62–71. doi: 10.1016/j.ymgme.2009.08.002

Yano S, Moseley K and Pavlova Z (2009) Postmortem studies on a patient with mucopolysaccharidosis type I: histopathological findings after one year of enzyme replacement therapy. *J Inherit Metab Dis* 32 Suppl 1:S53–7. doi: 10.1007/s10545-009-1057-4