

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

**EFEITOS DA TERAPIA DE REPOSIÇÃO ENZIMÁTICA COM INÍCIO TARDIO
NO MODELO MURINO DE MUCOPOLISSACARIDOSE DO TIPO I**

Gabriela Pasqualim

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular

Orientadora: Profa. Dra. Ursula Matte

Colaborador: Prof. Dr. Guilherme Baldo

Porto Alegre, março de 2013.

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi realizado no Centro de Terapia Gênica e na Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

As fontes financiadoras foram o Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - Edital Universal 480828/2011-3), e o Instituto Genética Para Todos (IGPT).

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profa. Dra. Ursula Matte por toda confiança depositada durante sua orientação dedicada e sempre presente neste projeto de mestrado e nos demais projetos de pesquisa.

Ao Dr. Roberto Giugliani por todas as oportunidades de crescimento profissional proporcionadas durante o mestrado.

Ao Dr Guilherme Baldo por sua coorientação que infelizmente não pode ser formalizada, mas que foi muito importante, e sua participação ativa em todas as etapas deste projeto.

À Me. Talita Giacomet de Carvalho por sua participação fundamental nas etapas realizadas na Unidade de Experimentação Animal.

Aos colegas do Centro de Terapia Gênica por todo companheirismo, amizade, apoio e incentivo.

A minha família, especialmente minha mãe, e meu namorado pelo apoio, carinho e compreensão.

Ao Elmo do PPGBM pela simpatia e auxílio nas questões burocráticas institucionais.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	5
LISTA DE TABELAS	6
LISTA DE FIGURAS.....	6
RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
INTRODUÇÃO	9
Doenças Lisossômicas	9
Mucopolissacaridoses.....	10
Mucopolissacaridose do tipo I.....	12
Tratamentos.....	16
<i>Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas</i>	16
<i>Terapia de Reposição Enzimática</i>	17
Modelos animais.....	20
OBJETIVOS	22
Objetivos Específicos.....	22
ARTIGO.....	23
DISCUSSÃO	46
CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

LISTA DE ABREVIATURAS

DL - Doenças Lisossômicas

ERT – *Enzyme Replacement Therapy*

GAG - glicosaminoglicanos

IgG – imunoglobulina da classe G

IDUA - α -L-iduronidase

LV – *Left Ventricular*

MPS – Mucopolissacaridoses

MPS I – Mucopolissacaridose do tipo I

MPS IH – Síndrome de Hurler

MPS IH/S – Síndrome de Hurler/ Scheie

MPS IS – Síndrome de Scheie

MPS II – Mucopolissacaridose do tipo II (Síndrome de Hunter)

MPS VI – Mucopolissacaridose do tipo VI (Síndrome de Maroteaux-Lamy)

OMIM – *Online Mendelian Inheritance in Men*

TCTH - Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas

TRE – Terapia de Reposição Enzimática

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1: Características gerais das Mucopolissacaridoses. Adaptado de Neufeld e Muenzer, 2001.	11
Figura 1: Rota de degradação de dermatan sulfato e heparan sulfato.....	13
Figura 2: Camundongos da colônia MPS I aos 6 meses de idade.	47
Figura 3: Camundongos da colônia MPS I aos 8 meses de idade..	48
Figura 4: Resultados do teste open field de camundongos de 8 meses normais (n=7), MPS I (n=11) e tratados com laronidase dos 6 aos 8 meses.....	52

RESUMO

A Mucopolissacaridose do tipo I (MPS I) é uma doença autossômica recessiva causada pela deficiência da hidrolase lisossomal α -L-iduronidase (IDUA, EC 3.2.1.76). Essa deficiência leva ao acúmulo progressivo dos glicosaminoglicanos (GAGs) heparan e dermatan sulfato nos tecidos com subsequente alteração da função celular e dano em múltiplos órgãos. Existem evidências na literatura de que a introdução precoce da Terapia de Reposição Enzimática (TRE) leva a um melhor prognóstico, principalmente para pacientes com a forma grave da doença (Síndrome de Hurler), prevenindo ou minimizando danos irreversíveis. Tendo em vista que a maioria dos pacientes brasileiros com MPS I é diagnosticada tardiamente e não recebe tratamento imediato, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da TRE na reversibilidade dos sintomas no modelo murino de MPS I. Animais com MPS I foram tratados dos 6 aos 8 meses com laronidase na dose de 1,2mg/kg a cada duas semanas e comparados com camundongos normais e MPS I não tratados de 8 meses. A TRE tardia foi efetiva na redução de GAGs urinários e viscerais. Apesar da normalização dos GAGs do miocárdio e da fração de encurtamento ventricular esquerda, a função cardíaca não foi completamente restaurada. A fração de ejeção ventricular esquerda e a razão entre aceleração e ejeção na artéria pulmonar dos camundongos tratados atingiram apenas níveis intermediários entre camundongos normais e não tratados. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na espessura da parede da aorta, mas as válvulas cardíacas foram significativamente reduzidas no grupo tratado. Uma grande variabilidade nos resultados dos testes comportamentais foi encontrada nos animais tratados. Esse achado não pode ser correlacionado com nenhuma outra variável como níveis de GAGs ou atividade de catepsina D no córtex cerebral, além da função cardíaca ou formação de anticorpos. Todos os animais que receberam laronidase desenvolveram anticorpos contra a enzima, sem que os níveis de anticorpos apresentassem correlação com os outros parâmetros analisados. Em conclusão, a administração da TRE tardia melhora diversos aspectos da doença e deve ser considerada sempre que possível.

ABSTRACT

Mucopolysaccharidosys type I (MPS I) is a rare disorder caused by deficiency of the lysosomal hydrolase α -L-iduronidase (IDUA, EC 3.2.1.76). This deficiency leads to progressive storage of glycosaminoglycans (GAGs) heparan and dermatan sulphate, with subsequent disturbances in cell function and multiorgan damage. There is a consensus in the literature that early Enzyme Replacement Therapy (ERT) leads to a better outcome, particularly in patients with the severe form of the disease (Hurler syndrome), preventing or minimizing irreversible damage. Since most Brazilian patients are diagnosed late and don't receive immediate treatment, the aim of this study was to evaluate the effects of late ERT on symptom reversibility in a MPS I murine model. We treated 10 MPS I mice from 6 to 8 months (ERT 6-8mo) with 1.2mg laronidase/kg every 2 weeks and compared to 8 months-old wild-type (Normal) and untreated animals (MPS I). Late ERT was effective reducing urinary and visceral GAGs to normal levels. Although myocardium GAGs and left ventricular (LV) shortening fraction were normalized, cardiac function wasn't completely restored. LV ejection fraction and acceleration/ejection ratio at the pulmonary valve reached intermediary levels between normal and untreated MPS I mice. While no significant results were found on aortic wall width, heart valves were significantly smaller in the ERT 6-8mo than in untreated mice. A wide variability was found on the behavior tests of treated animals. No correlation was found between this finding and any other variable, such as GAG levels, cerebral cortex cathepsin D activity, heart function or antibody formation. All animals treated with laronidase developed antibodies against the enzyme but no correlation was found with other parameters analyzed. In conclusion, late ERT improves many aspects of the disease and should be considered whenever possible.

INTRODUÇÃO

Doenças Lisossômicas

As Doenças Lisossômicas (DLs) são erros inatos do metabolismo resultantes da deficiência de enzimas lisossomais específicas. Em alguns casos, proteínas lisossômicas não enzimáticas ou proteínas não lisossomais envolvidas na biogênese do lisossomo estão envolvidas (Filocamo and Morrone, 2011). Um ponto comum a todas é o acúmulo inicial de macromoléculas ou compostos monoméricos dentro de organelas do sistema endossomal-autofágico-lisossomal (Platt, Boland and Spoel, van der, 2012).

Apesar de individualmente raras, quando considerados como um grupo, sua prevalência é significativa (1:4000 – 1:9000 nascidos vivos) (Giugliani, 2012). Com exceção de Doença de Fabry, Mucopolissacaridose do tipo II e Doença de Danon, que tem herança ligada ao X, as demais enfermidades são autossômicas recessivas.

A maior parte das proteínas lisossomais é codificada por genes *housekeeping* e expressa por todo o corpo (Wilcox, 2004). Além disso, as enzimas lisossômicas podem agir em diferentes substratos que possuem o mesmo resíduo terminal, gerando um padrão complexo de acúmulo (Wraith, 2002). Dessa forma, as DLs possuem uma expressão fenotípica extremamente variada e multissistêmica (Filocamo and Morrone, 2011; Neufeld and Muenzer, 2001; Wilcox, 2004; Wraith, 2002). Outro aspecto importante deste grupo de doenças é o fato de serem progressivas. Normalmente, os pacientes são assintomáticos ao nascimento e os sintomas clínicos se tornam evidentes durante a infância, aumentando a morbidade e diminuindo a expectativa de vida (Giugliani, 2012).

Atualmente mais de 50 DLs são conhecidas. Existe uma tendência de classificá-las de acordo com o defeito molecular apresentado em categorias como: deficiências de enzimas lisossomais, defeitos de tráfego de enzimas lisossomais, defeitos em proteínas lisossomais solúveis não enzimáticas e defeitos de proteínas de membrana lisossomal (Filocamo and Morrone, 2011;

Platt, Boland and van der Spoel, 2012). Porém, tradicionalmente sua classificação costuma ser feita tendo como base o substrato acumulado: lipidoses (lipídios), glicogenoses (glicogênio), oligossacaridoses (oligossacarídeos) e as mucopolissacaridoses (glicosaminoglicanos) (Wraith, 2002).

Mucopolissacaridoses

As mucopolissacaridoses (MPS) são um grupo de 7 doenças hereditárias causadas pela deficiência de enzimas lisossômicas envolvidas na degradação dos glicosaminoglicanos (GAGs) heparan sulfato, dermatan sulfato, condroitin sulfato, queratan sulfato e hialuronana. Essas substâncias são principalmente encontradas como constituintes de membranas celulares (heparan), tecidos conjuntivos (dermatan), cartilagens e córnea (queratan e condroitin) (Valayannopoulos and Wijburg, 2011). Os substratos parcialmente ou não degradados são acumulados nos lisossomos e/ou excretados na urina. O acúmulo lisossomal de GAGs gerado resulta em disfunções nas células, tecidos e órgãos. As doenças são crônicas e progressivas e geralmente apresentam um grande espectro de gravidade clínica mesmo para uma mesma deficiência enzimática (Neufeld and Muenzer, 2001). A tabela 1 lista os diferentes tipos de MPS, os respectivos genes e enzimas envolvidos e os GAGs acumulados.

Os GAGs, antigamente conhecidos como mucopolissacarídeos, são cadeias polissacarídicas não-ramificadas compostas de unidades dissacarídeas repetidas. São constituintes da matriz extracelular, onde formam géis hidratados e servem como suporte aos tecidos. Com exceção da hialuronana (também conhecida como ácido hialurônico), estão covalentemente ligados a um núcleo proteico, na forma de proteoglicanos (Alberts *et al.*, 2004).

Tabela 1: Características gerais das Mucopolissacaridoses. Adaptado de Neufeld e Muenzer, 2001.

Tipo	Epônimo	Sigla	# OMIM	Gene afetado	Enzima deficiente	GAG acumulado
I	Hurler	MPS IH	607014			
	Hurler/Scheie	MPS IH/S	607015	<i>IDUA</i>	α -L-iduronidase	Heparan sulfato Dermatan sulfato
	Sheie	MPS IS	607016			
II	Hunter	MPS II	309900	<i>IDS</i>	Iduronato 2-sulfatase	Heparan sulfato Dermatan sulfato
III	Sanfilippo A	MPS IIIA	252900	<i>SCSH</i>	N-Sulfoglicosamina Sulfohidrolase (Sulfaminidase)	
	Sanfilippo B	MPS IIIB	252920	<i>NAGLU</i>	α -N-Acetilglicosaminidase	Heparan sulfato
	Sanfilippo C	MPS IIIC	252930	<i>HGSNAT</i>	AcetilCoA-alfa-glucosamina acetiltransferase	
	Sanfilippo D	MPS IIID	252940	<i>GNS</i>	N-Acetilglicosamina-6-sulfatase	
IV	Morquio A	MPS IVA	253000	<i>GALNS</i>	N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatase	Queratan sulfato Condroitin sulfato
	Morquio B	MPS IVB	253010	<i>GLB1</i>	β -galactosidase	Queratan sulfato
VI	Maroteaux-Lamy	MPS VI	253200	<i>ARSB</i>	N-Acetilgalactosamina 4-sulfatase (Ariisulfatase B)	Dermatan sulfato
VII	Sly	MPS VII	253220	<i>GUSB</i>	β -glicuronidase	Heparan sulfato Dermatan sulfato Condroitin sulfato
IX	-	MPS IX	601492	<i>HYAL1</i>	Hialuronidase 1	Hialuronana

Existe um contínuo *turnover* celular de proteoglicanos. Pouco se sabe sobre a regulação desse processo, mas o sistema lisossomal é claramente um integrante da homeostase da matriz extracelular. A degradação dos proteoglicanos inicia-se pela sua clivagem por proteases extracelulares. Cadeias de até doze GAGs são liberadas e endocitadas por condrócitos ou células endoteliais. A degradação intracelular subsequente é feita pela ação sequencial das enzimas lisossomais (Winchester, 1996).

A análise de GAGs na urina foi o primeiro método disponível para o diagnóstico das MPS e continua útil como método de *screening*, permitindo uma abordagem tanto quantitativa (níveis elevados de GAGs) quanto qualitativa (perfil característico de derivados de sulfato) (Coppa *et al.*, 2010; Mahalingam *et al.*, 2004; Neufeld and Muenzer, 2001). Entretanto, falsos negativos são comuns, especialmente se as amostras são muito diluídas ou se o método utilizado não é muito sensível (Mahalingam *et al.*, 2004; Muenzer, 2011). O diagnóstico definitivo é feito através da dosagem da atividade enzimática em soro, plasma, leucócitos ou fibroblastos cultivados, geralmente com a utilização de substratos artificiais cromogênicos ou fluorogênicos (Muenzer, 2011; Neufeld and Muenzer, 2001).

Mucopolissacaridose do tipo I

A Mucopolissacaridose do tipo I (MPS I) é causada pela deficiência da hidrolase lisossomal α -L-iduronidase (IDUA, EC 3.2.1.76). Seu gene codificante, *IDUA*, está localizado no cromossomo 4, na região 4p16.3 (Scott *et al.*, 1990). Possui aproximadamente 19 kb e inclui 14 éxons que originam um mRNA de 2,3 kb (Scott *et al.*, 1992).

A IDUA hidrolisa resíduos terminais de ácido α -L-idurônico de dermatan e heparan sulfato (Figura 1). Esses compostos fazem parte de proteoglicanos e dão apoio estrutural a matriz extracelular e estruturas cartilaginosas como articulações e válvulas cardíacas, além de estarem envolvidos com a regulação e comunicação celular (Muenzer, Wraith and Clarke, 2009). Portanto, deficiências dessa enzima levam ao bloqueio na rota de degradação desses GAGs. Isso

ocasiona o acúmulo nos lisossomos com subsequente disfunção multissistêmica e excreção na urina de heparan e dermatan não degradados ou parcialmente degradados (Muenzer, Wraith and Clarke, 2009; Neufeld and Muenzer, 2001).

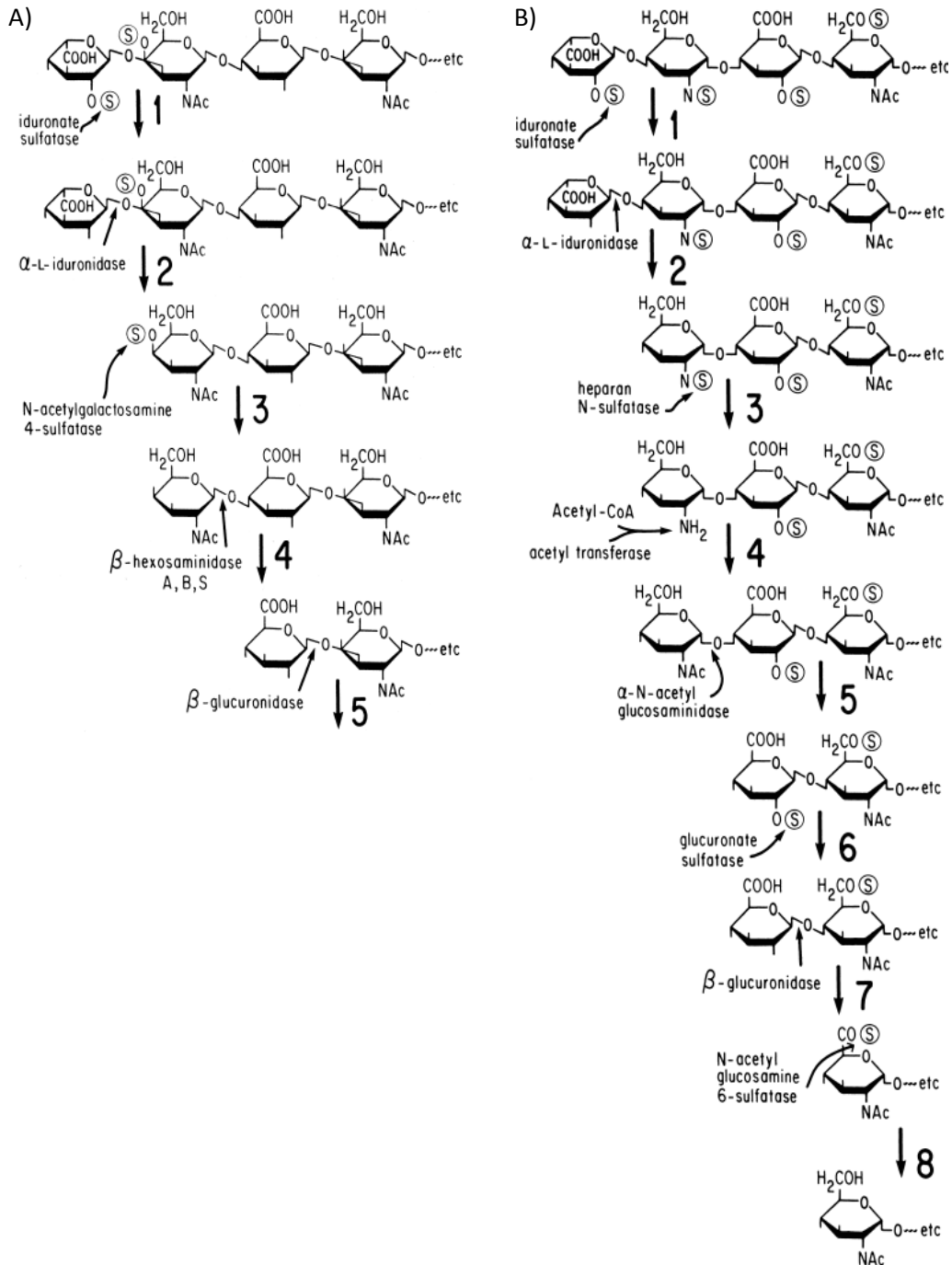


Figura 1: Rota de degradação de dermatan sulfato (A) e heparan sulfato (B). Adaptado de Neufeld & Muenzer, 2001.

Historicamente a doença é dividida em três síndromes distintas: Hurler (MPS IH; OMIM #607014), Hurler/Scheie (MPS IH/S; OMIM #607015) e Scheie (MPS IS; OMIM #607016). Entretanto, existe um espectro fenotípico contínuo e essa divisão baseada na diferença de progressão da doença, não possui limites objetivos entre as diferentes síndromes (Clarke *et al.*, 2009; Wraith *et al.*, 2007).

A MPS IH é a forma mais grave da doença e representa a maior parte dos casos conhecidos, correspondendo a cerca de 50% a 80% dos pacientes (Muenzer, Wraith and Clarke, 2009). Sintomas clínicos incluem deformidades ósseas, infecções de nariz e ouvido recorrentes, hérnias inguinais e umbilicais, feições faciais grosseiras, hepatoesplenomegalia e macroglossia. Existe degeneração neurológica que se inicia por volta de 1 a 2 anos de idade e se acentua a partir dos 4 anos. Na maioria dos casos a morte ocorre na primeira década de vida devido a infecções respiratórias, obstrução das vias aéreas ou complicações cardíacas (Muenzer, Wraith and Clarke, 2009; Neufeld and Muenzer, 2001).

A MPS IH-S apresenta um fenótipo clínico intermediário entre as Síndromes de Hurler e Scheie. É caracterizada por envolvimento somático progressivo, incluindo disostose múltipla, com pouca ou sem disfunção intelectual. Os sintomas são geralmente observados entre 3 e 8 anos de idade com opacificação da córnea, perda da audição, enrijecimento articular e problemas cardíacos (Neufeld and Muenzer, 2001). A expectativa de vida é reduzida, pelos sintomas somáticos, a 20 ou 30 anos (Pastores *et al.*, 2007).

A MPS IS é forma mais atenuada da doença. É caracterizada por rigidez das articulações, doenças cardíacas, opacificação da córnea e outros aspectos somáticos. As feições faciais podem ser grosseiras, mas a inteligência é normal e a estatura é variável. Os sintomas importantes geralmente iniciam depois dos 5 anos; e o diagnóstico é feito entre os 10 e 20 anos de idade (Neufeld and Muenzer, 2001). A expectativa de vida é normal (Zheng *et al.*, 2003).

De um modo geral, existe um lapso de tempo entre o aparecimento de sintomas e o diagnóstico da MPS I. Isso é ocasionado tanto pela grande

heterogeneidade fenotípica quanto pela falta de conhecimento por parte dos pais e médicos sobre o assunto e a falta de acesso universal aos exames laboratoriais (Giugliani, 2012; Muenzer, Wraith and Clarke, 2009). No Brasil, um estudo de Vieira e colaboradores (2008) relatou um tempo médio de 6,2 anos para o diagnóstico de MPS I. Esse dado pode refletir uma menor prevalência de pacientes com a forma grave da doença no Brasil, porém não é possível afirmar se isso se deve a um atraso no diagnóstico (levando a uma perda dos pacientes com a forma grave) ou a uma característica da população brasileira, que possui menor frequência de mutações que levam à perda total da atividade enzimática. A análise de dados de registros colaborativos internacionais também revela um atraso significativo no diagnóstico (Giugliani, 2012).

Testes laboratoriais clínicos, embora úteis para o diagnóstico confirmatório, não podem detectar pequenas diferenças na atividade residual da enzima e não podem prever a gravidade da doença. Portanto, nenhum critério bioquímico ou clínico foi estabelecido que possa distinguir de forma confiável as três síndromes ou prever o curso clínico da doença (Pastores *et al.*, 2007). A análise de mutações é essencial para detecção de portadores e aconselhamento genético. Em alguns casos é possível realizar uma correlação genótipo-fenótipo, especialmente para indivíduos homocigotos para mutações sem sentido como p.W402X e p.Q70X (Muenzer, Wraith and Clarke, 2009). A análise de resíduos de heparan e dermatan sulfato parcialmente degradados em fibroblastos cultivados também se mostrou um bom biomarcador para envolvimento do sistema nervoso central (Fuller *et al.*, 2005).

Apesar de não existirem dados epidemiológicos extensos para MPS I, estimativas de incidência da doença variam de aproximadamente 1:100.000 nascidos vivos para Síndrome de Hurler a 1:800.000 para Síndrome de Scheie (Pastores *et al.*, 2007). Em Porto Alegre estimou-se uma incidência de MPS I em geral de 1:59.000 nascidos vivos (Matte, 1998). Este valor, entretanto, pode ser considerado uma sub-estimativa da incidência real de MPS I uma vez que o período considerado foi de apenas quatro anos (1992-1996) e é possível que novos casos nascidos neste período ainda não tenham sido diagnosticados uma

vez que o diagnóstico ocorre em média entre os 3 e os 10 anos de idade, dependendo da forma clínica da doença.

Tratamentos

Atualmente existem dois tratamentos específicos aprovados para MPS I: o Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas (TCTH) e a Terapia de Reposição Enzimática (TRE). Ambos se baseiam no fato de que as enzimas lisossômicas são marcadas com resíduos de manose-6-fosfato durante sua maturação no sistema de Golgi, os quais são necessários para seu reconhecimento por receptores lisossomais específicos (Filocamo and Morrone, 2011; Muenzer and Fisher, 2004; Wilcox, 2004). Dessa forma, a via dos receptores de manose-6-fosfato permite que as enzimas lisossômicas (exógenas ou endógenas) sejam transportadas através da corrente sanguínea e captadas por células de outros tecidos, onde são encaminhadas aos lisossomos (Wilcox, 2004).

Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas

O racional do Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas (TCTH) é a reconstituição do sistema hematopoiético do paciente com células tronco que produzem a enzima deficiente (sejam elas de medula óssea, cordão umbilical ou sangue periférico) de um doador saudável e compatível (Wilcox, 2004). Essa terapia tem sido utilizada desde a década de 1980, quando uma criança de um ano com a forma mais grave da doença foi transplantada com sucesso com a medula óssea da mãe (Hobbs *et al.*, 1981). Após a cirurgia, o paciente apresentou níveis enzimáticos semelhantes a heterozigotos, teve hepatoesplenomegalia e opacidade córnea revertidas, e seu declínio cognitivo se estabilizou.

O TCTH é o tratamento de escolha para a forma mais grave de MPS e outras DLs, nas quais há envolvimento do sistema nervoso central (Ru, de *et al.*, 2011). Recomenda-se que a cirurgia seja feita antes dos dois anos e meio de idade em pacientes com Hurler e que os mesmos apresentem no máximo

comprometimento cognitivo moderado (Muenzer, Wraith and Clarke, 2009; Ru, de *et al.*, 2011), já que a terapia pode preservar o desenvolvimento intelectual se realizada no início do curso da doença (Peters *et al.*, 1996, 1998).

Esse tratamento pode prevenir morte prematura devido à doença cardíaca ou hepática e prolongar a expectativa de vida dos pacientes (Giugliani *et al.*, 2010). Um transplante exitoso leva a uma rápida redução de GAGs no fígado, amígdalas, fluido espinhal e urina (Peters and Steward, 2003). Além disso, o TCTH pode estabilizar ou melhorar as vias aéreas superiores e a função respiratória (diminuindo apneia do sono) e suavizar a feição característica (Martins *et al.*, 2009). Com relação à doença cardíaca, estabilização da função do miocárdio e preservação da permeabilidade das coronárias são relatadas em alguns pacientes (Braunlin *et al.*, 2003). Entretanto, apesar de acelerar o crescimento (Giugliani *et al.*, 2010), o impacto nas deformidades ósseas é mínimo, provavelmente devido à baixa penetração no tecido (Martins *et al.*, 2009).

Devido às elevadas taxas de morbidade e mortalidade dessa terapia, ela não é indicada para as formas menos graves da doença (Valayannopoulos and Wijburg, 2011). Porém, recentemente, ações como o uso de sangue de cordão de doadores não relacionados, a diminuição do intervalo entre o diagnóstico e o transplante e o uso concomitante da TRE têm diminuído drasticamente essas taxas. (Muenzer, Wraith and Clarke, 2009). Em pacientes europeus com síndrome de Hurler, a taxa de sobrevivência sem rejeição do enxerto chega a 91% (Boelens *et al.*, 2010). Apesar da experiência internacional indicando os possíveis benefícios do TCHT em pacientes com a forma grave, ele ainda é realizado de forma limitada em pacientes brasileiros, especialmente pelo diagnóstico tardio (Giugliani *et al.*, 2010; Muñoz-Rojas *et al.*, 2011).

Terapia de Reposição Enzimática

A Terapia de Reposição Enzimática (TRE) para MPS I consiste na administração de repetidas injeções intravenosas de laronidase (Aldurazyme®, Genzyme Corporation), uma IDUA recombinante humana produzida em células CHO (*Chinese hamster ovary* – ovário de hamster chinês) (Giugliani *et al.*, 2010;

Kakkis *et al.*, 2001). Essa terapia foi aprovada para uso em humanos em 2003 nos Estados Unidos pela FDA (*Food and Drug Administration*) e na Europa pela EMEA (*European Medicines Agency*). No Brasil, a aprovação pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) aconteceu em 2005 (Giugliani *et al.*, 2010).

De acordo com a bula do medicamento, a laronidase é indicada para pacientes com as formas Hurler e Hurler-Scheie e para pacientes que apresentam a forma de Scheie com sintomas moderados a graves. Não foram estabelecidos os riscos e as vantagens de tratar pacientes ligeiramente afetados pela forma Scheie. Devido ao fato de que na dose usual a enzima não passa a barreira hematoencefálica em níveis terapêuticos, o seu efeito sobre o sistema nervoso central é muito limitado. Dessa forma, a TRE não é indicada para o tratamento dos sintomas neurológicos da MPS I (Giugliani *et al.*, 2010; Martins *et al.*, 2009; Muenzer, Wraith and Clarke, 2009; Muenzer, 2011; Sifuentes *et al.*, 2007)

A dose recomendada é de 0,58mg/ kg, administrada uma vez por semana durante 3 ou 4 horas. Essa dose foi baseada em testes no modelo canino de MPS I que compararam a biodistribuição da enzima e a redução de GAGs teciduais (Giugliani *et al.*, 2009; Kakkis *et al.*, 1996). O intervalo entre as infusões foi baseado em um estudo com fibroblastos de pacientes com Hurler tratados que concluiu que a meia vida da laronidase é de 5 dias (Kakkis *et al.*, 1994). Um ensaio clínico conduzido por Giugliani e colaboradores (2009) demonstrou que a dose indicada apresenta o melhor risco-benefício em comparação com 3 regimes alternativos testados: 1,2 mg/kg a cada semana, 1,2 mg/kg a cada 2 semanas e 1.8 mg/kg a cada 2 semanas. Entretanto, uma dose de 1,2mg/kg a cada duas semanas pode ser uma alternativa válida para pacientes com dificuldades de receber infusões semanais.

Os resultados mais constantes dos ensaios clínicos publicados são a redução da excreção de GAGs urinários, hepatomegalia e episódios de apneia/hipoapneia, independentes da forma clínica do paciente. Além disso, também foram observadas melhoras no teste de caminhada de 6 minutos (Clarke *et al.*, 2009; Wraith *et al.*, 2004), aumento da taxa de crescimento e ganho de

peso (Kakkis *et al.*, 2001), aumento do ângulo de flexão do ombro e/ou cotovelo (Clarke *et al.*, 2009; Kakkis *et al.*, 2001), diminuição da hipertrofia ventricular esquerda (Wraith *et al.*, 2007) e estabilização ou melhora da capacidade vital forçada (Clarke *et al.*, 2009; Wraith *et al.*, 2004).

É importante salientar que os diferentes sintomas da doença respondem de forma distinta a TRE e tem tempos de resposta diferentes. Os GAGs urinários, hepatomegalia e apneia do sono são sintomas corrigidos nos primeiros meses de tratamento. Por outro lado, são necessários anos de tratamento para que características como mobilidade, resistência e capacidade de exercer atividades corriqueiras apresentem melhorias mensuráveis (Clarke *et al.*, 2009).

A maioria das reações associadas às infusões é leve, podendo ser manejada com a diminuição da taxa de infusão e administração de anti-histamínicos e/ou esteroides e tende a diminuir após meses de tratamento. As mais comuns são erupções, dor de cabeça, vermelhidão e vômitos (Burton and Whiteman, 2011; Clarke *et al.*, 2009; Muenzer, 2011). Porém, respostas graves como reações anafiláticas podem acontecer. Portanto, os centros de infusão devem estar equipados para paradas cardiorrespiratórias e ter acesso facilitado a uma sala de emergência (Giugliani *et al.*, 2010).

A formação de anticorpos IgG contra a enzima é bastante comum principalmente nas primeiras semanas de tratamento. Está presente em mais de 90% dos pacientes, independente de apresentarem a forma atenuada ou grave (Clarke *et al.*, 2009; Giugliani *et al.*, 2009; Sifuentes *et al.*, 2007; Valayannopoulos and Wijburg, 2011; Wraith *et al.*, 2004). Existe uma correlação inversa entre o título de anticorpos e a redução de GAGs excretados na urina (Clarke *et al.*, 2009; Giugliani *et al.*, 2009; Wraith *et al.*, 2007). Sua significância é incerta, sendo possível que esses pacientes apresentem maiores riscos de reações relacionadas às infusões (Burton and Whiteman, 2011). Entretanto, não foi detectada nenhuma correlação com a eficácia clínica do tratamento (Martins *et al.*, 2009). Além disso, a quantidade de anticorpos tende a diminuir com o passar do tempo.

Além das possíveis reações à enzima e a formação de anticorpos que podem diminuir a eficácia do tratamento; outra desvantagem da TRE é o impacto gerado na qualidade de vida dos pacientes e suas famílias pelos deslocamentos semanais até os poucos centros de infusões. Do mesmo modo, talvez a maior desvantagem da TRE seja o alto custo, que obriga pacientes e familiares a acionarem judicialmente o Estado a pagar pelo tratamento. Entre 2006 e 2010 o Ministério da Saúde gastou R\$ 219.664.476 para aquisição de medicamentos para 195 pacientes com MPS I, II e VI. Deste total, R\$ 9.262.981 foram usados para compra de laronidase para 24 pacientes com MPS I (R\$ 385.987,54 por paciente) (Diniz, Medeiros and Schwartz, 2012).

Dessa forma, uma análise criteriosa dos possíveis benefícios da TRE deve ser feita para cada paciente antes de se decidir iniciar ou não o tratamento. É importante ressaltar que, como no TCTH, existem evidências na literatura de que o quanto antes o tratamento for iniciado, melhor será o prognóstico do paciente devido à natureza irreversível de algumas anormalidades associadas as MPS (McGill *et al.*, 2010; Muenzer, 2011; Schulze-Frenking *et al.*, 2011). Entretanto, não há uma análise sistemática na literatura dos efeitos da TRE em pacientes com Hurler quando os sintomas da doença já estão bem estabelecidos, o que dificulta ainda mais a escolha de tratamento desses pacientes.

Modelos animais

Os modelos animais são ferramentas valiosas para investigação da patogênese da doença e avaliação de possíveis estratégias terapêuticas (Wang *et al.*, 2010). Atualmente existem 5 modelos diferentes para MPS I: um canino e um felino, ambos com ocorrência natural, e 3 modelos murinos. Todos eles mimetizam a forma mais grave da doença, a Síndrome de Hurler. Dessa forma, características como a excreção de heparan e dermatan sulfato na urina, o acúmulo lisossomal de GAGs em diversos tecidos e a baixa atividade de IDUA nos animais afetados são comuns a todos eles.

O modelo felino (Haskins *et al.*, 1983; He *et al.*, 1999) apresenta uma deleção de três nucleotídeos no gene *Idua* que resulta na deleção de um resíduo de aspartato de uma região conservada da proteína. O modelo canino (Menon, Tieu and Neufeld, 1992; Shull *et al.*, 1982; Spellacy *et al.*, 1983) apresenta uma mutação em sitio de *splicing* que causa a retenção do íntron um da *Idua* no mRNA e cria um códon de terminação prematura na junção éxon-intron.

Os dois primeiros modelos murinos desenvolvidos (Clarke *et al.*, 1997; Ohmi *et al.*, 2003) apresentam uma interrupção do éxon 6 do gene *Idua* pela inserção do gene de resistência a neomicina. O modelo mais recente (Wang *et al.*, 2010) apresenta uma mutação sem sentido (W392X) que é análoga à mutação mais frequente de pacientes com Síndrome de Hurler, p.W402X. Diferente dos demais, esse modelo também permite que terapias experimentais para transcritos com mutações sem sentido que evitem a rota de *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD) sejam testadas *in vivo*.

Nosso grupo vem utilizando o modelo animal descrito por Ohmi e colaboradores (2003) para avaliar estratégias terapêuticas para MPS I (Baldo, 2012; Lagranha, 2008; Mayer, 2011). Em um estudo prévio, Baldo e colaboradores (no prelo) verificaram que o uso de TRE iniciada no período neonatal ou no início da vida adulta (2 meses de idade, quando os sintomas da doença estão no início) em camundongos MPS I produziam benefícios em diversos parâmetros. Melhoras significativas foram observadas nos dois grupos em aspectos como GAGs urinários, função cardíaca, redução de GAGs no fígado e surpreendentemente, até mesmo em aspectos de sistema nervoso central. No entanto, a maior parte dos pacientes brasileiros é diagnosticada tardiamente, e os reais benefícios deste tipo de terapia nestes pacientes ainda são controversos. Portanto, torna-se necessário determinar a efetividade da TRE iniciada após o estabelecimento completo dos sintomas.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do tratamento por Terapia de Reposição Enzimática com início tardio sobre a reversibilidade dos sintomas do modelo murino de Mucopolissacaridose do tipo I.

Objetivos Específicos

1. Tratar camundongos MPS I de seis meses com TRE por dois meses.
2. Avaliar se os seguintes parâmetros se alteram com o tratamento:
 - a. quantidade de GAGs na urina e em órgãos periféricos;
 - b. função cardíaca, espessamento da parede da aorta;
 - c. comportamento exploratório e locomotor;
 - d. níveis de GAGs e a atividade de catepsina D no córtex cerebral.
3. Verificar se há desenvolvimento de anticorpos contra a enzima administrada e se os níveis séricos dos mesmos se correlacionam com os parâmetros acima.

ARTIGO

Os materiais e métodos e resultados deste trabalho são apresentados sob a forma de um artigo científico que está em fase de formatação para envio para o *Journal of Inherited Metabolic Diseases*.

Effects of late enzyme replacement therapy in a murine model of Mucopolysaccharidosis type I

Pasqualim G^{1,2}, Baldo G^{1,2}, de Carvalho TG^{1,2}, Tavares AMV², Giugliani R^{1,2,3},
Matte U^{1,2}.

1. Post Graduation Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil
2. Gene Therapy Center, Experimental Research Center, and
3. Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

Corresponding author:

Ursula Matte

Gene Therapy Center

Hospital de Clinicas de Porto Alegre

Ramiro Barcelos, 2350

Porto Alegre, RS

90035-903

Brazil

umatte@hcpa.ufrgs.br

ABSTRACT

Mucopolysaccharidosys type I (MPS I) is a rare progressive disorder caused by deficiency of alpha-L-iduronidase (IDUA), which leads to storage of heparan and dermatan sulphate. There is a consensus in the literature that, early enzyme replacement therapy (ERT) leads to a better outcome, preventing or minimizing irreversible damage. Since most Brazilian patients are diagnosed late and don't receive immediate treatment, the aim of this study was to evaluate the effects of late onset ERT on symptom reversibility in a MPS I murine model. We treated MPS I mice from 6 to 8 months (ERT 6-8mo) with 1.2mg laronidase/kg each 2 weeks and compared to 8 months-old wild-type (Normal) and untreated animals (MPS I). Late ERT was effective reducing urinary and visceral GAG to normal levels. Although heart GAG and left ventricular (LV) shortening fraction were normalized, cardiac function wasn't completely improved, as seen by intermediary values LV ejection fraction and acceleration/ejection ratio at the pulmonary valve. While no significant differences were found on aortic wall width, heart valves were significantly smaller in the ERT 6-8mo than in untreated mice. A high variability was found in behavior tests, with treated animals presenting intermediate results between normal and affected mice. No reduction was observed in cortex GAG levels of treated animals, regardless of behavior test results. Cathepsin D activity in cortex also didn't correlate to behavior heterogeneity. All treated animals developed antibodies but no correlation was found with any other parameters analyzed. In conclusion, the use of late ERT can have beneficial effects on many aspects of the disease and should be considered whenever possible.

KEYWORDS: Mucopolysaccharidosys type I, Enzyme replacement Therapy, late treatment, behavior

SYNOPSIS: Late ERT does not correct all aspects of established MPS disease but is effective in the treatment of many disease aspects and should be considered whenever possible.

1. INTRODUCTION

Mucopolysaccharidosys type I (MPS I) is a rare autosomal recessive disorder caused by deficiency of lysosomal hydrolase alpha-L-iduronidase (IDUA, EC 3.2.1.76), involved in the degradation of glycosaminoglycans (GAG) heparan sulphate (HS) and dermatan sulphate (DS). Its deficiency leads to progressive accumulation of undegraded or partially degraded substrate within lysosomes, with subsequent multiorgan dysfunction and damage (Neufeld and Muenzer 2001). There is a considerable clinical variability in age of onset and rate of disease progression (Muenzer et al. 2009). However, three classical phenotypes are usually considered: severe Hurler (OMIM #67014), intermediary Hurler Scheie (OMIM #607015) and the attenuated Scheie syndrome (OMIM # 67016) (De Ru et al. 2012a).

The Hurler form corresponds to 50-80% of known cases (Muenzer et al. 2009). It shares many systemic manifestations that are found in the attenuated forms, such as growth retardation hepatosplenomegaly, joint stiffness, heart disease and respiratory insufficiency. However, it is rapidly progressive, presents progressive neurodegeneration and death usually occurs during the first decade of life (Neufeld and Muenzer 2001; Clarke et al. 2009; Wolf et al. 2012).

Two treatment options are available for MPS I: hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) and enzyme replacement therapy (ERT). HSCT is the treatment of choice for Hurler patients and if performed until 2-2.5 years of age, before cognitive impairment begins, it can significantly preserve intellectual development (Muenzer et al. 2009; de Ru et al. 2011; Muenzer 2011). ERT with laronidase (Aldurazyme, Genzyme Corporation) has been approved for human use since 2003/2005 (USA and Europe/Brazil). It is indicated for the treatment of non-neurological symptoms of MPS I (Sifuentes et al. 2007; Martins et al. 2009; Muenzer et al. 2009; Giugliani et al. 2010; Muenzer 2011). The most constant results from laronidase clinical trials are reduction of urinary GAG excretion, hepatosplenomegaly and apnea/hypopnea episodes, regardless of the patient's clinical form. Moreover, improvements in 6-Minute Walk Test (Wraith et al. 2004; Clarke et al. 2009), increase in height and weight growth rate (Kakkis et al. 2001),

increase in shoulder and/or elbow range of flexion (Kakkis et al. 2001; Clarke et al. 2009), and stabilization or improvement in forced vital capacity (Wraith et al. 2004; Clarke et al. 2009) were also observed.

There is a consensus in the literature that, being a progressive disorder, early treatment leads to a better outcome of MPS I patients, preventing or minimizing irreversible damage (Tokic et al. 2007; Wraith et al. 2007; Clarke et al. 2009; Martins et al. 2009; Muenzer et al. 2009; Gabrielli et al. 2010; Muenzer 2011; Giugliani 2012). However, worldwide many patients are diagnosed late and do not receive immediate treatment. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effects of late ERT on symptom reversibility of a MPS I murine model.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Experimental Groups

Idua^{-/-} mice on a C57BL/6 background (Ohmi et al. 2003); kindly donated by Dr Elizabeth Neufeld (UCLA, USA), and their normal littermates were used. Animals were maintained at 20°C with food and water *ad libitum*. MPS I (*Idua*^{-/-}) and normal mice were genotyped by PCR as previously described (Baldo et al. 2012a).

At 6 months of age, MPS I mice started receiving 1.2mg/kg of laronidase (Aldurazyme®, Genzyme) intravenously every two weeks until 8 months of age (ERT 6-8 mo, n=10). Wild-type and untreated 8 month-old mice were used as control groups (Normal, n=8 and MPS I, n=11). The enzyme dose was the same used in a previous study from our group (Baldo et al., submitted).

2.2. Tissue collection and histological analysis

At 8.5 months old (two weeks after last enzyme infusion in ERT group), mice were anesthetized with isoflurane, serum was collected by retro-orbital puncture and mice were sacrificed by cervical dislocation. Liver, kidneys, lungs, heart, aorta, and brain (cerebellum and cortex) 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.

Thin cross sections were submitted to routine histological processing, stained with Hematoxylin-Eosin and Alcian Blue and analyzed. Heart valves from the left ventricle were obtained by sectioning the basal part of the heart, and valve thickness was measured in at least 3 different points for at least 4 times each using the QCapture software (Q Imaging, British Columbia, Canada), from which average was calculated and used as a measure of valve thickness. Paraffin processing was performed according to routine techniques.

2.3. GAG measurement

Frozen tissues were homogenized in 0.5mL phosphate buffer 50mM pH 6.5 with 0.24g/L L-cystein and 0.4% EDTA 0.5M, incubated overnight at 60°C, mixed with 150uL chloroform and centrifuged for 15 minutes at 10,000G at 4°C. GAGs were measured using the dimethyl blue (DMB) technique, in which 25 uL of supernatant is mixed with freshly prepared DMB solution (DMB 0.3 mol/L with 2 mol/L Tris) and absorbance was read at 530 nm. For cerebellum and cerebral cortex, 125uL were used. Results were normalized by protein quantity and expressed as percentage of normal mice. Urine samples were centrifuged and 25 µL were used for measuring GAG levels. Results were normalized with creatinine, which was measured using the Picric acid method (Baldo et al. 2012c).

2.4. Echocardiographic analysis

Eight-month old mice were anesthetized with isofluorane and placed in left lateral decubitus position (45° angle) 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 small animal echocardiography. All measurements were performed as previously described (Baldo et al. 2012c). Briefly, equations used were: Left Ventricular Ejection Fraction (LVEF) = (end

diastolic volume – end-systolic volume/ end-diastolic volume) × 100. LV fraction shortening (LVFS) values: $LVFS = (\text{diastolic diameter} - \text{systolic diameter}) / \text{diastolic diameter} \times 100$. Fractional area change (FAC) = diastolic area – systolic area / diastolic area. Measures of the ejection and acceleration times in the pulmonary valve were obtained using Doppler echocardiography, and their ratio (AT/ET) was used as an index of pulmonary vascular resistance (Jones et al. 2002).

2.5. Behavioral tests

Locomotor and exploratory activities were accessed using an open field test in an Activities Monitor IR equipment (Insight, São Paulo, Brazil), which consists of a closed box with clear walls and electronic sensors around them. Mice were placed in one of the corners of the open field and crossings, rearings, distance moved and velocity were analyzed in the first 5 minutes.

2.6. Cathepsin D activity

Cerebral cortex was homogenized in 100 mM sodium acetate buffer pH 5.5 containing 2.5 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 0.1% Triton X-100, and 2.5 mM dithiothreitol. The cathepsin D (CtsD) assay was performed as described by Baldo et al. (2011) at pH 4 with 5 μM of the substrate 7-methoxycoumarin-4-acetyl (Mca)-Gly-Lys-Pro-Ile-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Lys-2,4 nitrophenyl (Dnp)-D-Arg-NH₂, which can also be cleaved by CtsE. The fluorogenic peptide Mca-Pro-Leu-OH (Enzo Life Sciences, USA) was used as the standard.

2.7. Antibody formation

Serum IgG anti-laronidase antibodies were measured at time of sacrifice as previously described (Baldo et al. 2012c). Briefly, 96-well ELISA plates were coated with 4 μg/mL of laronidase (Aldurazyme, Genzyme Corporation) in acid PBS overnight at 4°C. Then, it was blocked with acid PBS 3% BSA and diluted

serum was added (1:50 for normal and MPS I controls and 1:250 for treated mice) in duplicates and incubated for 2h. The secondary antibody conjugated to peroxidase (Goat anti-mouse IgG, Sigma, USA) was diluted 1:1000, incubated for 3h and revealed with TMB for 3 minutes. The reaction was stopped with sulfuric acid 2N and the absorbance read at 450 nm.

2.8. Ethics and Statistics

This study was approved by the authors' institutional ethics committee and all experiments with animals were monitored by a veterinary.

IBM SPSS Statistics version 20 was used for statistical analysis. Results were compared using ANOVA or Kruskal-Wallis and Tukey, as indicated. P values lower than 0.05 were considered statistically significant. GraphPad Prism 5 software was used to graphic design.

3. RESULTS

3.1. GAG levels

Urinary GAG showed a marked reduction already in the beginning of treatment, with treated MPS I mice reaching near normal levels after the second laronidase injection (Figure 1A). At the end of treatment, 6-8 month old ERT-treated mice showed levels significantly lower than untreated 8 month MPS I and equal to that of normal mice (Figure 1B, $p < 0.01$, ANOVA and Tukey).

Eight month-old MPS I mice presented liver, kidney and lung GAG levels approximately 5, 12 and 4 times higher than normal mice, respectively (Figure 1C). ERT started at 6 months significantly reduced storage in these organs, reducing it to normal range ($p < 0.05$ for liver and kidney; $p < 0.001$ for lungs).

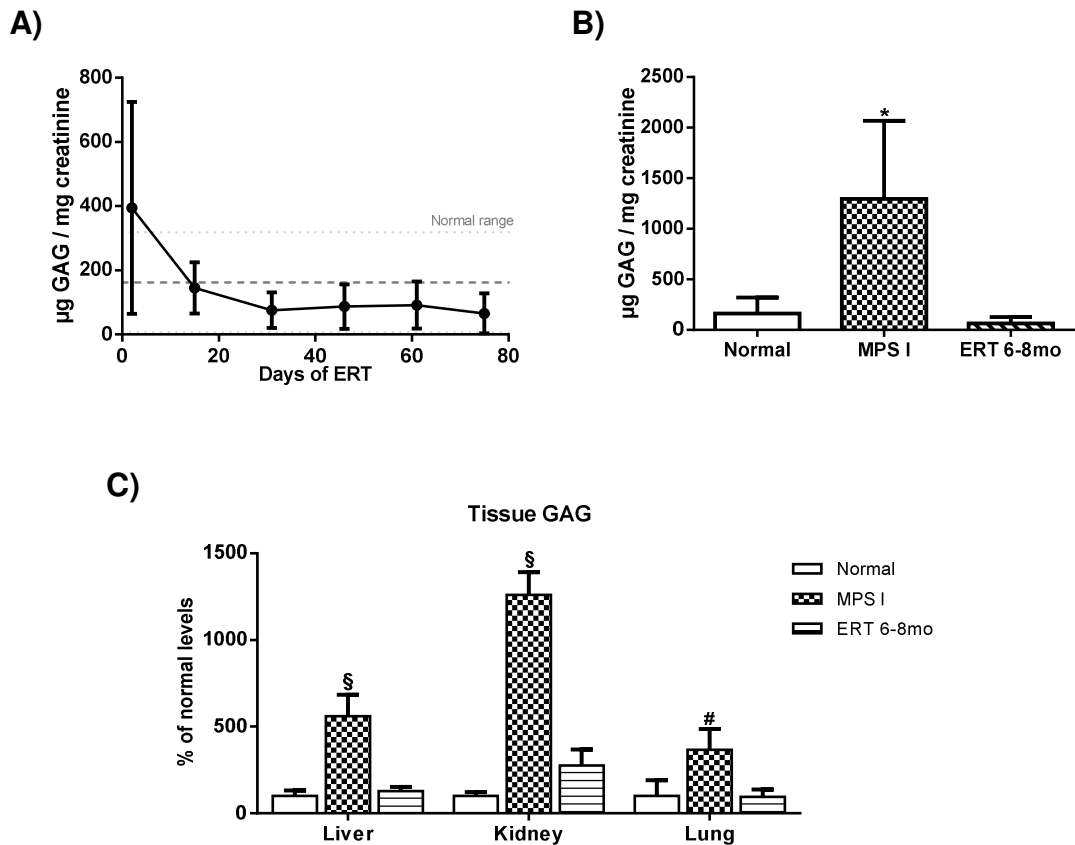


Figure 1: Urinary and tissue GAG levels. A) MPS I mice treated from 6 to 8 months with 1.2mg laronidase/kg every two weeks (n=10). Urine was collected 1 day post injections. Treated mice achieve normal GAG level (dotted lines) as soon as the second injection. B) Comparison between urinary GAG from 8-month old wild-type (normal, n= 4), MPS I (n=3) and treated MPS I mice (ERT 6-8mo, n=10), 1 day after last injection. *p<0.01, ANOVA and Tukey. C) Tissue GAG from 8-month old normal (n=4/5), MPS I (n=5-6) and ERT 6-8mo (n=10) mice collected two weeks after last injection. §p<0.05, Kruskal-Wallis and Tukey *post hoc*. #p<0.001 ANOVA and Tukey *post hoc*.

3.2. Heart function

GAG storage in the hearts of untreated mice was nearly 8 times higher than normal range. Late ERT was able to revert this situation (p<0.001) (Figure 2A), which could lead to a better heart function in treated mice. Echocardiography analysis revealed a significant improvement of LV shortening fraction in the ERT 6-8mo group, when compared to untreated mice (p≤0.001, Figure 2B). Regarding LV Ejection Fraction and the Acceleration and Ejection Ratio at the pulmonary

valve no significant difference was found between treated and untreated animals although a trend towards improvement was seen (Figure 2C and D).

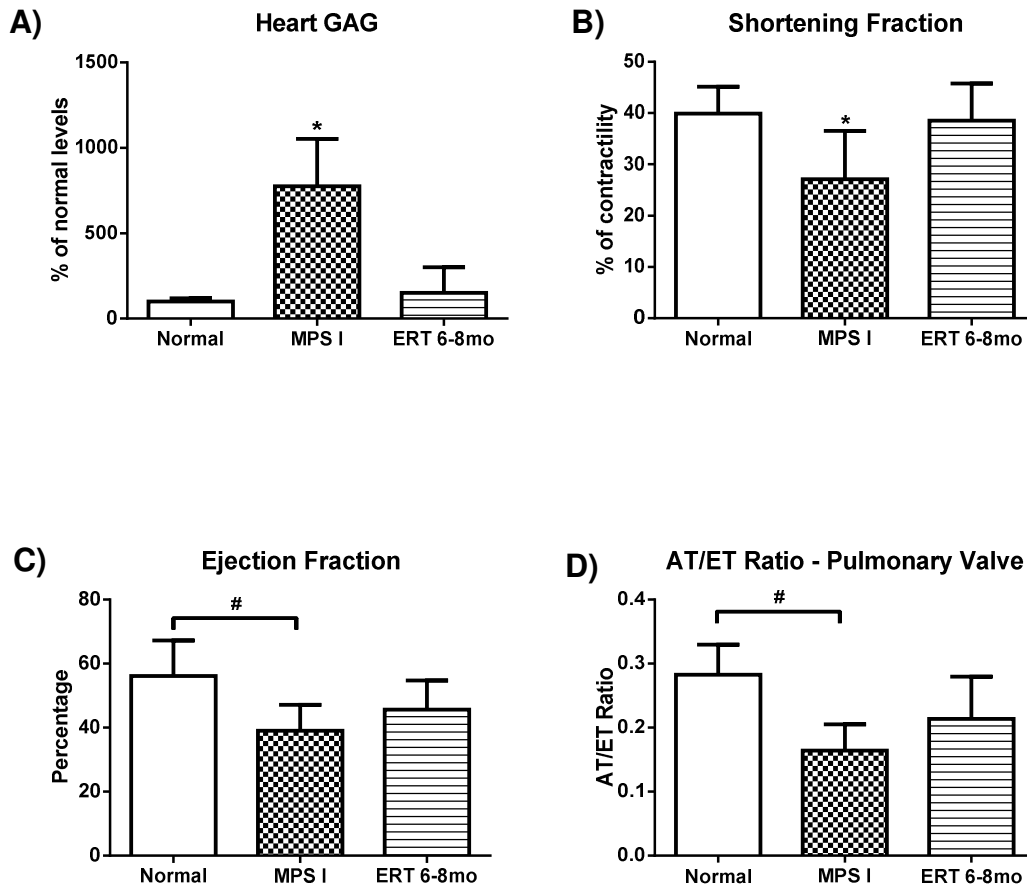


Figure 2: Heart function. A) GAG storage in hearts from 8-month old normal (n=3), MPS I (n=5) and 6 to 8 months laronidase treated MPS I (ERT 6-8mo, n=10), 2 weeks after last injection. B-D: Echocardiography results from 8-month old normal (n=6/8), MPS I (n=6/10) and 6 to 8 months laronidase treated MPS I (ERT 6-8mo, n=10), 1 day after last injection. B) Ejection fraction, C) Shortening fraction D) Ratio between ejection and acceleration times measured at the pulmonary valve. * $p \leq 0.001$, # $p \leq 0.006$ ANOVA and Tukey *post hoc*.

3.3. Heart Valves and Aorta

Laronidase treatment resulted in significant reduction in heart valves thickness when compared to untreated mice: 112.01 ± 34.3 to 61.1 ± 10.8 (mean \pm

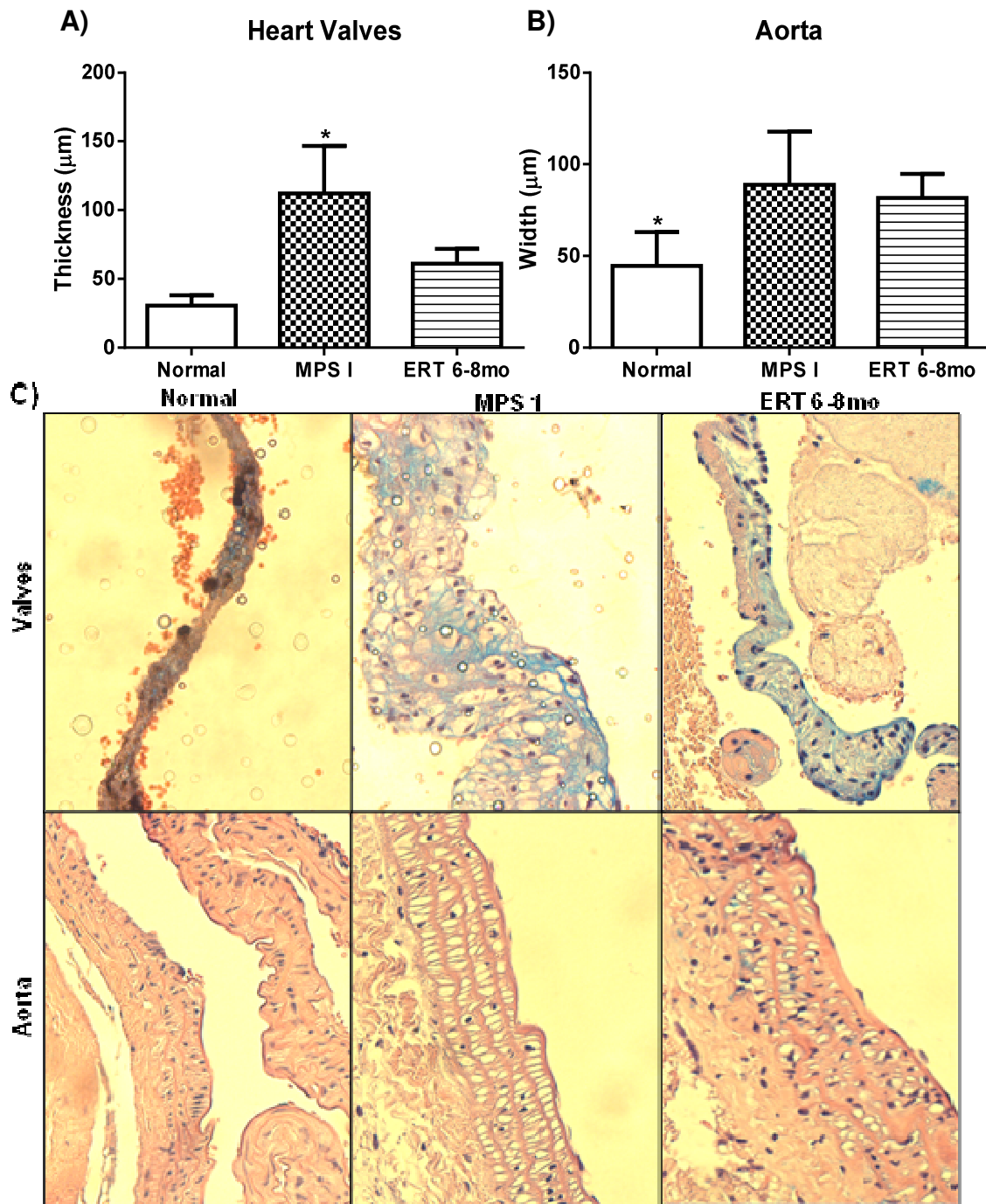


Figure 3: Heart valves and Aorta. A) Heart valve thickness and B) Aortic wall width in 8-month old normal (n=3/4), MPS I (n=3/5) and 6 to 8 months laronidase treated MPS I (ERT 6-8mo, n=5/10), 2 weeks after last injection. * $p \leq 0.03$, ANOVA and Tukey *post hoc*. C) Heart valves and aortas stained with H-E and Alcian Blue. The presence of large vacuoles and intense alcian-blue staining indicating GAG storage are evident in thick MPS I mice valves but are significantly reduced in treated animals. A large amount of vacuoles are also seen in the dilated MPS I and ERT 6-8mo aortas. Original magnification, $\times 400$.

SD, $p \leq 0.03$) (Figure 3A). As also shown in histological sections (Figure 3C), the presence of large vacuoles and intense alcian–blue staining indicating GAG storage were evident in thick MPS I mice valves slides and significantly reduced in treated animals, although some vacuoles could still be observed.

Aortas wall thickness from MPS I mice presented twice the width of normal mice (Figure 3B). ERT started at 6 months was not able to normalize this aspect of the disease. Normal mice aorta width was significantly lower than both treated and untreated animals. Figure 3C, bottom row, shows the large amount of vacuoles that were also seen in the dilated aortas from MPS I and ERT 6-8mo mice.

3.4. Effects on behavioral tests

Late ERT effects on behavioral tests were analyzed by the open field test. Exploratory behavior (number of rearings, Figure 4A) was significantly lower in both treated and untreated mice when compared to normal animals ($p \leq 0.04$). The ERT 6-8mo group presented intermediate values without statistical significance between normal and MPS I mice in all other characteristics analyzed: number of crossings, velocity and distance walked (Figure 4B-D). Interestingly, behavioral tests showed the highest variability among treated animals compared to all other measurements performed in this study.

In order to explain this finding, we measured GAG levels in the cortex and cerebellum from all groups. ERT treatment had only minimal effect on cerebral cortex GAG storage. A near 5-fold increase in GAG storage was found in both MPS I and ERT 6-8mo mice cerebral cortex when compared to normal levels ($p = 0.02$, Figure 5). No differences in GAG storage in the cerebellum were found between groups (data not show).

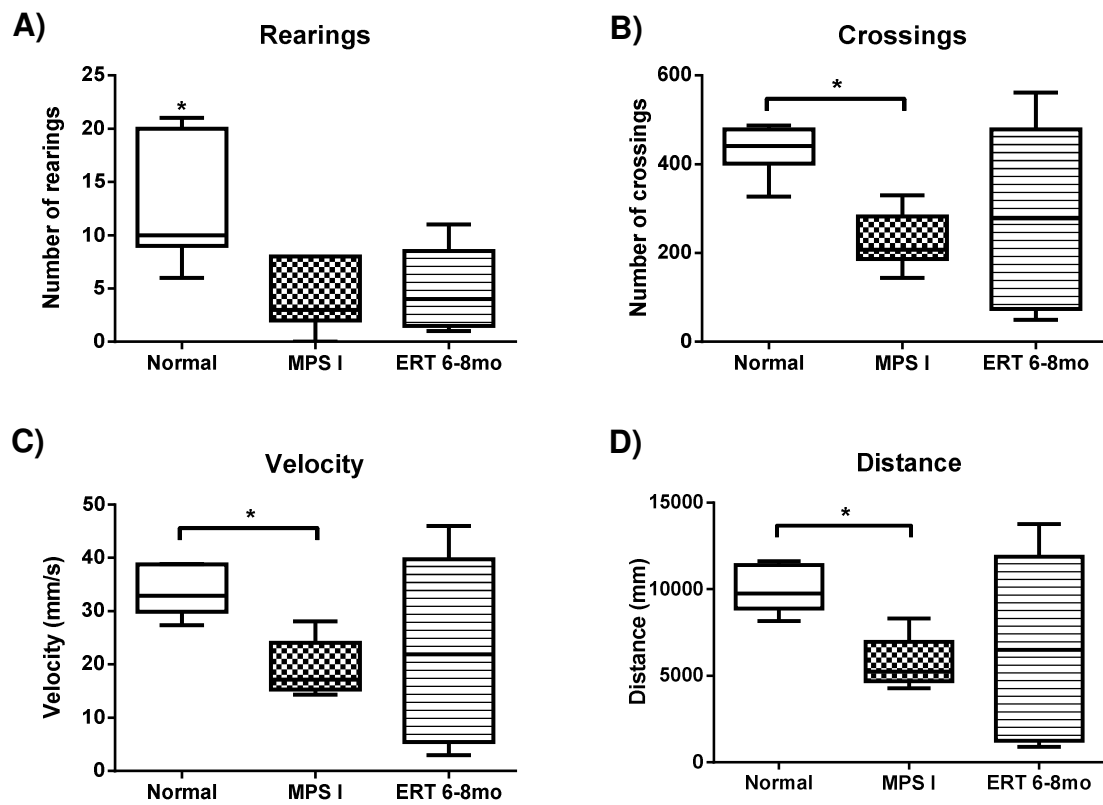


Figure 4: Open field test results from 8-month old normal (n=7), MPS I (n=11) and 6 to 8 months laronidase treated MPS I (ERT 6-8mo, n=10), 2 weeks after last injection. *p≤0.04, ANOVA Tukey *post hoc*.

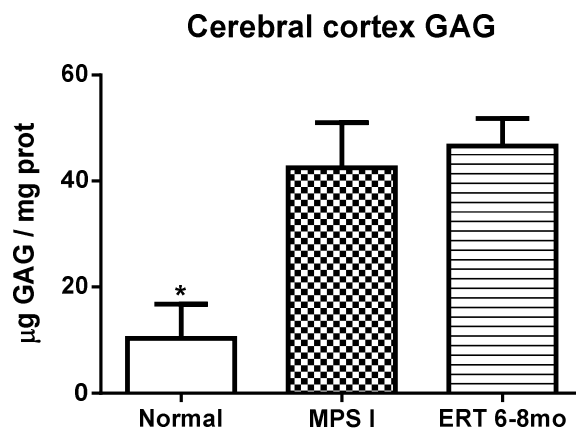


Figure 5: Cerebral cortex GAG levels in 8-month old normal (n=5), MPS I (n=5) and 6 to 8 months laronidase treated MPS I (ERT 6-8mo, n=10), 2 weeks after last injection. *p=0.02, ANOVA and Tukey.

3.5. Cathepsin D activity

Brain GAG storage was not able to explain the large variation found in the ERT 6-8mo group behavior. Therefore, Cathepsin D activity was measured, as it has been shown as a surrogate marker of enzyme deficiency (Ma et al. 2008; Metcalf et al. 2010; Baldo et al. 2011). This enzyme was found to be consistently elevated in the brains of MPS I mice and is a possible biomarker of the disease (Baldo et al, submitted).

MPS I animals presented a Cathepsin D activity 4 times greater than normal mice ($*p<0.001$, Figure 6). Although there was a clear reduction on ERT 6-8mo mice to 1.7-fold normal values, no significant statistical difference was found between normal or MPS I mice.

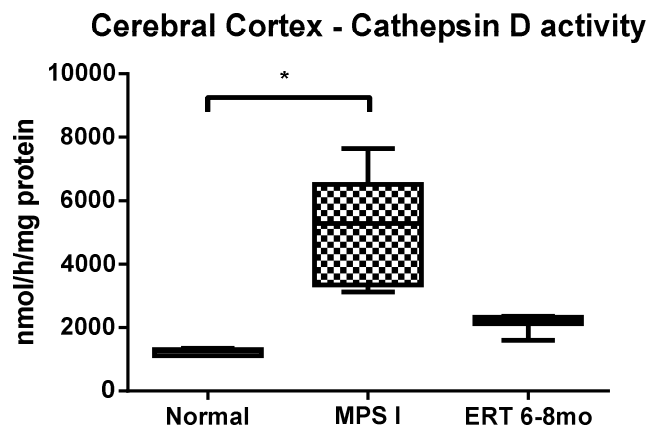


Figure 6: Cathepsin D activity in the cerebral cortex from 8-month old normal (n=5), MPS I (n=5) and 6 to 8 months laronidase treated MPS I (ERT 6-8mo, n=10), 2 weeks after last injection. $*p<0.001$, Kruskal-Wallis and Tukey.

3.6. Antibody formation

Animals who received ERT treatment had significantly higher levels of serum IgG Anti-laronidase antibodies than normal and untreated MPS I controls ($p<0.001$, Figure 7). However, no correlations were found between antibody formation and brain GAG level, behavior tests or cathepsin D activity (data not shown).

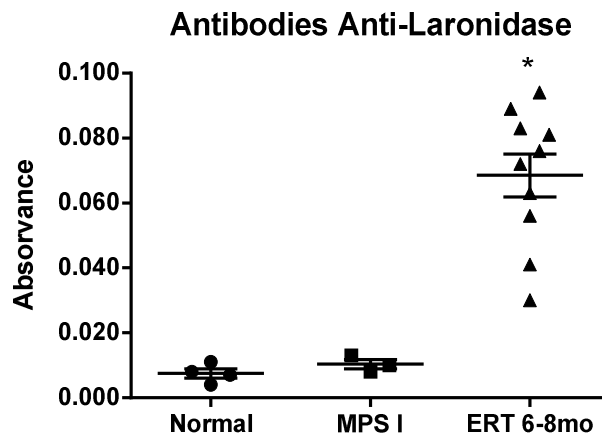


Figure 7: Serum IgG Anti-laronidase antibodies of 8-month old normal (n=4), MPS I (n=3) and 6 to 8 months laronidase treated MPS I (ERT 6-8mo, n=10), 2 weeks after last injection. Each symbol represents one animal. Normal and MPS I serum were diluted 1:50 and ERT, 1:250. * $p < 0,001$, ANOVA and Tukey *post hoc*.

4. DISCUSSION

MPS I is a progressive multisystemic disease and there is a clear consensus in the literature that for both HSCT and ERT, early treatment leads to better outcomes. Nonetheless, data from the MPS I Registry show that Hurler patients from Latin America are diagnosed at a later age than the rest of the world and that there is an average delay of 3.1 years between median age of diagnosis and the median age of first treatment for Hurler patients (Muñoz-Rojas et al. 2011). Consequently most patients are already older than indicated to undergoing HSCT and to achieve maximal benefits from ERT. Even so, ERT has become the most used treatment in Brazil and other Latin American countries (D'Aco et al. 2012). Therefore we analyzed effects of ERT in adult mice MPS mice, when symptoms are well established.

Urinary GAG levels in the ERT 6-8mo group were normalized as soon as the second injection and maintained low levels throughout the treatment. In untreated animals there was an expressive increase in GAG levels when compared to previous reports of 6 months MPS animals (Baldo et al, submitted).

Urinary GAG is thought to reflect primarily storage in renal tubular epithelial cells (Giugliani et al. 2009; de Ru et al. 2012b). Consistently with this observation, kidney storage was higher than previously reported as well (Baldo et al. 2012b). Moreover, late ERT was also able to normalize storage in other visceral organs as liver and lungs.

Cardiac manifestations are common in MPS I patients and worsen with age (Muenzer et al. 2009). Heart GAG level presented an 8-fold increase in MPS mice. It was significantly reduced to normal levels in the ERT 6-8mo group. This reduction was not completely translated into a better heart function. The Left Ventricular Shortening Fraction was normalized. Although there was an improvement in the LV ejection fraction and the pulmonary hypertension, both remained with intermediary levels between normal and untreated mice. All three parameters could be normalized by ERT administered with the same dose and periodicity either in the neo-natal period or from 2 to 6 months of age (Baldo et al, submitted). Therefore, our data suggest that this dose regimen is able to prevent but not to completely reverse heart disease in MPS I. A report from Gabrielli et al. (2010) on two siblings with attenuated MPS I held similar results. The younger brother, treated from 5 months had no cardiac disease before or after 5 year of laronidase treatment. The older sister treatment began at 5 years of age, when she already presented pulmonary hypertension. Five years later, she had only stabilization of heart disease.

The most prominent cardiac manifestation in MPS I is valvular abnormality (Martins et al. 2009). Although usually not fatal, it may contribute to clinical disease (Lyons et al. 2011). Therefore we also evaluated heart valves thickening and aortic wall width. In this study, late ERT had no significant results on aortic width. However, heart valves were significantly smaller in the ERT 6-8mo than in untreated mice. Although they were visually larger than normal mice, no statistical differences were found. Similar results were reported in the canine model. Animals treated weekly with 1.57mg/kg from birth showed valves similar to normal animals and mice treated with 0.58mg/kg still had some residual storage (Dierenfeld et al. 2010). When adult animals were treated, only the ones with

induced immune-tolerance to IDUA had improvement in the valves (Dickson et al. 2008). In our data, no correlation between immune status and valve thickening was found (data not shown). In addition, studies in humans showed that ERT has no or only minor effects in aortic width and valve thickness once it is established (Braunlin et al. 2006; Sifuentes et al. 2007; Wraith et al. 2007; Clarke et al. 2009; Harada et al. 2011; Brands et al. 2012). HSCT also has no effect on cardiac valvular thickening progress in some patients (Braunlin et al. 2003).

In the usual dose, the infused enzyme is not expected to cross the blood brain barrier at therapeutic levels (Giugliani et al. 2010), which is the reason why ERT isn't indicated for neurological manifestations of Hurler patients. Therefore, data on cognitive analysis from Hurler patients after ERT is very scarce. Wraith et al. (2007) reported that Hurler patients treated from less than 2.5 years of age showed mental development similar to normal children, whereas older patients showed no improvement. Tokic et al. (2007) reported that two patients had no improvement in mental state but positive changes were observed in humor and behavior. Similar results are found with HSCT, as cerebral damage present before transplantation seems to be irreversible (Boelens et al. 2010)

A study with the murine metachromatic leukodystrophy model evaluated ERT effects on presymptomatic, early and progressed stages of the disease (Matthes et al. 2012). ERT efficacy was shown to be age-related, with improvement in behavioral alterations seen only with early treatment. Although no statistical analysis was performed between treated groups and normal controls, presented data indicates that there was improvement in comparison with mock-treated groups, treated groups didn't reach normal levels. Previous data from our group suggest that early administration of ERT seems effective in preventing or normalizing brain disease in MPS I mice (Baldo et al, submitted). The animals treated in the present study were adults with well-established cognitive impairment. Therefore no positive behavioral change was expected but still the high heterogeneity found in behavior tests was remarkable. No reduction was observed in cerebral cortex GAG of treated animals, regardless of behavior test results. Cathepsin D, possibly a more accurate biomarker, also did not reflect

behavior heterogeneity, since treated animals had intermediary values between normal and untreated mice. Behavioral results were also unrelated to heart function or urinary GAG levels (data not shown).

Antibody formation against the enzyme was also investigated as a possible explanation for the behavior results. Almost all patients on clinical trials produce IgG antibodies against laronidase, particularly in the first weeks of treatment (Wraith et al. 2004; Sifuentes et al. 2007; Clarke et al. 2009; Giugliani et al. 2009; Valayannopoulos and Wijburg 2011). An inverse correlation was found between antibody titer and urinary GAG reduction, however no significant correlation was established with clinical efficacy (Wraith et al. 2007; Clarke et al. 2009; Giugliani et al. 2009). Reports from animal models, on the other hand support the idea that antibodies titer decrease the effectiveness of treatment. A study by Dickson et al. (2008) in the canine model showed that immune-tolerized dogs achieved increased tissue enzyme levels in most non reticular tissues and a greater reduction in tissue GAG levels, lysosomal pathology, and urinary GAG excretion when compared to non-tolerized animals. A previous report by our group showed that mice which developed antibodies performed significantly worse in the open field habituation test (Baldo et al., submitted). However, data presented in this study is not consistent with this hypothesis. Although all treated animals developed antibodies against laronidase, no significant correlations were found between antibody titer and GAG level, behavior tests or cathepsin D activity (data not shown).

Finally, our results suggest that late treatment by ERT is effective in reducing urinary GAG and storage in visceral organs. Although heart GAG levels were also normalized and valve thickness was greatly reduced, heart function was not fully restored and there was no effect in aortic wall width. However, since cardio-respiratory complications are the main cause of death in Hurler patients, the improvements seen in this study could have important repercussions on patients' quality of life. Moreover, a high variability which couldn't be explained by GAG cortex levels, cathepsin D, heart function or antibody levels was found in the behavior of treated animals and needs to be further studied. In conclusion, the use

of late ERT can have beneficial effects on many aspects of the disease and should be considered whenever possible.

REFERENCES

Baldo G, Mayer FQ, Martinelli B, Dilda A, Meyer F, Ponder KP, Giugliani R, Matte U (2012a) Evidence of a progressive motor dysfunction in Mucopolysaccharidosis type I mice. *Behavioural Brain Research* 233:169–175

Baldo G, Mayer FQ, Martinelli B, Meyer FS, Burin M, Meurer L, Tavares AMV, Giugliani R, Matte U (2012b) Intraperitoneal implant of recombinant encapsulated cells overexpressing alpha-L-iduronidase partially corrects visceral pathology in mucopolysaccharidosis type I mice. *Cytotherapy* 14:860–867

Baldo G, Quoos Mayer F, Burin M, Carrillo-Farga J, Matte U, Giugliani R (2012c) Recombinant encapsulated cells overexpressing alpha-L-iduronidase correct enzyme deficiency in human mucopolysaccharidosis type I cells. *Cells, Tissues, Organs* 195:323–329

Baldo G, Wu S, Howe RA, 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. *Molecular Genetics and Metabolism* 104:608–619

Boelens JJ, Prasad VK, Tolar J, Wynn RF, Peters C (2010) Current international perspectives on hematopoietic stem cell transplantation for inherited metabolic disorders. *Pediatric Clinics of North America* 57:123–145

Brands MMMG, Frohn-Mulder IM, Hagemans MLC, Hop WCJ, Oussoren E, Helbing W a, Van der Ploeg AT (2012) Mucopolysaccharidosis: Cardiologic features and effects of enzyme-replacement therapy in 24 children with MPS I, II and VI. *Journal of Inherited Metabolic Disease* doi:10.1007/s10545-011-9444-z

Braunlin EA, Berry JM, Whitley CB (2006) Cardiac findings after enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis type I. *The American Journal of Cardiology* 98:416–418

Braunlin EA, Stauffer NR, Peters CH, Bass JL, Berry JM, Hopwood JJ, Krivit W (2003) Usefulness of bone marrow transplantation in the Hurler syndrome. *The American Journal of Cardiology* 92:882–886

Clarke LA, Wraith JE, Beck M, Kolodny EH, Pastores GM, Muenzer J, Rapoport DM, Berger KI, Sidman M, Kakkis ED, et al. (2009) Long-term efficacy and safety of laronidase in the treatment of mucopolysaccharidosis I. *Pediatrics* 123:229–240

D'Aco K, Underhill L, Rangachari L, Arn P, Cox GF, Giugliani R, Okuyama T, Wijburg F, Kaplan P (2012) Diagnosis and treatment trends in mucopolysaccharidosis I: findings from the MPS I Registry. *European Journal of Pediatrics* 171:911–919

Dickson P, Peinovich M, McEntee M, Lester T, Le S, Krieger A, Manuel H, Jabagat C, Passage M, Kakkis ED (2008) Immune tolerance improves the efficacy of enzyme replacement therapy in canine mucopolysaccharidosis I. 118:

Dierenfeld AD, McEntee MF, Vogler C a, Vite CH, Chen AH, Passage M, Le S, Shah S, Jens JK, Snella EM, et al. (2010) Replacing the enzyme alpha-L-iduronidase at birth ameliorates symptoms in the brain and periphery of dogs with mucopolysaccharidosis type I. *Science Translational Medicine* 2:60ra89

Gabrielli O, Clarke L a, Bruni S, Coppa G V (2010) Enzyme-replacement therapy in a 5-month-old boy with attenuated presymptomatic MPS I: 5-year follow-up. *Pediatrics* 125:e183–7

Giugliani R (2012) Newborn screening for lysosomal diseases: current status and potential interface with population medical genetics in Latin America. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 35:871–877

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. *Genetics and Molecular Biology* 33:589–604

Giugliani R, Rojas VM, Martins AM, Valadares ER, Clarke JTR, Góes JEC, Kakkis ED, Worden MA, Sidman M, Cox GF (2009) A dose-optimization trial of laronidase (Aldurazyme) in patients with mucopolysaccharidosis I. *Molecular Genetics and Metabolism* 96:13–19

Harada H, Uchiwa H, Nakamura M, Ohno S, Morita H, Katoh A, Yoshino M, Ikeda H (2011) Laronidase replacement therapy improves myocardial function in mucopolysaccharidosis I. *Molecular Genetics and Metabolism* 103:215–219

Jones JE, Mendes L, Rudd MA, Russo G, Loscalzo J, Zhang Y-Y (2002) Serial noninvasive assessment of progressive pulmonary hypertension in a rat model. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 283:H364–71

Kakkis ED, Muenzer J, Tiller GE, Waber L, Belmont J, Passage M, Izykowski B, Phillips J, Doroshov R, Walot I, et al. (2001) Enzyme-replacement therapy in mucopolysaccharidosis I. *The New England Journal of Medicine* 344:182–188

Lyons J a, Dickson PI, Wall JS, Passage MB, Ellinwood NM, Kakkis ED, McEntee MF (2011) Arterial pathology in canine mucopolysaccharidosis-I and response to therapy. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 91:665–674

Ma X, Tittiger M, Knutsen RH, Kovacs A, Schaller L, Mecham RP, Ponder KP (2008) Upregulation of elastase proteins results in aortic dilatation in mucopolysaccharidosis I mice. *Molecular Genetics and Metabolism* 94:298–304

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. *The Journal of Pediatrics* 155:S32–46

Matthes F, Stroobants S, Gerlach D, Wohlenberg C, Wessig C, Fogh J, Gieselmann V, Eckhardt M, D’Hooge R, Matzner U (2012) Efficacy of enzyme replacement therapy in an aggravated mouse model of metachromatic leukodystrophy declines with age. *Human Molecular Genetics* 21:2599–2609

Metcalf J a, Linders B, Wu S, Bigg P, O’Donnell P, Sleeper MM, Whyte MP, Haskins M, Ponder KP (2010) Upregulation of elastase activity in aorta in mucopolysaccharidosis I and VII dogs may be due to increased cytokine expression. *Molecular Genetics and Metabolism* 99:396–407

Muenzer J (2011) Overview of the mucopolysaccharidoses. *Rheumatology (Oxford, England)* 50 Suppl 5:v4–12

Muenzer J, Wraith JE, Clarke L a (2009) Mucopolysaccharidosis I: management and treatment guidelines. *Pediatrics* 123:19–29

Muñoz-Rojas MV, Bay L, Sanchez L, Van Kuijck M, Ospina S, Cabello JF, Martins AM (2011) Clinical manifestations and treatment of mucopolysaccharidosis type I patients in Latin America as compared with the rest of the world. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 34:1029–1037

Neufeld EF, Muenzer J (2001) The Mucopolysaccharidoses. In *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, C. Scriver, A. Beaudet, W. Sly, and D. Vaele, eds. (New York: Mc Graw-Hill), pp.3421–3452

Ohmi K, Greenberg DS, Rajavel KS, Ryazantsev S, Li HH, Neufeld EF (2003) Activated microglia in cortex of mouse models of mucopolysaccharidoses I and IIIB. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:1902–1907

De Ru MH, Boelens JJ, Das AM, Jones S a, Van der Lee JH, Mahlaoui N, Mengel E, Offringa M, O’Meara A, Parini R, et al. (2011) Enzyme replacement therapy and/or hematopoietic stem cell transplantation at diagnosis in patients with mucopolysaccharidosis type I: results of a European consensus procedure. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 6:55

De Ru MH, Teunissen QG, Van der Lee JH, Beck M, Bodamer O a, Clarke L a, Hollak CE, Lin S-P, Rojas M-VM, Pastores GM, et al. (2012a) Capturing phenotypic heterogeneity in MPS I: results of an international consensus procedure. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 7:22

De Ru MH, Van der Tol L, Van Vlies N, Bigger BW, Hollak CEM, Ijlst L, Kulik W, Van Lenthe H, Saif M a, Wagemans T, et al. (2012b) Plasma and urinary levels of dermatan sulfate and heparan sulfate derived disaccharides after long-term

enzyme replacement therapy (ERT) in MPS I: correlation with the timing of ERT and with total urinary excretion of glycosaminoglycans. *Journal of Inherited Metabolic Disease* doi:10.1007/s10545-012-9538-2

Sifuentes M, Doroshov R, Hoft R, Mason G, Walot I, Diamant 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. *Molecular Genetics and Metabolism* 90:171–180

Tokic V, Barisic I, Huzjak N, Petkovic G, Fumic K, Paschke E (2007) Enzyme replacement therapy in two patients with an advanced severe (Hurler) phenotype of mucopolysaccharidosis I. *European Journal of Pediatrics* 166:727–732

Valayannopoulos V, Wijburg F a (2011) Therapy for the mucopolysaccharidoses. *Rheumatology (Oxford, England)* 50 Suppl 5:v49–59

Wolf D a, Lenander a W, Nan Z, Braunlin E a, Podetz-Pedersen KM, Whitley CB, Gupta P, Low WC, Mclvor RS (2012) Increased longevity and metabolic correction following syngeneic BMT in a murine model of mucopolysaccharidosis type I. *Bone Marrow Transplantation* 47:1235–1240

Wraith JE, Beck M, Lane R, Van der Ploeg A, Shapiro E, Xue Y, Kakkis ED, Guffon N (2007) Enzyme replacement therapy in patients who have mucopolysaccharidosis I and are younger than 5 years: results of a multinational study of recombinant human alpha-L-iduronidase (laronidase). *Pediatrics* 120:e37–46

Wraith JE, Clarke L a, Beck M, Kolodny EH, Pastores GM, Muenzer J, Rapoport DM, Berger KI, Swiedler SJ, Kakkis ED, et al. (2004) Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis I: a randomized, double-blinded, placebo-controlled, multinational study of recombinant human alpha-L-iduronidase (laronidase). *The Journal of Pediatrics* 144:581–588

DISCUSSÃO

Dados do *MPS I Registry* (Registro de MPS I) mostram que o Brasil é o 3º país com o maior número de inscritos do mundo, representando quase 10% do total (D'Aco *et al.*, 2012). Cerca de 25% dos pacientes brasileiros apresentam a forma Hurler, o que está abaixo da média da América Latina (31%) e da média mundial (62%) (Muñoz-Rojas *et al.*, 2011). Além da idade de diagnóstico dos pacientes com Hurler ser maior na América Latina do que no resto do mundo, existe um lapso de cerca 3,1 anos entre a idade média de diagnóstico e o início do tratamento (Muñoz-Rojas *et al.*, 2011). Estes dados, aliados com a dificuldade de encontrar doadores compatíveis rapidamente, são motivos pelos quais o TCTH para MPS I é pouco realizado no Brasil e na América Latina em geral. É importante ressaltar que apenas quando feito antes dos 2 – 2,5 anos de idade, antes do início do declínio cognitivo, o TCTH pode preservar o desenvolvimento intelectual (Muenzer, Wraith and Clarke, 2009; Muenzer, 2011; Ru, de *et al.*, 2011). Dessa forma, no momento em que os pacientes com Hurler são diagnosticados, a maioria deles já passou da idade indicada para se beneficiar o máximo possível com o transplante (Muñoz-Rojas *et al.*, 2011). A discrepância entre a tendência mundial de submeter os pacientes com Hurler ao TCTH e a prática latina fica mais evidente no fato de que dos 83% dos pacientes latinos que recebem tratamento específico para a MPS I, todos são tratados com TRE.

Existem evidências na literatura de que o quanto antes o tratamento for iniciado, melhor será a o prognóstico do paciente devido à natureza irreversível de algumas anormalidades associadas a MPS I (McGill *et al.*, 2010; Muenzer, 2011; Schulze-Frenking *et al.*, 2011). Porém, como citado acima, esta não é a realidade dos pacientes brasileiros e torna-se necessário determinar a efetividade da TRE iniciada após o estabelecimento completo dos sintomas. Dessa forma, neste estudo foram avaliados os efeitos da TRE com início tardio sobre a reversibilidade dos sintomas no modelo murino de Mucopolissacaridose do tipo I.

Camundongos MPS I com seis meses (ERT 6-8mo) foram tratados com laronidase injetada pela veia da cauda durante dois meses e comparados com

controles normais (Normal) e MPS I não tratados (MPS I) (Figura 2 e 3). O acúmulo de GAGs nos tecidos e sua eliminação na urina começam muito cedo, mas aos seis meses diversos sintomas, como deficiências cardíacas, alterações articulares e cognitivas estão bem estabelecidas (Baldo, 2012). Inicialmente, 13 animais foram selecionados para tratamento. Entretanto, cerca de 1 mês após o início, 3 animais apresentaram várias lesões de pele, semelhantes à sarna que progrediram muito rapidamente. Houve um intervalo de 1 semana entre o aparecimento das lesões no primeiro animal e nos outros dois, que estavam alojados na mesma caixa. É possível que tenha ocorrido contaminação cruzada do primeiro animal para os demais, através do contêntor usado para a injeção. Estas mesmas lesões não foram encontradas em outros animais da colônia durante o período de tratamento. Portanto, não é possível excluir que fossem reações ao tratamento com laronidase. A causa específica das lesões não foi identificada e os animais afetados foram retirados do experimento e sacrificados. Nenhuma outra reação adversa intensa ao tratamento foi identificada.



Figura 2: Camundongos da colônia MPS I aos 6 meses de idade. MPS I não tratado (acima) e normal. O aumento do tamanho corporal, focinho infiltrado e alterações de pelagem são características evidentes nos animais doentes.

Entre os principais benefícios da TRE relatados, independente da forma clínica do paciente, estão a redução da excreção de GAGs urinários e da

hepatomegalia. Assim como esperado, a administração da TRE tardia foi efetiva na redução de GAGs urinários e viscerais (fígado, pulmão, rim e coração). O nível de GAGs urinários no grupo tratado foi normalizado já na segunda injeção de laronidase e se manteve baixo durante o tratamento. Nos animais não tratados, foi verificado um aumento expressivo da excreção de GAGs quando comparado com relatos anteriores de animais MPS de 8 meses (Baldo, 2012). Acredita-se que os GAGs urinários reflitam principalmente o acúmulo dessas substâncias no epitélio tubular renal e não o acúmulo do corpo todo (Giugliani *et al.*, 2009; Ru, de *et al.*, 2012). De forma coerente, os níveis de acúmulo no rim também se mostraram elevados nos animais não tratados. Os depósitos de GAGs nos demais órgãos periféricos analisados (fígado, pulmão e coração) também foram normalizados.

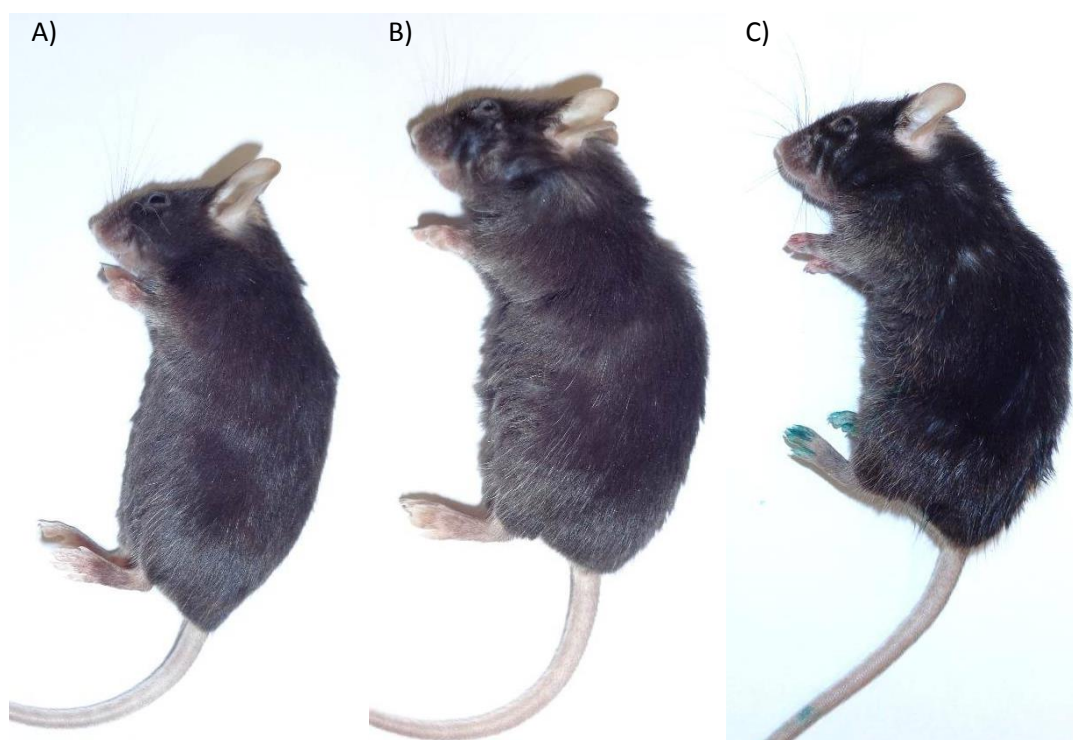


Figura 3: Camundongos da colônia MPS I aos 8 meses de idade. A: normal, B: MPS I não tratado e C: MPS I tratado com TRE dos 6 aos 8 meses.

Manifestações cardíacas são muito comuns em pacientes com MPS I, ocorrendo em 70% a 80% dos casos. Elas tendem a piorar com a idade e são a

causa de morte de cerca de 50% dos pacientes com Hurler (Martins *et al.*, 2009; Muenzer, Wraith and Clarke, 2009). A introdução da TRE tardia teve resultados positivos nas manifestações cardíacas; no entanto, não foi suficiente para reverter completamente a doença cardíaca dos animais tratados. Apesar da normalização dos GAGs do miocárdio e da fração de encurtamento, a fração de ejeção ventricular esquerda e razão entre aceleração e ejeção na artéria pulmonar atingiram apenas níveis intermediários entre animais normais e não tratados. Todos esses parâmetros se mostraram normalizados com a administração da TRE na mesma dose e periodicidade iniciada no período neonatal ou dos 2 até os 6 meses de idade (Baldo, 2012). Tanto a fração de encurtamento quanto a fração de ejeção e o fluxo na artéria pulmonar apresentam alteração significativas a partir dos 6 meses de idade neste modelo animal (Baldo, 2012). Portanto, nossos dados sugerem que a dose de 1,2mg/kg a cada duas semanas pode prevenir mas não reverter completamente a doença cardíaca na MPS I. Um estudo publicado por Gabrielli e colaboradores (2010) relatou o caso de dois irmãos com MPS I atenuada que obteve resultados similares. O irmão mais novo, tratado desde os 5 meses de idade não apresentava doença cardíaca nem antes nem depois de 5 anos de TRE com laronidase. A irmã mais velha começou o tratamento aos 5 anos de idade, quando já apresentava hipertensão pulmonar. Após 5 anos ela apresentava apenas estabilização, mas nenhuma melhora da doença cardíaca.

Dentre as manifestações cardíacas da MPS I, as mais proeminentes são anormalidades valvulares (Martins *et al.*, 2009). Dados do *MPS I Registry* sobre sintomas de pacientes com Hurler indicam uma frequência 35% de anormalidades valvulares na América Latina e de 73% no resto do mundo (Muñoz-Rojas *et al.*, 2011). Apesar de geralmente não serem fatais, podem contribuir para a doença clínica (Lyons *et al.*, 2011) e são de difícil correção. O modelo murino utilizado apresenta grande dilatação da aorta ascendente com perda de elasticidade causada pela metaloproteinase de matriz 12 e/ou catepsina S (Ma *et al.*, 2008; Metcalf *et al.*, 2010). A dilatação da aorta ascendente com perda de elasticidade já foi relatada em pacientes com Scheie (Nemes *et al.*, 2008). Dessa forma, a espessura das válvulas e a largura da parede da aorta também foram avaliadas. Quando iniciada no período neonatal, a TRE reduz significativamente os dois

parâmetros. Se iniciada aos 2 meses de idade, resulta em valores intermediários entre normais e não tratados (Baldo, 2012). Neste estudo, a TRE tardia não teve nenhum efeito sobre a largura das paredes da aorta. Entretanto, as válvulas cardíacas foram significativamente menores no grupo tratado quando comparado ao não tratado. Apesar de serem maiores que as de animais normais, nenhuma diferença estatística foi encontrada entre esses grupos. Resultados similares, mas que evidenciam os benefícios de uma maior dosagem, foram relatados no modelo canino de MPS. Animais tratados semanalmente desde o nascimento com 1,57 mg de laronidase/kg apresentaram válvulas cardíacas similares aos animais normais e os tratados com 0,58mg/kg ainda apresentaram acúmulo residual (Dierenfeld *et al.*, 2010). O regime de tratamento utilizado neste trabalho (1,2mg/kg a cada duas semanas) foi relatado por Giugliani e colaboradores (2009) como uma alternativa viável e mais cômoda do que regime padrão de 0,58 mg/ kg /semana para pacientes com dificuldades de receber infusões semanais. No modelo murino, injeções semanais lesionam as caudas dos camundongos, dificultando o tratamento. Além disso, este mesmo regime já foi utilizado anteriormente pelo nosso grupo e se mostrou eficaz em diversos sintomas da doença, especialmente quando administrado no período neonatal (Baldo, 2012).

Ainda no modelo canino, quando animais adultos foram tratados, apenas os que tiveram tolerância imune induzida à IDUA apresentaram melhorias nas válvulas (Dickson *et al.*, 2008). Estudos em humanos mostram que a TRE tem pouco ou nenhum efeito sobre o espessamento das válvulas e aorta depois de estabelecidos (Brands *et al.*, 2012; Braunlin, Berry and Whitley, 2006; Clarke *et al.*, 2009; Harada *et al.*, 2011; Sifuentes *et al.*, 2007; Wraith *et al.*, 2007). Além disso, Brands e colaboradores (2012) relataram a presença de anormalidades nas válvulas de 24 pacientes com MPS I, II ou VI a partir dos 3 meses de idade. Todos os dados acima evidenciam a necessidade da administração precoce da TRE para correção do defeito valvular, possivelmente devido à baixa vascularização dessas estruturas, que limita sua resposta ao tratamento após o estabelecimento da lesão.

Na dose usual, não se espera que a enzima injetada atravesse a barreira hematoencefálica em níveis terapêuticos (Giugliani *et al.*, 2010), razão pela qual a TRE não é indicada para as manifestações neurológicas dos pacientes com Hurler. Dessa forma, dados sobre análise cognitiva desses pacientes após o tratamento são escassos. Wraith e colaboradores (2007) relataram que pacientes com Hurler com menos de 2 anos e meio de idade apresentaram desenvolvimento mental similar ao de crianças normais, enquanto que os pacientes mais velhos não apresentaram melhora. Tokic e colaboradores (2007) relataram o caso de dois pacientes de 7 e 8 anos de idade tratados com laronidase que também não apresentaram melhora no estado mental, mas que tiveram mudanças positivas no humor e no comportamento. Os autores, entretanto, atribuem essas mudanças a melhor oxigenação e diminuição de distúrbios do sono, sendo assim resultados indiretos da TRE.

Um estudo publicado com o modelo murino de leucodistrofia metacromática (Matthes *et al.*, 2012) avaliou os efeitos da TRE administrada nos períodos pré-sintomático, inicial e tardio da doença. Os autores relataram que eficácia da TRE foi dependente de idade, com melhora em alterações comportamentais vista apenas no grupo pré-sintomático. Não foi feita nenhuma análise estatística entre os grupos tratados e os controles normais neste estudo. Entretanto, os dados apresentados indicam que apesar da redução em comparação com os grupos tratados apenas com veículo, não houve normalização em nenhum grupo tratado. A administração precoce da TRE já se mostrou efetiva na normalização da doença cerebral em camundongos MPS I (Baldo, 2012). Os animais tratados no presente estudo eram adultos com comprometimento cognitivo bem estabelecido. Portanto, nenhuma alteração comportamental positiva era esperada, de forma que a grande heterogeneidade comportamental encontrada é notável.

Uma análise detalhada dos dados comportamentais revelou que o grupo tratado poderia ser dividido em 2 grupos: TRE A e TRE B. O grupo TRE A foi formado por 4 animais com melhora comportamental marcante (resultados individuais acima da média em todos os testes) e o TRE B, pelos 6 animais

restantes que não apresentaram praticamente nenhuma alteração em comparação com o grupo MPS I. Essa subdivisão teve efeitos mínimos nos resultados de comportamento exploratório (*rearings*, figura 4A), para os quais TRE A apresentou valores intermediários entre animais normais e MPS I/TRE B, sem significância estatística. Entretanto, uma diferença significativa ($p \leq 0.008$) entre normais/TRE A e MPS I/TRE B no número de *crossings*, velocidade e distância caminhada (Figura 4B-D) pode ser observada. Isso significa que, pelo menos para um grupo de animais, a TRE teve um efeito positivo nos testes comportamentais.

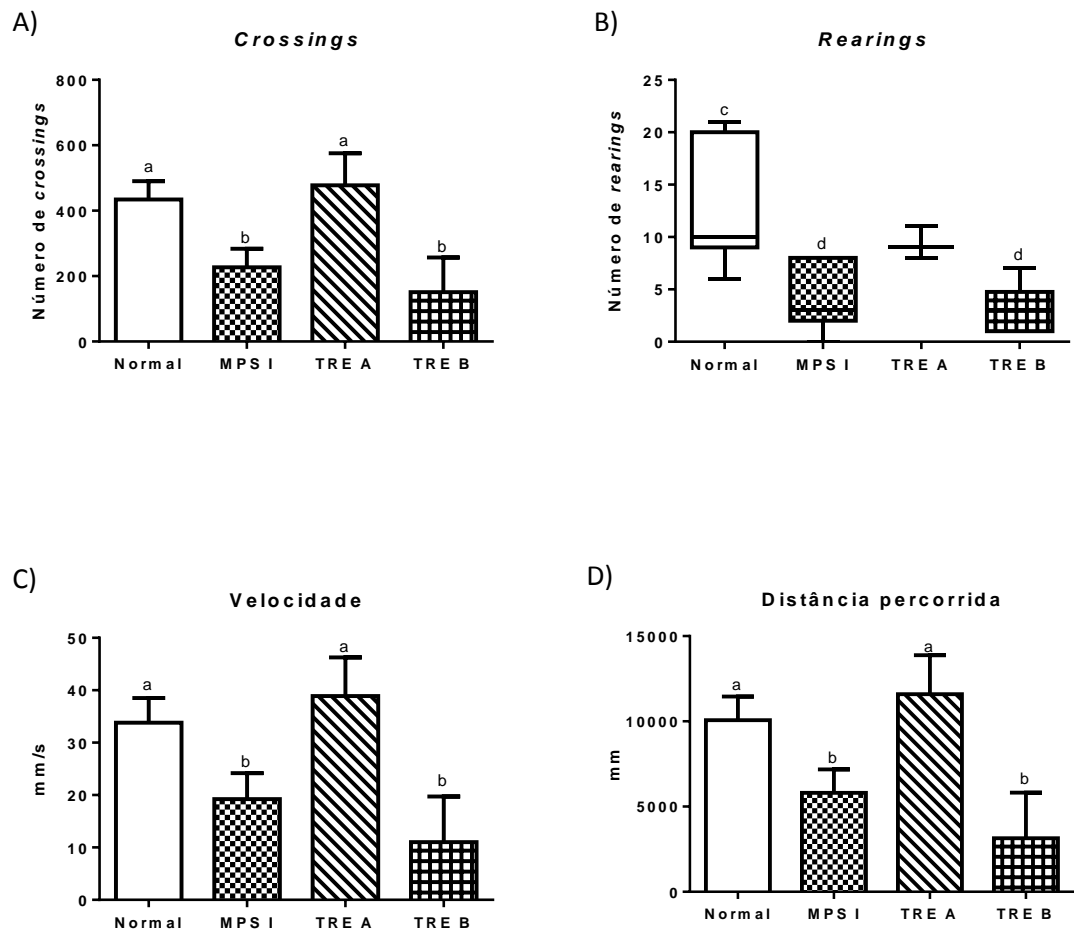


Figura 4: Resultados do teste de campo aberto de camundongos de 8 meses normais (n=7), MPS I (n=11) e tratados com laronidase dos 6 aos 8 meses. Devido a grande variação, os animais tratados foram divididos em 2 grupos: TRE A (n=4, animais com resultados acima da média do grupo tratado em todos os testes), e TRE B (n=6, demais animais do grupo tratado). “a” vs “b” $p \leq 0.001$, Kruskal-Wallis com Tukey *post hoc*, “c” vs “d” $p \leq 0.008$, ANOVA Tukey com *post hoc*.

No entanto, esta variabilidade não se refletiu nem no conteúdo de GAGs, , nem na atividade de catepsina D do córtex cerebral. É interessante ressaltar que os níveis de GAGs são normalizados com TRE precoce (Baldo, 2012). Estudos anteriores mostram níveis elevados de catepsina D no hipocampo de camundongos MPS I de 8 meses e similares a animais normais no córtex de camundongos tratados com TRE neonatal e adulta, onde eram levemente maiores (Baldo, 2012). No presente estudo, a catepsina D, apresentou níveis intermediários nos animais tratados. Esta enzima é uma protease aspártica lisossomal que pode ativar outras catepsinas e tem um baixo pH ótimo (Metcalf *et al.*, 2010).

A formação de anticorpos contra a enzima também foi analisada como uma possível explicação para os resultados comportamentais. Praticamente todos os pacientes de ensaios clínicos produzem anticorpos IgG contra a laronidase. Eles estão presentes em, especialmente no início do tratamento (Clarke *et al.*, 2009; Giugliani *et al.*, 2009; Sifuentes *et al.*, 2007; Valayannopoulos and Wijburg, 2011; Wraith *et al.*, 2004). Uma correlação inversa entre o título de anticorpos e a redução de GAGs urinários foi descrita (Clarke *et al.*, 2009; Giugliani *et al.*, 2009; Wraith *et al.*, 2007). Entretanto, nenhuma correlação significativa foi estabelecida com a eficácia clínica. Por outro lado, dados de modelos animais apoiam a hipótese que anticorpos podem diminuir a eficácia do tratamento. Um estudo de Dickson e colaboradores (2008) com o modelo canino mostrou que quando comparados a animais sem tolerância imune para laronidase, os cachorros que tinham tolerância atingiram níveis enzimáticos superiores na maioria dos órgãos não reticulares e uma maior redução de GAGs teciduais, patologia lisossômica e excreção de GAGs urinários. Um relato anterior do nosso grupo demonstrou que camundongos que desenvolveram anticorpos exibiram um desempenho significativamente pior no teste de habituação ao campo aberto, sugerindo que os anticorpos estivessem reduzindo a biodisponibilidade da enzima (Baldo, 2012). Os dados apresentados neste estudo não são consistentes com essa hipótese. Apesar de todos os animais tratados desenvolverem anticorpos contra laronidase, nenhuma correlação significativa foi estabelecida com os níveis de GAGs, função cardíaca, testes comportamentais ou atividade de catepsina D.

É importante ressaltar que apesar de os camundongos utilizados serem animais isogênicos mantidos em condições controladas, existem variações inerentes a cada animal que levam a variações de resposta ao tratamento. Um estudo de Piller Puicher e colaboradores (2012) também no modelo murino de MPS I, por exemplo, relatou uma resposta excepcionalmente variável ao tratamento com mioblastos microencapsulados. Dentre os 12 animais tratados, 2 foram considerados “curados” por apresentarem normalização do acúmulo de GAGs viscerais e urinários e aumento dos níveis plasmáticos de IDUA. Os demais 10 animais apresentaram de redução a aumento dos GAGs viscerais. Essas variações individuais provavelmente devem ser resultado da co-herdabilidade de outros genes durante a expansão da colônia.

Finalmente, nossos resultados sugerem que o tratamento tardio com TRE é efetivo na redução de GAGs urinários e acúmulo em órgãos viscerais. Apesar dos níveis de GAGs do miocárdio também terem sido normalizados e a espessura das válvulas ter sido altamente reduzida, a função cardíaca não foi completamente restaurada. Entretanto, tendo em vista que complicações cardiorrespiratórias são as principais causas de morte em pacientes com Hurler, as melhorias observadas neste estudo podem ter repercussões importantes no manejo clínico dos pacientes. Além disso, a alta variabilidade encontrada no comportamento dos animais tratados não pode ser explicada pelos níveis de GAGs no córtex, atividade de catepsina D, função cardíaca ou presença de anticorpos.. Em conclusão, a administração de TRE tardiamente pode trazer benefícios clínicos para os pacientes, como evidenciados pelos dados neste estudo, e deve ser considerada como uma opção de tratamento sempre que possível.

CONCLUSÕES

Ao total 13 camundongos com MPS I de 6 meses foram tratados durante dois meses com TRE a cada duas semanas com 1.2mg/kg de laronidase e reações cutâneas foram identificadas em 3 indivíduos. Como não foi possível determinar se essas reações estavam ou não ligadas ao tratamento, esses animais foram excluídos do restante do estudo.

O conteúdo de GAGs urinários teve uma redução significativa ao fim do tratamento, atingindo níveis normais já na segunda injeção de laronidase. O acúmulo no fígado, rim e pulmão também foi normalizado com o tratamento.

A função cardíaca foi parcialmente corrigida nos animais tratados, visto que eles apresentaram normalização do acúmulo de GAG no coração e da fração de encurtamento ventricular esquerda. A espessura das válvulas cardíacas foi reduzida significativamente, mas não foram observados efeitos clínicos sobre a largura da aorta.

A administração de TRE tardia não demonstrou nenhuma melhora sobre os parâmetros comportamentais analisados no grupo tratado como um todo, apesar de que os animais tratados apresentaram respostas muito heterogêneas em relação ao comportamento exploratório e locomotor.

O nível de GAGs no córtex cerebelar dos animais tratados foi similar ao dos controles MPS e significativamente maior do que nos controles normais. Animais tratados obtiveram atividade de catepsina D intermediária entre controles normais e MPS.

Todos os animais tratados produziram anticorpos séricos do tipo IgG contra laronidase. O significado clínico destes anticorpos não foi determinado e não foram encontradas correlações significativas com nenhum outro parâmetro analisado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B. *et al.* (EDS.). Junções celulares, adesão celular e matriz extracelular. *In: Biologia Molecular da Célula*. 4^a. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 1065-1126.

BALDO, G. **Mucopolissacaridoses : mecanismos patogênicos e abordagens terapêuticas baseadas em terapia gênica e reposição enzimática**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012.

BOELEN, J. J. *et al.* Current international perspectives on hematopoietic stem cell transplantation for inherited metabolic disorders. **Pediatric clinics of North America**, v. 57, n. 1, p. 123-45, fev. 2010.

BRANDS, M. M. M. G. *et al.* Mucopolysaccharidosis: Cardiologic features and effects of enzyme-replacement therapy in 24 children with MPS I, II and VI. **Journal of inherited metabolic disease**, 26 jan. 2012.

BRAUNLIN, E. A. *et al.* Usefulness of bone marrow transplantation in the Hurler syndrome. **The American journal of cardiology**, v. 92, n. 7, p. 882-6, 1 out. 2003.

BRAUNLIN, E. A.; BERRY, J. M.; WHITLEY, C. B. Cardiac findings after enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis type I. **The American journal of cardiology**, v. 98, n. 3, p. 416-8, 1 ago. 2006.

BURTON, B. K.; WHITEMAN, D. A H. Incidence and timing of infusion-related reactions in patients with mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome) on idursulfase therapy in the real-world setting: a perspective from the Hunter Outcome Survey (HOS). **Molecular genetics and metabolism**, v. 103, n. 2, p. 113-20, jun. 2011.

CLARKE, L. A. *et al.* Murine mucopolysaccharidosis type I: targeted disruption of the murine alpha-L-iduronidase gene. **Human molecular genetics**, v. 6, n. 4, p. 503-11, abr. 1997.

CLARKE, L. A. *et al.* Long-term efficacy and safety of laronidase in the treatment of mucopolysaccharidosis I. **Pediatrics**, v. 123, n. 1, p. 229-40, jan. 2009.

COPPA, G. V *et al.* Effect of 6 years of enzyme replacement therapy on plasma and urine glycosaminoglycans in attenuated MPS I patients. **Glycobiology**, v. 20, n. 10, p. 1259-73, out. 2010.

D'ACO, K. *et al.* Diagnosis and treatment trends in mucopolysaccharidosis I: findings from the MPS I Registry. **European journal of pediatrics**, v. 171, n. 6, p. 911-9, jun. 2012.

DICKSON, P. *et al.* Immune tolerance improves the efficacy of enzyme replacement therapy in canine mucopolysaccharidosis I. v. 118, n. 8, 2008.

DIERENFELD, A. D. *et al.* Replacing the enzyme alpha-L-iduronidase at birth ameliorates symptoms in the brain and periphery of dogs with mucopolysaccharidosis type I. **Science translational medicine**, v. 2, n. 60, p. 60ra89, 1 dez. 2010.

DINIZ, D.; MEDEIROS, M.; SCHWARTZ, I. V. D. Consequências da judicialização das políticas de saúde: custos de medicamentos para as mucopolissacaridoses. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 28, n. 3, p. 479-489, mar. 2012.

FILOCAMO, M.; MORRONE, A. Lysosomal storage disorders: molecular basis and laboratory testing. **Human genomics**, v. 5, n. 3, p. 156-69, mar. 2011.

FULLER, M. *et al.* Prediction of neuropathology in mucopolysaccharidosis I patients. **Molecular genetics and metabolism**, v. 84, n. 1, p. 18-24, jan. 2005.

GABRIELLI, O. *et al.* Enzyme-replacement therapy in a 5-month-old boy with attenuated presymptomatic MPS I: 5-year follow-up. **Pediatrics**, v. 125, n. 1, p. e183-7, jan. 2010.

GIUGLIANI, R. *et al.* A dose-optimization trial of laronidase (Aldurazyme) in patients with mucopolysaccharidosis I. **Molecular genetics and metabolism**, v. 96, n. 1, p. 13-9, jan. 2009.

GIUGLIANI, R. *et al.* Mucopolysaccharidosis I, II, and VI: Brief review and guidelines for treatment. **Genetics and molecular biology**, v. 33, n. 4, p. 589-604, out. 2010.

GIUGLIANI, R. Newborn screening for lysosomal diseases: current status and potential interface with population medical genetics in Latin America. **Journal of inherited metabolic disease**, v. 35, n. 5, p. 871-7, set. 2012.

HARADA, H. *et al.* Laronidase replacement therapy improves myocardial function in mucopolysaccharidosis I. **Molecular genetics and metabolism**, v. 103, n. 3, p. 215-9, jul. 2011.

HASKINS, M. E. *et al.* The pathology of the feline model of mucopolysaccharidosis I. **The American journal of pathology**, v. 112, n. 1, p. 27-36, jul. 1983.

HE, X. *et al.* Identification and characterization of the molecular lesion causing mucopolysaccharidosis type I in cats. **Molecular genetics and metabolism**, v. 67, n. 2, p. 106-12, jun. 1999.

HOBBS, J. R. *et al.* Reversal of clinical features of Hurler's disease and biochemical improvement after treatment by bone-marrow transplantation. **Lancet**, v. 2, n. 8249, p. 709-12, 3 out. 1981.

KAKKIS, E. D. *et al.* Overexpression of the human lysosomal enzyme alpha-L-iduronidase in Chinese hamster ovary cells. **Protein expression and purification**, v. 5, n. 3, p. 225-32, jun. 1994.

KAKKIS, E. D. *et al.* Long-term and high-dose trials of enzyme replacement therapy in the canine model of mucopolysaccharidosis I. **Biochemical and molecular medicine**, v. 58, n. 2, p. 156-67, ago. 1996.

KAKKIS, E. D. *et al.* Enzyme-replacement therapy in mucopolysaccharidosis I. **The New England journal of medicine**, v. 344, n. 3, p. 182-8, 18 jan. 2001.

LAGRANHA, V. L. **Correção in vitro da deficiência de arilsulfatase A em fibroblastos de pacientes com leucodistrofia metacromática através do uso de células recombinantes microencapsuladas.** [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.

LYONS, J. A. *et al.* Arterial pathology in canine mucopolysaccharidosis-I and response to therapy. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 91, n. 5, p. 665-74, maio. 2011.

MA, X. *et al.* Upregulation of elastase proteins results in aortic dilatation in mucopolysaccharidosis I mice. **Molecular genetics and metabolism**, v. 94, n. 3, p. 298-304, jul. 2008.

MAHALINGAM, K. *et al.* Diagnosis of mucopolysaccharidoses: how to avoid false positives and false negatives. **Indian journal of pediatrics**, v. 71, n. 1, p. 29-32, jan. 2004.

MARTINS, A. M. *et al.* Guidelines for the management of mucopolysaccharidosis type I. **The Journal of pediatrics**, v. 155, n. 4 Suppl, p. S32-46, out. 2009.

MATTE, U. **Caracterização Molecular de Pacientes com Mucopolissacaridose Tipo I: Um Estudo no Brasil.** [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998.

MATTHES, F. *et al.* Efficacy of enzyme replacement therapy in an aggravated mouse model of metachromatic leukodystrophy declines with age. **Human molecular genetics**, v. 21, n. 11, p. 2599-609, 1 jun. 2012.

MAYER, F. Q. **Desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o tratamento da Mucopolissacaridose tipo I.** [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande Do Sul, 2011.

MCGILL, J. J. *et al.* Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis VI from 8 weeks of age--a sibling control study. **Clinical genetics**, v. 77, n. 5, p. 492-8, maio. 2010.

MENON, K. P.; TIEU, P. T.; NEUFELD, E. F. Architecture of the canine IDUA gene and mutation underlying canine mucopolysaccharidosis I. **Genomics**, v. 14, n. 3, p. 763-8, nov. 1992.

METCALF, J. A *et al.* Upregulation of elastase activity in aorta in mucopolysaccharidosis I and VII dogs may be due to increased cytokine expression. **Molecular genetics and metabolism**, v. 99, n. 4, p. 396-407, abr. 2010.

MUENZER, J. Overview of the mucopolysaccharidoses. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 50 Suppl 5, p. v4-12, dez. 2011.

MUENZER, J.; FISHER, A. Advances in the treatment of mucopolysaccharidosis type I. **The New England journal of medicine**, v. 350, n. 19, p. 1932-4, 6 maio. 2004.

MUENZER, J.; WRAITH, J. E.; CLARKE, L. A. Mucopolysaccharidosis I: management and treatment guidelines. **Pediatrics**, v. 123, n. 1, p. 19-29, jan. 2009.

MUÑOZ-ROJAS, M. V. *et al.* Clinical manifestations and treatment of mucopolysaccharidosis type I patients in Latin America as compared with the rest of the world. **Journal of inherited metabolic disease**, v. 34, n. 5, p. 1029-37, out. 2011.

NEMES, A. *et al.* The mild form of mucopolysaccharidosis type I (Scheie syndrome) is associated with increased ascending aortic stiffness. **Heart and vessels**, v. 23, n. 2, p. 108-11, mar. 2008.

NEUFELD, E. F.; MUENZER, J. The Mucopolysaccharidoses. *In*: SCRIVE, C. *et al.* (Eds.). **The metabolic and molecular basis of inherited disease**. 8th. ed. New York: Mc Graw-Hill, 2001. p. 3421-3452.

OHMI, K. *et al.* Activated microglia in cortex of mouse models of mucopolysaccharidoses I and IIIB. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 4, p. 1902-7, 18 fev. 2003.

PASTORES, G. M. *et al.* The MPS I registry: design, methodology, and early findings of a global disease registry for monitoring patients with Mucopolysaccharidosis Type I. **Molecular genetics and metabolism**, v. 91, n. 1, p. 37-47, maio. 2007.

PETERS, C. *et al.* Outcome of unrelated donor bone marrow transplantation in 40 children with Hurler syndrome. **Blood**, v. 87, n. 11, p. 4894-902, 1 jun. 1996.

PETERS, C. *et al.* Hurler syndrome: II. Outcome of HLA-genotypically identical sibling and HLA-haploidentical related donor bone marrow transplantation in fifty-

four children. The Storage Disease Collaborative Study Group. **Blood**, v. 91, n. 7, p. 2601-8, 1 abr. 1998.

PETERS, C.; STEWARD, C. G. Hematopoietic cell transplantation for inherited metabolic diseases: an overview of outcomes and practice guidelines. **Bone marrow transplantation**, v. 31, n. 4, p. 229-39, fev. 2003.

PILLER PUICHER, E. *et al.* Encapsulated engineered myoblasts can cure Hurler syndrome: preclinical experiments in the mouse model. **Gene therapy**, v. 19, n. 4, p. 355-64, abr. 2012.

PLATT, F. M.; BOLAND, B.; SPOEL, A. C. VAN DER. The cell biology of disease: lysosomal storage disorders: the cellular impact of lysosomal dysfunction. **The Journal of cell biology**, v. 199, n. 5, p. 723-34, 26 nov. 2012.

RU, M. H. DE *et al.* Enzyme replacement therapy and/or hematopoietic stem cell transplantation at diagnosis in patients with mucopolysaccharidosis type I: results of a European consensus procedure. **Orphanet journal of rare diseases**, v. 6, p. 55, jan. 2011.

RU, M. H. DE *et al.* Plasma and urinary levels of dermatan sulfate and heparan sulfate derived disaccharides after long-term enzyme replacement therapy (ERT) in MPS I: correlation with the timing of ERT and with total urinary excretion of glycosaminoglycans. **Journal of inherited metabolic disease**, 19 set. 2012.

SCHULZE-FRENKING, G. *et al.* Effects of enzyme replacement therapy on growth in patients with mucopolysaccharidosis type II. **Journal of inherited metabolic disease**, v. 34, n. 1, p. 203-8, fev. 2011.

SCOTT, H. S. *et al.* Chromosomal localization of the human alpha-L-iduronidase gene (IDUA) to 4p16.3. **American journal of human genetics**, v. 47, n. 5, p. 802-7, nov. 1990.

SCOTT, H. S. *et al.* A common mutation for mucopolysaccharidosis type I associated with a severe Hurler syndrome phenotype. **Human mutation**, v. 1, n. 2, p. 103-8, jan. 1992.

SHULL, R. M. *et al.* Canine alpha-L-iduronidase deficiency. A model of mucopolysaccharidosis I. **The American journal of pathology**, v. 109, n. 2, p. 244-8, nov. 1982.

SIFUENTES, M. *et al.* A follow-up study of MPS I patients treated with laronidase enzyme replacement therapy for 6 years. **Molecular genetics and metabolism**, v. 90, n. 2, p. 171-80, fev. 2007.

SPELLACY, E. *et al.* A canine model of human alpha-L-iduronidase deficiency. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 80, n. 19, p. 6091-5, out. 1983.

TOKIC, V. *et al.* Enzyme replacement therapy in two patients with an advanced severe (Hurler) phenotype of mucopolysaccharidosis I. **European journal of pediatrics**, v. 166, n. 7, p. 727-32, jul. 2007.

VALAYANNOPOULOS, V.; WIJBURG, F. A. Therapy for the mucopolysaccharidoses. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 50 Suppl 5, p. v49-59, dez. 2011.

WANG, D. *et al.* Characterization of an MPS I-H knock-in mouse that carries a nonsense mutation analogous to the human IDUA-W402X mutation. **Molecular genetics and metabolism**, v. 99, n. 1, p. 62-71, jan. 2010.

WILCOX, W. R. Lysosomal storage disorders: the need for better pediatric recognition and comprehensive care. **The Journal of pediatrics**, v. 144, n. 5 Suppl, p. S3-14, maio. 2004.

WINCHESTER, B. G. Lysosomal metabolism of glycoconjugates. **Sub-cellular biochemistry**, v. 27, p. 191-238, jan. 1996.

WRAITH, J. E. Lysosomal disorders. **Seminars in neonatology : SN**, v. 7, n. 1, p. 75-83, fev. 2002.

WRAITH, J. E. *et al.* Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis I: a randomized, double-blinded, placebo-controlled, multinational study of recombinant human alpha-L-iduronidase (laronidase). **The Journal of pediatrics**, v. 144, n. 5, p. 581-8, maio. 2004.

WRAITH, J. E. *et al.* Enzyme replacement therapy in patients who have mucopolysaccharidosis I and are younger than 5 years: results of a multinational study of recombinant human alpha-L-iduronidase (laronidase). **Pediatrics**, v. 120, n. 1, p. e37-46, jul. 2007.

ZHENG, Y. *et al.* Treatment of the mouse model of mucopolysaccharidosis I with retrovirally transduced bone marrow. **Molecular genetics and metabolism**, v. 79, n. 4, p. 233-44, ago. 2003.