

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Investigação dos biomarcadores de estresse oxidativo e inflamação
em pacientes portadores de Mucopolissacaridose tipo IVA
submetidos à terapia de reposição enzimática.

BRUNA DONIDA

Porto Alegre, 2015

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Investigação dos biomarcadores de estresse oxidativo e inflamação
em pacientes portadores de Mucopolissacaridose tipo IVA
submetidos à terapia de reposição enzimática.

Dissertação apresentada por **Bruna
Donida** para obtenção do GRAU DE
MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

Orientador(a): Profa. Dra. Carmen Regla Vargas

Porto Alegre, 2015

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 19.03.2015, pela banca examinadora constituída por:

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

Prof. Dr. Fábio Klamt
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Janice Carneiro Coelho
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Donida, Bruna
Investigação dos biomarcadores de estresse oxidativo e inflamação em pacientes portadores de Mucopolissacaridose tipo IVA submetidos à terapia de reposição enzimática. / Bruna Donida. -- 2015.
87 f.

Orientador: Carmen Regla Vargas.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Mucopolissacaridose IVA. 2. estresse oxidativo. 3. inflamação. 4. terapia de reposição enzimática. 5. glicosaminoglicanos. I. Regla Vargas, Carmen, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análises de Metabólitos do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, com financiamento do CNPq e do FIPE/HCPA.

“Escolha uma ideia. Faça dessa ideia a sua vida. Pense nela, sonhe com ela, viva pensando nela. Deixe cérebro, músculos, nervos, todas as partes do seu corpo serem preenchidas com essa ideia. Esse é o caminho para o sucesso.”

Swami Vivekananda

AGRADECIMENTOS

Tenho muito a agradecer a todas as pessoas que trilharam comigo esse caminho...

Primeiramente à Professora Carmen Regla Vargas pela oportunidade de realizar o meu mestrado sob a sua supervisão, por todos os valiosos ensinamentos, por estar sempre disponível, pela paciência e principalmente pelo modo leve com o qual orienta o nosso grupo. Tive sorte de ter escolhido uma profissional exemplar e tão generosa para me guiar nessa jornada.

Gostaria de agradecer aos meus pais Maria Luiza Donida e Miguel Carlos Donida ao incentivo para que eu buscasse sempre me aperfeiçoar, agradeço principalmente pela liberdade para que eu criasse asas e alcançasse o mundo. Às minhas irmãs pelo exemplo que são para mim e por estarem sempre ao meu lado, nos bons e maus momentos. Família, vocês são meu porto seguro, amo vocês.

Ao Daniel Vancin e sua família, muito obrigada por me acolherem em sua casa e em sua família, me incentivando durante todo o tempo para que eu alcançasse meus objetivos. Ao Daniel meu noivo e meu amor, em especial, por me encorajar a superar os meus limites e nunca desistir. Muito obrigada pela paciência e por estar sempre ao meu lado me fazendo ver e viver a vida de uma forma muito mais bonita.

Agradeço ao pessoal do Laboratório de Análise de Metabólitos do HCPA por cederem seu espaço para que eu pudesse realizar meus experimentos e aos colegas de laboratório (Caroline Mescka, Carlos Jacques, Carlos Whays, Gilian Guerreiro, Giovana Biancini, Graziela Ribas, Jéssica Faverzani, Marion Deon, e Tatiane Hammerschimdt) eu agradeço pela ajuda, pelas discussões, pela troca de conhecimento, mas, sobretudo, eu agradeço pela amizade.

Agradeço aos colaboradores que foram de suma importância para que este projeto fosse concretizado: Paula, Helen e Professoras Dinara Moura e Jenifer Saffi da UFCSPA, Fernanda e Maíra do LEIM/HCPA, Professora Adriana Coitinho do ICBS/UFRGS e Doutor Roberto Giugliani, chefe do Serviço de Genética Médica. Faço um agradecimento especial aos pacientes que acreditaram na nossa pesquisa e aceitaram participar dela e também aos profissionais do CPC que estiveram sempre dispostos a ajudar.

Não poderia deixar de prestar meus agradecimentos à minha irmã de coração e parceira nessa jornada, Desirée Marchetti. Amiga, sem ti nada disso seria possível, só nós sabemos o que passamos juntas durante esses dois mestrados, o teu e o meu, ou diria melhor: o nosso. Sou muito grata pela nossa amizade e por ter alguém tão generosa e iluminada ao meu lado, muito obrigada por toda a ajuda e parceria nestes nove anos de convivência.

Às minhas eternas amigas de infância (Carolina Franceschetto, Juliane Dal Vesco, Letícia Paludo) que me incentivam a sempre buscar o meu melhor, meu muito obrigado. Nossos encontros me mostram que eu sou mais forte com vocês ao meu lado e de que sempre estarei amparada pela nossa amizade, vocês são essenciais na minha vida.

Agradeço, por fim, ao CNPq pelo apoio financeiro.

Gratidão.

RESUMO

A Mucopolissacaridose tipo IVA (MPS IVA), é uma doença lisossômica de depósito ocasionada pela degradação deficiente dos glicosaminoglicanos (GAG) queratan sulfato e condroitin-6-sulfato devido à deficiência da enzima N-acetilgalactosamina 6-sulfatase. Como a fisiopatologia desta doença ainda não está totalmente elucidada e muitos estudos vêm demonstrando o envolvimento do estresse oxidativo e inflamação na patogênese de outros tipos de mucopolissacaridoses, o objetivo principal deste trabalho foi investigar os parâmetros de estresse oxidativo e mediadores inflamatórios em pacientes MPS IVA sob terapia de reposição enzimática (TRE). Foram analisadas amostras de urina e sangue de pacientes MPS IVA sob TRE (n=17) e controles saudáveis pareados por idade (n=10-14). Os pacientes apresentaram diminuição significativa nos níveis de defesas antioxidantes, medida através dos níveis de glutathiona reduzida (GSH), e aumento da enzima superóxido dismutase (SOD) em eritrócitos. Em relação ao dano a biomoléculas, foi observado nos pacientes um aumento de lipoperoxidação (aumento dos níveis de isoprostanos urinários) e de dano oxidativo a proteínas (aumento dos níveis urinários de di-tirosina e diminuição dos grupamentos sulfidríla no plasma) comparativamente aos controles. Nossos resultados também mostraram que os pacientes MPS IVA sob TRE apresentaram maior dano ao DNA, sendo este dano de origem oxidativa e atingindo bases purínicas e pirimidínicas. Além disso, os pacientes apresentaram níveis significativamente aumentados de interleucina-6 e esta, por sua vez, apresentou correlação negativa com GSH, mostrando uma possível relação entre inflamação e estresse oxidativo nesta doença. Considerando que os níveis de GAG urinários ainda se encontravam elevados nos pacientes em comparação com o grupo controle, pode-se supor que os mesmos estejam, pelo menos em parte, correlacionados com os danos oxidativos encontrados nestes pacientes. Os dados encontrados no presente trabalho sugerem que pacientes MPS IVA sob TRE apresentam uma condição pró-inflamatória e oxidativa e que a suplementação com antioxidantes em combinação com a TRE deve ser investigada com o intuito de melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Cabe ressaltar que este é o primeiro estudo em pacientes que relaciona MPS IVA com estresse oxidativo e inflamação.

Palavras-chave: Mucopolissacaridose IVA, estresse oxidativo, inflamação, terapia de reposição enzimática, glicosaminoglicanos.

ABSTRACT

Investigation of oxidative stress and inflammation biomarkers in Mucopolysaccharidosis type IVA patients under enzyme replacement therapy

The Mucopolysaccharidosis type IVA (MPS IVA) is a lysosomal storage disease caused by impaired degradation of keratan sulfate and chondroitin-6-sulfate glycosaminoglycans (GAG), due to a deficiency on the enzyme N-acetylgalactosamine-6-sulfatase. Since the pathophysiology of this disease is still not totally elucidated and many studies demonstrated the involvement of oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of other mucopolysaccharidoses types, the principal objective of this study was to investigate oxidative stress parameters and inflammatory mediators in MPS IVA patients under enzyme replacement therapy (ERT). Urine and blood samples of MPS IVA patients under ERT (n= 17) and healthy age-matched controls (n= 10-14) were evaluated. Patients presented a significant decrease in antioxidant defenses levels, assessed by reduced glutathione (GSH), and increased superoxide dismutase (SOD) activity in erythrocytes. With regard to the biomolecules damage, was observed that patients presented lipid peroxidation (increase of isoprostanes urinary levels) and protein damage (increase of di-tyrosine urinary levels and decrease of sulfhydryl groups in plasma), when compared to controls. Our results showed higher DNA damage levels in MPS IVA patients compared to control group, in both pyrimidines and purines bases. The pro-inflammatory cytokine interleukin 6 (IL-6) was significantly increased in patients and showed an inverse correlation with GSH levels, showing a possible link between inflammation and oxidative stress in MPS IVA disease. Considering that GAG urinary level were still high in ERT patients compared to the control group, we propose that GAG are, at least in part, related with oxidative damage found in MPS IVA patients. The data presented suggest that pro-inflammatory and pro-oxidant states occur in MPS IVA patients under ERT, and the supplementation of antioxidants in combination with ERT can be investigated with the purpose of improving the patient's life quality. To the best of our knowledge, this is the first study in patients relating MPS IVA with oxidative stress and inflammation.

Keywords: Mucopolysaccharidosis IVA, oxidative stress, inflammation, enzyme replacement therapy, glycosaminoglycans.

LISTA DE ABREVIATURAS

AAS – Ácido acetilsalicílico

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CAT – Catalase

CHO – do inglês *Chinese Hamster Ovary*

DLD – Doenças lisossômicas de depósito

DMB - do inglês *1,9-Dimethyl-Methylene Blue*

EIM – Erros inatos do metabolismo

Endo III – Endonuclease III

ER – Espécies reativas

ERN – Espécies reativas de nitrogênio

ERO – Espécies reativas de oxigênio

FDA – do inglês *Food and Drug Administration*

GAG - Glicosaminoglicanos

GALNS - do inglês *N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase*

GPx – Glutathione peroxidase

GR – Glutathione redutase

GSH – Glutathione reduzida

GSSG – Glutathione oxidada

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

IL-1 β – Interleucina 1 β

IL-6 – Interleucina 6

IFN γ – Interferon γ

i.v. – Intravenosa

LC/MS/MS – Cromatografia Líquida acoplada a Espectroscopia de Massas em tandem

MDA - Malondialdeído

MPS - Mucopolissacaridose

O₂^{•-} - Radical superóxido

O₂¹ – Oxigênio Singlet

OH[•] - Radical hidroxil

RL – Radicais livres

SOD – Superóxido dismutase

TAS – *Status* antioxidante total

TAR – Reatividade antioxidante total

TBARS - Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

TNF α – Fator de necrose tumoral α

TRE - Terapia de reposição enzimática

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO.....	19
1.2 LISSOSSOMOS	20
1.3 DOENÇAS LISSOSSÔMICAS DE DEPÓSITO E MUCOPOLISSACARIDOSES..	21
1.4 MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO IVA	23
1.5 TERAPIA DE REPOSIÇÃO ENZIMÁTICA	25
1.6 RADICAIS LIVRES E ESTRESSE OXIDATIVO.....	27
1.7 ESTRESSE OXIDATIVO E MARCADORES INFLAMATÓRIOS EM MUCOPOLISSACARIDOSES	28
2. OBJETIVOS	33
2.1 OBJETIVO GERAL	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
3. RESULTADOS	37
3.1 CAPÍTULO 1- ARTIGO 1: <i>Oxidative stress and inflammation in Mucopolysaccharidosis type IVA patients treated with enzyme replacement therapy.</i>	39
4. DISCUSSÃO	49
5. CONCLUSÕES	59
6. PERSPECTIVAS	63
7. REFERÊNCIAS	67
8. ANEXOS	81
8.1 ANEXO 1- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PACIENTES COM MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO IVA.....	83
8.2 ANEXO 2- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PACIENTES CONTROLE	85
8.3 ANEXO 3- COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	87

1. INTRODUÇÃO

1.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO

Erros Inatos do Metabolismo (EIM) são desordens genéticas caracterizadas pela síntese alterada de uma proteína, geralmente uma enzima, que pode ter sua atividade parcial ou totalmente reduzida. O resultado dessa síntese errônea é o bloqueio de determinada via metabólica com conseqüente acúmulo de substratos e seus derivados e diminuição de produtos (Scriver et al., 2001). A repercussão clínica deste bloqueio metabólico é variável, sendo geralmente grave ou letal (Waber, 1990).

Segundo Saudubray e Charpentier (2001) os EIM podem ser classificados em três grandes grupos com base em sua fisiopatologia:

- a) Distúrbios na síntese ou degradação de macromoléculas complexas. As doenças enquadradas neste grupo apresentam sintomas permanentes, progressivos, não dependentes de eventos intercorrentes e não relacionados à ingesta alimentar. Fazem parte deste grupo as doenças lisossômicas de depósito (ex.: doença de Gaucher, doença de Fabry, Mucopolissacaridoses etc.) e as desordens peroxissomais (ex.: adrenoleucodistrofia ligada ao X, doença de Refsum, síndrome de Zellweger etc.).
- b) Erros inatos do metabolismo intermediário. As doenças incluídas neste grupo podem levar à intoxicação aguda (quadros de acidose metabólica, vômitos, letargia e desidratação) ou intoxicação crônica (retardo mental, atraso no desenvolvimento psicomotor e luxação do cristalino), têm relação com ingesta alimentar e os pacientes podem apresentar intervalos livres de sintomas. A intoxicação ocorre pelo acúmulo de componentes tóxicos e de metabólitos, provenientes do bloqueio das rotas metabólicas. Fazem parte deste grupo as aminoacidopatias (ex: fenilcetonúria, doença do Xarope do Bordo, etc.), acidemias orgânicas (acidemia propiônica, acidemia metilmalônica, etc.), defeitos no ciclo da ureia (citrulonemia, argininemia, etc.) e as intolerâncias aos açúcares (galactosemia, etc.).
- c) Doenças com déficit de energia. Neste grupo de doenças, os sintomas são causados por deficiência na obtenção ou utilização de energia. Incluem-se as doenças de depósito de glicogênio, defeitos de gliconeogênese, acidemias

láticas congênitas, defeitos de oxidação dos ácidos graxos e doenças mitocondriais de cadeia respiratória.

A incidência isolada de cada uma das doenças metabólicas é pequena, visto que, de forma geral, são de herança autossômica recessiva. No entanto, se forem contabilizados os dados de cerca dos 500 distúrbios conhecidos (Sanseverino et al., 2000; Souza et al, 2002; Araujo, 2004) a frequência se torna mais expressiva, chegando a aproximadamente 1/5000 nascidos vivos (Souza 2002; Martins 1999; Martins 2003). Além disso, deve-se levar em consideração que os números baixos podem representar não só a raridade dos distúrbios, como, também, a subestimação de seu diagnóstico e, no que diz respeito a isto vale destacar o papel fundamental da triagem neonatal, conhecido como “teste do pezinho”. Esta triagem possibilitou grande avanço no conhecimento e tratamento dessas doenças a partir de sua detecção em fase pré-clínica, prevenindo o dano neurológico ou mesmo a morte dos pacientes (Jardim e Ashton-Prolla, 1996; Souza et al., 2002).

1.2 LISOSSOMOS

Os lisossomos foram descobertos a mais de 50 anos atrás, por Christian de Duve durante um estudo de distribuição de enzimas utilizando fracionamento subcelular por centrifuga. Estudos subsequentes mostraram que os lisossomos representam cerca de 5% do volume intracelular e possuem morfologia e tamanho heterogêneos (Luzio et al., 2007). Estas organelas recebem substratos através de endocitose, fagocitose ou por autofagia (Saftig e Klumperman, 2009). Os lisossomos estão envolvidos em uma gama de processos fisiológicos como a homeostase do colesterol, reparo da membrana plasmática, remodelamento de ossos e tecidos, defesa contra patógenos, morte e sinalização celular. Estas funções complexas fazem com o que o lisossomo seja uma organela dinâmica e importante e não simplesmente o compartimento final da via endocítica (Saftig e Klumperman, 2009).

O pH interno dos lisossomos é mantido entre 4,6-5 através de ATPases vacuolares próton-translocadoras. Dentro desta organela estão localizadas enzimas hidrolíticas (incluindo proteases, glicosidases, nucleases, fosfatases e lipases) necessárias para a degradação de macromoléculas como os glicosaminoglicanos (GAG), oligossacarídeos e esfingolipídeos e também são encontradas permeases de

efluxo, que facilitam a translocação de moléculas pequenas geradas durante o catabolismo (Luzio et al., 2007; Heese, 2008).

Os genes que codificam proteínas lisossomais estão presentes em todas as células. Entretanto, como as células possuem exigências metabólicas distintas, um defeito em uma enzima lisossomal, causando um acúmulo de moléculas complexas dentro do lisossomo, pode ter um impacto significativamente maior em determinado tecido, começando com disfunção celular e levando ao dano de órgãos e sistemas (Heese, 2008).

1.3 DOENÇAS LISSÔMICAS DE DEPÓSITO E MUCOPOLISSACARIDOSES

As doenças lisossômicas de depósito (DLD) compreendem cerca de 50 desordens resultantes de mutações genéticas que perturbam a homeostase lisossômica (Ballabio e Gieselmann, 2009). As DLD são resultantes, principalmente, da deficiência de hidrolases de macromoléculas solúveis no lúmen do lisossomo, mas também podem ser ocasionadas por defeito em proteínas transmembrana transportadoras. Em ambos os casos há um acúmulo anormal de substratos macromoleculares no lisossomo. Além da disfunção lisossomal primária, a célula como um todo é lesada nestas doenças (Platt et al., 2012). O acúmulo de macromoléculas na maioria das DLD inicia-se na vida fetal e torna-se evidente clinicamente nos dois primeiros anos de vida (Mabe et al., 2003).

As DLD representavam no Brasil, segundo Coelho e colaboradores (1997), 58,19% dos pacientes com EIM, sendo que 54,5% destes casos correspondiam às mucopolissacaridoses (MPSs). Em 2008, a rede MPS Brasil identificou 249 pacientes, entre estes 60 apresentavam MPS I, 82 MPS II, 31 MPS III (7 MPS IIIA, 14 MPS IIIB e 10 MPS IIIC), 15 MPS IV (11 MPS IVA e 4 MPS IVB), 57 MPS VI e 4 MPS VII (Vieira et al., 2008). Mundialmente, a incidência de MPS é cerca de 1:50.000 a 1:25.000 nascidos vivos (Nelson, 1997; Meikle et al., 1999; Poorthuis et al., 1999; Applegarth et al., 2000; Nelson et al., 2003; Baehner et al., 2005).

As MPS são um grupo heterogêneo de DLD causadas pela deficiência das enzimas envolvidas na degradação de GAG, também chamados mucopolissacarídeos, e são classificadas em 11 síndromes de acordo com a enzima ausente (tabela 1) (Neufeld e Muenzer, 2001). As MPS possuem padrão de herança autossômico recessivo, com exceção da MPS II, que apresenta um padrão recessivo

ligado ao cromossomo X (Neufeld e Muenzer, 2001). As MPS foram descritas pela primeira vez por Hunter em 1917, mas as bases bioquímicas só foram definidas a partir da década de 50 e os mecanismos moleculares envolvidos nestas desordens metabólicas começaram a ser decifrados a partir da década de 90 (Wraith, 1995).

Tabela 1. Relação entre as MPS e as enzimas deficientes.

Mucopolissacaridose	Enzima deficiente
tipo I	α -L-iduronidase
tipo II	iduronato-L-sulfatase
tipo IIIA	heparan-N-sulfatase
tipo IIIB	α -N-acetilglicosaminidase
tipo IIIC	acetil-CoA:alfa-glicosaminida-N-acetiltransferase
tipo IIID	N-acetilglicosamina 6-sulfatase
tipo IVA	N-acetilgalactosamina 6-sulfato sulfatase
tipo IVB	β -galactosidase
tipo VI	N-acetilgalactosamina 4-sulfatase
tipo VII	β -glicuronidase
tipo IX	Hialuronidase

Adaptado de Neufeld e Muenzer, 2001.

O acúmulo de GAG não degradados no lisossomo leva a uma disfunção celular, tecidual e orgânica. O curso da doença é crônico e progressivo, com acometimento de diversos sistemas, tais como: o esquelético, cardiopulmonar, a pele, córnea, fígado, baço, cérebro e meninges. Contudo, uma mesma deficiência enzimática pode ocasionar diferentes graus de comprometimento clínico, que variam desde quadros mais leves a moderados e graves. Algumas das manifestações clínicas que os pacientes com MPS podem apresentar são: baixa estatura; perímetro cefálico aumentado; face sugestiva de doença de depósito; envolvimento ocular; cardiopatia; organomegalia; infecções respiratórias; alterações cutâneas, hipoacusia e comprometimento neurológico (Neufeld e Muenzer, 2001).

A MPS IV, ou síndrome de Morquio (figura 1), é caracterizada pela degradação deficiente dos GAG queratan e condroitin-6-sulfato e é subdividida em IVA e IVB, ou Morquio A e Morquio B. Na primeira há deficiência da enzima N-

acetilgalactosamina 6-sulfato sulfatase (GALNS do inglês *N-acetylgalactosamine 6-sulfatase*) e acúmulo de queratan e condroitin-6-sulfato e na segunda defeito na enzima β -galactosidase e acúmulo de queratan sulfato, não sendo possível diferenciar as síndromes pelo fenótipo dos pacientes (Neufeld e Muenzer, 2001; Laradi et al., 2006). Inicialmente, a MPS IVB foi considerada como a forma mais branda da MPS IVA, entretanto, estudos subsequentes indicaram que o quadro da MPS IVB pode ser tão grave quanto aquele apresentado pelos pacientes acometidos pela MPS IVA (Neufeld e Muenzer, 2001).

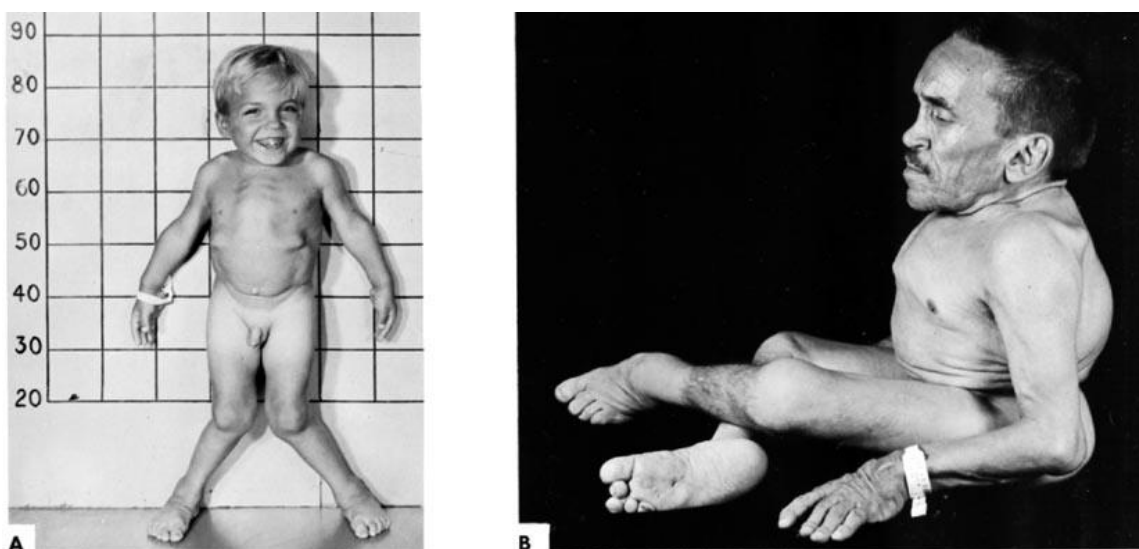


Figura 1. Pacientes com síndrome de Morquio (Fonte: Neufeld e Muenzer, 2014).

1.4 MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO IVA

A MPS IVA (OMIM 253000) é uma disordem rara com incidência variável de acordo com a região estudada, como, por exemplo, 1:76.000 nascidos vivos na Irlanda do Norte (Nelson, 1997) e 1:640.000 nascidos vivos na Austrália Ocidental (Nelson et al., 2003). Na população em geral, a incidência estimada fica em 1:201.000 nascidos vivos (Hendriksz et al., 2013).

O gene da enzima GALNS, que é afetada nesta síndrome, está localizado no cromossomo 16q24.3, contém 14 éxons e codifica uma proteína ácida com 522 aminoácidos, incluindo um peptídeo sinalizador de 26 resíduos (Tomatsu et al., 1991; Nakashima et al., 1994). A enzima GALNS foi purificada de placenta humana e se apresenta como um polipeptídeo contendo oligômeros de 40 e 15 kDa ligados por pontes dissulfeto (Masue et al., 1991). Na sua configuração madura, a enzima

encontra-se estabilizada na forma de um complexo com outras duas enzimas lisossomais (β -galactosidase e α -neuraminidase) e com a proteína protetora catepsina A (Pshezhetsky e Potier, 1996). Segundo Morrone e colaboradores (2014), já foram descritas 277 mutações no gene da GALNS, sendo a alteração *missense* a mais frequente. A extensa heterogeneidade alélica encontrada na síndrome de Morquio A é consistente com o amplo espectro de fenótipos observados (Düng et al., 2013).

Algumas das características encontradas nos pacientes portadores de MPS IVA são (Montaño et al., 2007; Martell et al., 2011; Tomatsu et al., 2011):

- baixa estatura;
- modificações na curvatura da coluna;
- pescoço e tronco curto com protuberância do peito (“pectus carinatum”);
- encurtamento de ossos longos (ossos dos braços e pernas);
- alargamento das articulações;
- face grosseira;
- proeminência do queixo;
- boca grande;
- deficiência auditiva;
- leve opacidade de córnea;
- dentes pequenos;
- hepatomegalia;
- obstrução de vias aéreas superiores;
- comprometimento valvular do coração.

Diferentemente de muitos EIM, os pacientes portadores de MPS IVA não apresentam nenhum retardo mental (Neufeld e Muenzer, 2001). O tecido conectivo (incluindo a cartilagem, a córnea e as válvulas cardíacas) por ser rico em queratan sulfato é o principal afetado nestes pacientes (Dvorak-Ewell et al., 2010).

Os sinais e sintomas característicos desta doença aparecem por volta dos 2-3 anos de idade, sendo que os pacientes podem apresentar desde o fenótipo mais brando podendo chegar aos 70 anos, até o fenótipo mais severo, sobrevivendo somente até os 20-30 anos. Estes últimos representam aproximadamente 70% do total de pacientes com MPS IVA e esta sobrevida baixa é devido, principalmente, ao comprometimento pulmonar e instabilidade cervical que acomete estes pacientes

(Lankaster et al., 2006; Montañó et al., 2007; Martell et al., 2011; Tomatsu et al., 2011).

Quando uma suspeita clínica de MPS IVA é levantada, juntamente com imagens radiográficas segue-se o diagnóstico laboratorial da doença. Como os pacientes com MPS excretam os GAG em excesso na urina, esta se torna um material biológico útil no *screening* inicial da doença. Para isso, utilizam-se testes qualitativos como a cromatografia de GAG (Lipiello e Mankin, 1971; Humbel e Chamoles, 1972), eletroforese uni ou bidimensional (Pennock 1976; Cappelletti et al., 1979), e testes quantitativos como o azul de 1,9-dimetilmetileno (DMB do inglês *1,9-Dimethyl-Methylene Blue*). Os primeiros são especialmente úteis para detectar o tipo de GAG em excesso e direcionar os ensaios enzimáticos. Já o método de DMB é utilizado para acompanhamento da resposta do paciente ao tratamento (Barth et al., 1990; de Jong et al., 1992; Chih-Kuang et al., 2002). A cromatografia líquida acoplada à espectroscopia de massas em tandem (LC/MS/MS) vem sendo utilizada de forma promissora para a dosagem de queratan sulfato na urina. A técnica empregando LC/MS/MS pode ser utilizada tanto para avaliar o estado clínico de pacientes com MPS IVA quanto para determinar a resposta ao tratamento (Tomatsu et al., 2010). Após o *screening* urinário, o padrão ouro para o diagnóstico de Morquio A é a demonstração da atividade deficiente da enzima GALNS em leucócitos ou fibroblastos. Também são necessários testes adicionais para confirmar a integridade da amostra e para excluir outras desordens que podem reduzir a atividade da enzima GALNS, como deficiência múltipla de sulfatases ou mucopolioses tipo II/III. A análise molecular pode confirmar o diagnóstico de Morquio A e detectar as mutações causais no gene GALNS (Wood et al., 2013).

1.5 TERAPIA DE REPOSIÇÃO ENZIMÁTICA

A terapia de reposição enzimática (TRE) consiste na reposição, por via intravenosa (i.v.), de uma forma ativa e recombinante da enzima deficiente, o que ocasiona, por conseguinte, uma diminuição do substrato acumulado na doença e uma provável melhora clínica. Esta terapia vem sendo utilizada, de forma promissora, em pacientes com MPS I, II e VI (Wraith, 2006; Bagewadi et al., 2008; Coman et al., 2008).

Há relatos na literatura de que pacientes com MPS I submetidos à TRE apresentaram melhora significativa na função respiratória, na capacidade física, redução de 25% da hepatoesplenomegalia e diminuição de 80% dos níveis de GAG urinários (Kakkis et al., 2001; Germain, 2005; Giugliani et al., 2009). A TRE se mostrou eficaz, também, em pacientes com MPS II, sendo que estes apresentaram melhora na função respiratória, no teste de caminhada de 6 minutos e redução do volume de fígado e baço (Muenzer et al., 2006; Muenzer et al., 2007; Wraith et al., 2008; Okuyama et al., 2010; White et al., 2010). A administração de arilsulfatase B (N-acetilgalactosamina 4-sulfatase) reduziu significativamente os níveis de dermatan sulfato, melhorou a função respiratória e a capacidade física de pacientes MPS VI (Harmatz et al., 2008).

A maior desvantagem deste tipo de tratamento é que a enzima fornecida i.v. não consegue atravessar a barreira hematoencefálica (Burrow et al., 2007). Contudo, como os pacientes MPS IVA apresentam somente comprometimento físico e não intelectual, eles seriam potenciais candidatos para o uso de TRE. Considerando o exposto, no início de 2014, o FDA (*Food and Drug Administration* - agência regulatória norte-americana) aprovou a TRE, realizada através da infusão i.v. da enzima recombinante GALNS (elosulfase alfa; Vimizim[®], BioMarin Pharmaceutical Inc., Novato, CA, USA) em pacientes com MPS IVA. A empresa Biomarin já submeteu junto à ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) o pedido de registro para comercialização de Vimizim[®] no Brasil, entretanto este pedido ainda está em análise pela agência regulatória Brasileira.

A dose recomendada do Vimizim[®] é de 2mg/kg, a qual deve ser administrada intravenosamente, uma vez por semana durante 3,5 a 4,5 horas. Também é recomendado o uso de anti-histamínicos, com ou sem antipiréticos, 30 a 60 minutos antes do início da infusão da TRE (Hendriksz et al., 2014). A elosulfase alfa foi produzida em cultura de células mutante de ovário de hamster chinês (CHO do inglês *Chinese Hamster Ovary*) geneticamente modificada para expressar o cDNA que codifica a proteína humana GALNS. A proteína produzida é idêntica à enzima lisossomal humana em termos de sequência de aminoácidos e sítios N-glicosilados. A farmacologia não clínica, a farmacocinética e a toxicologia da elosulfase alfa já foram avaliadas em estudos *in vitro* e em modelo animal, sendo que a enzima apresentou um perfil toxicológico e de segurança consistente com o observado em

programas não clínicos de outras TRE (Dvorak-Ewell et al., 2010). Além da medicação se mostrar segura para utilização em humanos, os pacientes que fizeram uso da enzima semanalmente (durante seis meses) apresentaram melhora no teste de caminhada de 6 minutos e diminuição da excreção de queratan sulfato na urina (Hendriksz et al.,2014).

1.6 RADICAIS LIVRES E ESTRESSE OXIDATIVO

Radicais livres (RL) são estruturas químicas com um elétron desemparelhado no seu último orbital, ou seja, ocupando um orbital atômico sozinho, o que confere uma alta reatividade à molécula. Em nosso organismo são produzidos radicais livres de carbono, enxofre, nitrogênio (espécies reativas de nitrogênio ou ERN) e oxigênio (espécies reativas de oxigênio ou ERO), sendo estas últimas as que ganham maior destaque devido à sua alta reatividade aos danos gerados às biomoléculas. As ERO podem ser produzidas por fontes exógenas, tais como a radiação, cigarro, solventes orgânicos, paraquat e paracetamol e por fontes endógenas, através de processos como a degradação de ácidos graxos, a fagocitose, citocromo P-450 e cadeia de transporte de elétrons. O termo ERO é utilizado tanto para RL de oxigênio, como o superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxil (OH^{\bullet}) e o oxigênio singlet (O_2^1), quanto para alguns não radicais capazes de gerar RL, como por exemplo, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que pode produzir o OH^{\bullet} (Ramos-Vasconcelos et al., 2000; Halliwell e Gutteridge, 2007).

Em situações fisiológicas o organismo consegue minimizar a ação das ERO através do sistema de defesa antioxidante. A definição clássica para o termo antioxidante é a de qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações em relação a um substrato oxidável, significativamente diminui ou previne a oxidação deste substrato. As defesas antioxidantes que atuam em sistemas biológicos são compostas por antioxidantes não enzimáticos e antioxidantes enzimáticos. Nos primeiros estão incluídas as vitaminas (como por ex., A, C e E), a glutathiona reduzida (GSH), os carotenóides, proteínas ligantes de metal (transferrina, ferritina) dentre outros. Os antioxidantes não enzimáticos podem atuar de diversas maneiras, por exemplo, através da remoção do oxigênio presente no meio, como detoxificadores/sequestradores de RL, quelantes de íons metálicos e reparadores de lesão (Halliwell e Gutteridge, 2007). Já, entre os antioxidantes

enzimáticos, podem-se citar as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona-peroxidase (GPx). A SOD é uma metaloenzima que catalisa a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ ao H_2O_2 , o qual é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas, como a CAT ou a GPx. A CAT é uma ferrihemoenzima, localizada nos peroxissomos, cuja principal função é converter H_2O_2 à água e oxigênio. A GPx é uma seleno-enzima que representa a principal defesa mitocondrial contra o H_2O_2 , já que essas organelas, em geral, não possuem a CAT. A ação da GPx é baseada na oxidação da GSH ao dissulfeto correspondente (glutathiona oxidada - GSSG) com consequente redução do H_2O_2 à água (Halliwell e Gutteridge, 2007).

De uma forma geral, o sistema de defesa antioxidante atua convertendo as espécies reativas (ER) em derivados inativos. Entretanto, em situações patológicas, pode ocorrer o aumento da produção de RL e/ou uma diminuição da capacidade do sistema antioxidante, gerando uma condição conhecida como estresse oxidativo. Entre as principais consequências do estresse oxidativo estão (Beckman e Ames, 1998; Ramos-Vasconcelos et al., 2000; Halliwell e Gutteridge, 2007):

- lipoperoxidação das membranas celulares, podendo alterar sua fluidez e permeabilidade;
- oxidação de proteínas, o que leva à alteração da atividade enzimática e mesmo à desnaturação,
- lesão ao DNA/RNA celular, podendo causar mutações que, por sua vez, levam ao aparecimento de doenças como câncer, Parkinson, entre outras.

1.7 ESTRESSE OXIDATIVO E MARCADORES INFLAMATÓRIOS EM MUCOPOLISSACARIDOSES

Muitos estudos demonstram o envolvimento do estresse oxidativo na patogênese dos EIM, sendo que o acúmulo de metabólitos tóxicos é apontado como o principal responsável pelo aumento de RL (Barschak et al., 2006; Deon et al., 2007; Sitta et al., 2009; Ribas et al., 2010).

Considerando a investigação de marcadores de estresse oxidativo em modelos animais de MPS, pode-se citar o estudo desenvolvido por Villani e colaboradores (2009), no qual experimentos foram realizados em camundongos MPS IIIB com 1, 3 e 6 meses de idade. Os resultados encontrados sugerem que, mesmo em estágio inicial da doença, o estresse oxidativo já está presente, pois no

primeiro mês de vida dos animais afetados observou-se aumento de peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e de DNA em tecido cerebelar.

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

Através da reação em cadeia da polimerase, Arfi e colaboradores (2011), compararam a expressão gênica em tecidos cerebrais de ratos MPS IIIA e controles, com foco nos genes relacionados à inflamação, ao estresse oxidativo e à apoptose. Como resultado, eles identificaram genes superexpressos no sistema nervoso central dos ratos afetados, refletindo um estado de deterioração neurológica. Neste estudo, também foi observado que os ratos MPS IIIA apresentavam uma razão extremamente baixa entre a GSH e a sua forma oxidada - GSSG - refletindo uma perturbação oxidativa no ambiente celular, visto que a GSH fornece a principal defesa celular contra o dano oxidativo. Ao se administrar AAS (ácido acetilsalicílico - anti-inflamatório não esteroideal) nos ratos MPS IIIA, verificou-se um aumento na razão de GSH/GSSG acompanhado de uma normalização da expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo e inflamação. Considerando que um fármaco anti-inflamatório se mostrou capaz de alterar marcadores oxidativos, fica evidenciada a relação entre estresse oxidativo e inflamação na fisiopatologia da MPS IIIA.

Existem poucos relatos na literatura que avaliam os marcadores de estresse oxidativo em humanos portadores de MPS. As MPS I e II, para as quais a TRE já foi aprovada pela ANVISA, são as mais estudadas, visto que o objetivo da maioria dos

trabalhos é avaliar o efeito protetor ou danoso desta terapia em relação aos marcadores de estresse oxidativo. Pereira e colaboradores (2008) verificaram altos níveis de peroxidação lipídica em pacientes MPS I e níveis normais de GSH, antes e após a TRE. Além disso, demonstraram que a TRE foi capaz de induzir algumas alterações na atividade de CAT e SOD em momentos específicos do tratamento. Contudo, essas alterações enzimáticas não foram suficientes para diminuir os níveis de lipoperoxidação, sugerindo um importante papel do estresse oxidativo na fisiopatologia da MPS I, mesmo durante o tratamento.

Em um estudo realizado com pacientes MPS II não tratados verificou-se dano oxidativo a proteínas (aumento de grupamentos carbonila e sulfidrilica reduzida), a lipídeos (aumento de malondialdeído - produto final de lipoperoxidação), aumento da atividade da CAT e diminuição do status antioxidante total. Durante a TRE os níveis de malondialdeído nestes pacientes reduziram significativamente e os grupamentos sulfidrilica apresentaram-se aumentados até o terceiro mês, sugerindo um possível envolvimento do estresse oxidativo na fisiopatologia da MPS II e o papel protetor da terapia (Filippon et al., 2011a). Além disso, a TRE foi capaz de diminuir o índice de dano ao DNA em pacientes MPS II, o qual se encontrava significativamente aumentado antes da terapia (Fillipon et al., 2011b). Neste mesmo trabalho foi possível inferir, através de correlações com outros parâmetros oxidativos, que o dano ao DNA encontrado em pacientes MPS II era de origem oxidativa. Ainda neste contexto, Negretto e colaboradores (2014a) demonstraram que pacientes MPS II sob TRE tiveram seus índices de lipoperoxidação e dano ao DNA diminuídos, assim como seus níveis de GAG. Estes dados sugerem que, provavelmente, o acúmulo de metabólitos lisossomais esteja relacionado com o estresse oxidativo apresentado por estes pacientes. Além disso, foi visto em fibroblastos de pacientes MPS VI que a perda da degradação e reciclagem de GAG resulta em um desequilíbrio da homeostase celular, reduz a funcionalidade dos lisossomos comprometendo a autofagia, causando acúmulo de proteínas poliubiquitinadas e de função mitocondrial, levando à produção excessiva de ERO (Tessitore et al., 2009).

O único relato na literatura relacionando MPS IVA e estresse oxidativo é um trabalho desenvolvido por Negretto e colaboradores (2014b) que investigou a atividade genotóxica da genisteína *in vitro*. A genisteína foi utilizada por ser uma opção de tratamento para pacientes MPS, uma vez que diminui os níveis dos GAG

acumulados. Entretanto, foi evidenciado neste trabalho que a genisteína causou dano ao DNA em leucócitos de pacientes MPS IVA, mesmo na menor concentração testada (10 μ M), mostrando-se necessária a realização de estudos *in vivo* para determinação da dose que não seja lesiva ao DNA.

No que concerne aos marcadores inflamatórios em MPS, grande parte dos relatos existentes foram realizados em modelos animais, sendo que em sua maioria, os trabalhos apontam como um dos responsáveis para o desencadeamento da inflamação o acúmulo de GAG. Simonaro e colaboradores (2001), utilizando condrócitos de ratos e gatos com MPS VI, demonstraram que o dermatan sulfato pode estar relacionado com o aumento da liberação de óxido nítrico e fator de necrose tumoral alfa (TNF_{α}) causando uma elevada taxa de morte celular. Wang e Roehrl (2002) mostraram que a administração de GAG em camundongos saudáveis induz artrite, tenossinovite, dermatite e infiltrado celular em vários tecidos conjuntivos. Neste trabalho eles discutem que a circulação ou liberação local de GAG é capaz de induzir a expansão clonal de várias células incluindo linfócitos T, B e macrófagos, indicando que os GAG alteram o sistema imune e causam inflamação crônica sistêmica (Wang e Roehrl, 2002). DiRosario e colaboradores (2009) estudaram o cérebro de ratos MPS IIIB e demonstraram uma significativa up-regulação de genes e moléculas relacionados à imunidade, incluindo células T, células B, complemento, imunoglobulinas, receptores *Toll-like*, moléculas essenciais à apresentação antigênica, citocinas, quimiocinas e várias outras moléculas pró-inflamatórias. Killedar e colaboradores (2010) verificaram que a transferência de linfócitos de camundongos MPS IIIB para camundongos normais causou neuroinflamação com expressão aumentada de citocinas pró-inflamatórias e infiltrado linfocitário. Em modelos animais de MPS VI e VII, foi verificado um processo de inflamação intracelular causado pelo acúmulo de GAG no lisossomo, o que poderia desencadear a liberação de citocinas, quimiocinas, proteases e óxido nítrico e culminar em apoptose e consequente destruição do tecido conectivo (Simonaro et al., 2008).

Em modelo animal de MPS IIIB, Di Domenico e colaboradores (2009) demonstraram, após seis meses de terapia gênica aplicada através de um vetor diretamente no cérebro de ratos adultos, a redução significativa da expressão de vários genes relacionados ao estresse oxidativo e inflamação, corroborando com a

hipótese de que ambos estejam envolvidos na patogênese da MPS IIIB. Ohmi e colaboradores (2003) apontaram a ativação da microglia, devido à liberação do conteúdo lisossomal, em ratos com MPS I e IIIB. A ativação da microglia aumenta os danos através da inflamação e/ou através da liberação de ERO. Essa é uma das possíveis explicações para o envolvimento e ocorrência de processos inflamatórios juntamente com danos oxidativos em diversas doenças. A correlação entre inflamação e estresse oxidativo foi evidenciada em um estudo com pacientes portadores de Fabry (outra DLD que não a MPS) sob TRE. Neste estudo foi verificado um aumento dos marcadores de dano oxidativo a biomoléculas, juntamente com elevação de interleucina 6 (IL-6) e de TNF_{α} nos pacientes tratados quando comparados com o grupo controle. Além disso, foi demonstrada correlação positiva significativa entre os níveis plasmáticos de IL-6 e níveis urinários de di-tirosina, um marcador de dano oxidativo a proteínas (Biancini et al., 2012).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Considerando o grande número de evidências na literatura sobre a relação entre o estresse oxidativo e a inflamação nas MPS e a ausência de relatos utilizando pacientes com MPS IVA, o objetivo geral deste trabalho foi investigar os parâmetros de estresse oxidativo e inflamação em pacientes com MPS IVA submetidos à TRE, com o intuito de melhor compreender a fisiopatologia da MPS IVA e o efeito da TRE nos marcadores de estresse oxidativo e inflamação.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar as defesas antioxidantes enzimáticas (através da medida da atividade das enzimas SOD e GPx) e não enzimáticas (através da quantificação de GSH) em eritrócitos;
- b) Avaliar o dano oxidativo a lipídeos (através da quantificação de isoprostanos na urina) e proteínas (através da quantificação de grupamentos sulfidrilas em plasma e de di-tirosina na urina);
- c) Avaliar o dano ao DNA, pelo ensaio cometa em sangue total (valor basal e com o acréscimo da enzima Endonuclease III – Endo III) e pela determinação da 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) na urina;
- d) Quantificar os GAG na urina;
- e) Quantificar a citocina pró-inflamatória IL-6 no plasma;
- f) Correlacionar os biomarcadores oxidativos, inflamatórios e GAG entre si.

3. RESULTADOS

Os resultados dessa dissertação serão apresentados na forma de capítulo/artigo científico.

3.1 CAPÍTULO 1- ARTIGO 1: *Oxidative stress and inflammation in Mucopolysaccharidosis type IVA patients treated with enzyme replacement therapy.*

Artigo científico publicado no periódico *BBA - Molecular Basis of Disease*.



Oxidative stress and inflammation in mucopolysaccharidosis type IVA patients treated with enzyme replacement therapy



Bruna Donida^{a,d,*}, Desirée P. Marchetti^{b,d}, Giovana B. Biancini^{b,d}, Marion Deon^{a,d}, Paula R. Manini^c, Helen T. da Rosa^c, Dinara J. Moura^c, Jenifer Saffi^c, Fernanda Bender^d, Maira G. Burin^d, Adriana S. Coitinho^e, Roberto Giugliani^{d,f}, Carmen Regla Vargas^{a,b,d,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Av. Ipiranga, 2752, CEP 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Bioquímica, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos, 2600, CEP 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

^c Laboratório de Genética Toxicológica, Universidade Federal de Ciências de Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Rua Sarmento Leite, 245, CEP 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil

^d Serviço de Genética Médica, HCPA, Rua Ramiro Barcelos, 2350, CEP 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

^e Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Instituto de Ciências Básicas e da Saúde, Rua Sarmento Leite, 500, CEP 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil

^f Departamento de Genética, e Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Instituto de Biociências, UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 9500, CEP 90650-001 Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 December 2014

Received in revised form 9 February 2015

Accepted 11 February 2015

Available online 19 February 2015

Keywords:

Mucopolysaccharidosis type IVA

Morquio A Syndrome

Oxidative stress

Glycosaminoglycan

Inflammation

ABSTRACT

Mucopolysaccharidosis type IVA (MPS IVA) is an inborn error of glycosaminoglycan (GAG) catabolism due to the deficient activity of N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase that leads to accumulation of the keratan sulfate and chondroitin 6-sulfate in body fluids and in lysosomes. The pathophysiology of this lysosomal storage disorder is not completely understood. The aim of this study was to investigate oxidative stress parameters, pro-inflammatory cytokine and GAG levels in MPS IVA patients. We analyzed urine and blood samples from patients under ERT ($n = 17$) and healthy age-matched controls ($n = 10-15$). Patients presented a reduction of antioxidant defense levels, assessed by a decrease in glutathione content and by an increase in superoxide dismutase activity in erythrocytes. Concerning lipid and protein damage, it was verified increased urine isoprostanes and di-tyrosine levels and decreased plasma sulfhydryl groups in MPS IVA patients compared to controls. MPS IVA patients showed higher DNA damage than control group and this damage had an oxidative origin in both pyrimidine and purine bases. Interleukin 6 was increased in patients and presented an inverse correlation with GSH levels, showing a possible link between inflammation and oxidative stress in MPS IVA disease. The data presented suggest that pro-inflammatory and pro-oxidant states occur in MPS IVA patients even under ERT. Taking these results into account, supplementation of antioxidants in combination with ERT can be a tentative therapeutic approach with the purpose of improving the patient's quality of life. To the best of our knowledge, this is the first study relating MPS IVA patients with oxidative stress.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Mucopolysaccharidoses (MPSs) are a heterogeneous group of inherited lysosomal storage disorders (LSDs) caused by deficiency of the enzymes involved in the degradation of glycosaminoglycans (GAGs). MPSs are classified into 11 syndromes according to the specific

deficient enzyme [1]. MPS IVA (or Morquio A Syndrome) is a rare disorder with an incidence in the general population estimated in 1:201,000 [2]. However, this incidence ranges among different populations from 1 in 76,000 live births in Northern Ireland to 1 in 640,000 live births in Western Australia [2]. This disorder is caused by a defect on N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase enzyme (GALNS; E.C.3.1.6.4),

Abbreviations: 8-OHdG, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine; CAT, catalase; Cr, creatinine; DI, damage index; Di-Tyr, di-tyrosine; DMB, 1,9-dimethylmethylene blue; DTNB, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid); Endo III, endonuclease III; ELISA, enzyme-linked immunoassay; ERT, enzyme replacement therapy; FU, fluorescence units; GAGs, glycosaminoglycans; GALNS, N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase; GPx, glutathione peroxidase; GR, glutathione reductase; GSH, reduced glutathione; GSSG, glutathione oxidized; H₂O₂, hydrogen peroxide; IEM, inborn errors of metabolism; IL-6, interleukin 6; LSDs, lysosomal storage diseases; MDA, malondialdehyde; MPS, mucopolysaccharidoses; OH·, hydroxyl radical; RNA, ribonucleic acid; SEM, standard error of the mean; SOD, superoxide dismutase; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances; TNB, tionitrobenzoic acid

* Corresponding authors at: Serviço de Genética Médica, HCPA, Rua Ramiro Barcelos, 2350, CEP 90.035-003 Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 33598011; fax: +55 51 33598010.

E-mail addresses: donida.bruna@gmail.com (B. Donida), desireepmarchetti@gmail.com (D.P. Marchetti), giovana.bb@gmail.com (G.B. Biancini), marion_deon@yahoo.com.br (M. Deon), maninipaula@gmail.com (P.R. Manini), htdarosa@gmail.com (H.T. da Rosa), dinjamoura@gmail.com (D.J. Moura), jenifer.saffi@gmail.com (J. Saffi),

bender.femanda@gmail.com (F. Bender), mburin@hcpa.ufrgs.br (M.G. Burin), acoitinho@yahoo.com.br (A.S. Coitinho), rgiugliani@hcpa.ufrgs.br (R. Giugliani), crvargas@hcpa.ufrgs.br (C.R. Vargas).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.02.004>

0925-4439/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

responsible for chondroitin 6-sulfate and keratan sulfate degradation. The GALNS enzyme deficiency leads to the accumulation of GAGs and subsequent cellular damage, mainly in connective tissues where keratan sulfate is abundant, specially cartilage, cornea and heart valve [3,4]. The main clinical manifestations of MPS IVA patients are: skeletal dysplasia, restricted growth and short stature, joint hypermobility, valvular heart disease, pulmonary disease, corneal clouding, hearing loss, and poorly formed teeth [5]. It was already described about 277 mutations in the *GALNS* gene, and this extensive allelic heterogeneity is consistent with the broad spectrum of phenotypes observed in MPS IVA [6,7]. The characteristic signs and symptoms of this disease appear at around two or three years of age. Phenotypic spectrum may range from a more attenuated phenotype, with patients reaching the age of 70 years, to a more severe phenotype, where patients survive no more than 20–30 years [5,8–10]. MPS IVA patients have no neurological impairment, differently of many other MPSs and inborn errors of metabolism (IEM) [11].

Diagnosis of MPS IVA is typically based on clinical examination, skeletal radiographs, evaluation of the pattern of urinary GAGs and measurement of the enzymatic activity of GALNS in white blood cells or fibroblasts [5,10,12]. Until recently, there was no effective therapy for MPS IVA and treatment was palliative, focusing on management of the multiple clinical symptoms [10,13]. The recent introduction of ERT with recombinant human enzyme (elosulfase alfa), however, has raised the possibility that the burden of GAGs storage can be reduced and that the progressive tissue and organ damage associated with MPS IVA can be slowed or even prevented. In a recent study, MPS IVA patients undergoing ERT showed improvements in 6-minute-walk test and a decrease in keratan sulfate levels [14].

Oxidative stress may play an important role in the pathophysiology of some IEM. Even though this relationship is not well elucidated, the accumulation of toxic metabolites is considered the main responsible for the increased generation of reactive species, which can react with lipids, proteins, DNA and RNA [15–18]. Most studies linking oxidative stress and MPS were performed in animal models. In this context, we can mention the study developed by Villani et al. [19] that showed the presence of oxidative stress even in the early stages of MPS IIIB, and another work demonstrating an oxidative imbalance in an animal model of MPS I [20]. Furthermore, a possible link between inflammation and oxidative stress in MPS IIIA mice was reported by Arfi et al. [21]. In animal models of MPS VI and VII, it was verified an inflammation process caused by intralysosomal accumulation of GAGs, which could trigger the release of cytokines, chemokines, proteases and nitric oxide, culminating in apoptosis and consequent destruction of connective tissue [22]. Ohmi et al. [23] showed microglia activation in mouse models of MPS I and IIIB, and this activation is one possible explanation for the involvement and occurrence of inflammatory processes along with oxidative damage in various diseases. In mice with MPS IIIB, Di Domenico et al. [24] demonstrated a significant reduction in the expression of several genes related to oxidative stress and inflammation, after six months of gene therapy, corroborating with the hypothesis that both processes are involved in the pathogenesis of MPS IIIB.

With regard to research in patients, there are few reports relating MPS with oxidative stress and inflammation. Pereira et al. [25] found high lipid peroxidation levels in MPS I patients. Moreover, they showed that ERT was able to induce an increase of catalase (CAT) and a decrease of superoxide dismutase (SOD) activities at specific times of treatment. However, these enzymatic changes were not sufficient to reduce lipid peroxidation levels, suggesting an important role of oxidative stress in the pathophysiology of MPS I, even during treatment. In a study with MPS II patients, it was observed oxidative damage to proteins and lipids, as well as increased CAT activity and decreased total antioxidant status before treatment when compared to controls. In these patients, until the third month of the ERT, there was a decrease in lipid peroxidation levels and in protein damage, suggesting a possible involvement of oxidative stress in the pathophysiology of MPS II and a protective role of therapy

[26]. In addition, ERT was capable to decrease DNA damage [27] and also GAG levels in MPS II patients [28], what suggests that the decrease of metabolites accumulation probably may be related to the improvement of oxidative stress parameters. Nevertheless, patients with Fabry disease, another type of LSD, under ERT, presented high levels of oxidative damage to proteins and lipids, accompanied by low antioxidant defenses and high pro-inflammatory cytokines [29]. This study also showed, in treated Fabry patients, a positive correlation between oxidative stress, inflammation and the metabolites accumulated in this disease.

Considering the involvement of oxidative stress and inflammation in other MPSs and the lack of reports in this issue in MPS IVA, the aim of this study was to evaluate oxidative damage to biomolecules, antioxidant defenses, pro-inflammatory cytokine and GAG levels in patients with Morquio A disease.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

For this study it was collected blood and occasional urine samples from 17 MPS IVA patients with ages varying between 6 and 36 years (15.3 ± 8.9 years old, mean \pm standard deviation). For the control group we collected blood from 14 healthy individuals with ages ranging between 10 and 28 years (24.0 ± 4.8 years old, mean \pm standard deviation) and for comet assay from 10 healthy individuals with ages varying between 19 and 23 years (20.8 ± 1.5 years old, mean \pm standard deviation). Urine was collected from 15 healthy individuals with ages between 7 and 32 years (19.7 ± 7.9 years old, mean \pm standard deviation). All MPS IVA patients were receiving ERT treatment (elosulfase alfa–Vimizim® 2 mg/kg) every week by intravenous infusion, for about 32 weeks. At the moment of diagnosis, patients presented the classic symptoms, usually including short stature, skeletal deformities (pectus carinatum and genu valgum almost always present), limited ambulation, restrictive airway disease, heart valves problems and corneal clouding. Patients' data were described in Table 1. Diagnosis was confirmed by evaluation of GAGs in urine (increased total content and presence of increased amounts of keratan sulfate) and measurement of GALNS in leucocytes (deficient activity) [10,30].

Informed consent was obtained from all participants. The study was approved (number 13-0246) by The Ethics Committee of the *Hospital de Clínicas de Porto Alegre* (HCPA), RS, Brazil.

2.2. Sample collection and preparation

Occasional urine and heparinized blood samples were obtained from patients immediately before the session of ERT. Urine samples were collected in sterile flask, aliquoted and frozen at -80 °C until analysis. Samples were obtained from controls concomitantly. Whole blood was centrifuged at $1000 \times g$ for 10 min and plasma was removed by aspiration, aliquoted and frozen at -80 °C until biochemical determinations. An aliquot of whole blood was separated for comet assay. Erythrocytes were washed three times with cold saline solution (0.153 mol/L sodium chloride) and the lysates were prepared by addition of 1 mL of distilled water to 100 μ L of washed erythrocytes. The lysates were frozen at -80 °C until determination of GSH and antioxidant enzymes activities. For these determinations, the supernatant (after centrifugation at $13,500 \times g$ for 10 min) was diluted in order to contain approximately 0.5 mg/mL of protein.

2.3. Reduced glutathione (GSH) content in erythrocytes

In order to measure GSH levels, the main intracellular antioxidant, lysates of erythrocytes were processed as described by Browne and Armstrong [31] and the fluorescence measured ($\lambda_{excitation} = 350$ nm,

Table 1
Data of studied MPS IVA patients.

Patient	Age (years)	Gender	Race and ethnicity	Height (cm)	Weight (kg)
1	34.4	Female	White-Hispanic/Latin	100	21.75
2	8.5	Male	White-Hispanic/Latin	91.1	16.60
3	36.3	Female	White-Hispanic/Latin	97.9	20.45
4	10.6	Female	White-Hispanic/Latin	84.9	14.45
5	13.4	Male	Mulatto-Hispanic/Latin	87.5	15.10
6	12.5	Male	White-Hispanic/Latin	84.3	17.30
7	10.6	Female	White-Hispanic/Latin	110	15.05
8	12.8	Female	Mulatto-Hispanic/Latin	107	27.85
9	9.5	Male	White-Hispanic/Latin	97.2	17.30
10	16.3	Male	White-Hispanic/Latin	107.6	31.10
11	6.7	Female	White-Hispanic/Latin	90.3	14.30
12	14.4	Male	Black-Hispanic/Latin	96.4	21.00
13	9.5	Female	Black-Hispanic/Latin	90.9	13.60
14	13.4	Female	Mulatto-Hispanic/Latin	101.4	25.55
15	17.4	Male	White-Hispanic/Latin	112	29.45
16	6.7	Male	White-Hispanic/Latin	96.2	16.75
17	26.9	Female	White-Hispanic/Latin	89.6	24.3

emission = 420 nm) was compared to a calibration curve prepared with GSH solutions. Results were expressed as nmol/mg protein.

2.4. Erythrocyte superoxide dismutase (SOD) activity

SOD activity was measured using the RANSOD® kit (Randox Lab, Antrim, United Kingdom). The method is based on the formation of red formazan from the reaction of 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride and superoxide radical, which is produced by the incubation with the xanthine-xanthine oxidase reaction system. The absorbance of the product is measured spectrophotometrically at 505 nm. One unit of SOD corresponds to a 50% inhibition of red formazan formation. The specific activity of SOD was expressed as U/mg protein.

2.5. Erythrocyte glutathione peroxidase (GPx) activity

Erythrocyte GPx activity was measured by using a commercially available kit (RANSEL®; Randox Lab). GPx catalyses the oxidation of glutathione (GSH) to GSSG (oxidized glutathione). In the presence of glutathione reductase (GR) and NADPH, the oxidized GSSG is converted to the reduced form with a concomitant oxidation of NADPH to NADP. The decrease in absorbance after 1 and 2 min at 340 nm was measured and results were expressed in U/mg protein.

2.6. Urine 15-F2t-isoprostane levels

15-F2t-isoprostane, a product of arachidonic acid metabolism and a biomarker of lipid peroxidation, was measured by a competitive enzyme-linked immunoassay (ELISA) (Oxford Biomed, EA 85), according to the kit's instructions. First, the urine samples were mixed with dilution buffer. In this assay, the 15-F2t-isoprostane in the urine samples competes with the 15-F2t-isoprostane conjugated to horseradish peroxidase for the binding to a specific antibody fixed on the microplate. The concentration of 15-F2t-isoprostane was determined spectrophotometrically at 630 nm by the intensity of color developed after the addition of substrate. Results were expressed as picograms of isoprostanes per mg of urinary creatinine (pg/mg Cr).

2.7. Urine di-tyrosine (di-Tyr) levels

In order to determine the levels of protein oxidation in urine, the intensity of di-Tyr fluorescence was measured according to the method described by Kirschbaum [32]. For Di-tyr fluorescence determination, 50 µL of thawed urine was added to 950 µL of 6 mol/L urea in 20 mmol/L sodium phosphate buffer pH 7.4. After 30 min, the concentration was measured using a fluorometer (excitation 315 nm, emission

410 nm). Results were expressed as fluorescence units per mg urine creatinine (FU/mg Cr).

2.8. Total plasmatic level of sulfhydryl groups

The plasmatic concentration of sulfhydryl groups was determined as described by Aksekov and Markesbery [33]. The method is based on the reduction of 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) by sulfhydryl groups into a yellow derivative (TNB) whose absorption is measured spectrophotometrically at 412 nm. The sulfhydryl content is inversely correlated to oxidative damage to proteins. Results were reported as µmol TNB/mg protein.

2.9. Alkaline comet assay in leukocytes

The alkaline comet assay, that measures single and double DNA strand breaks, was performed as described by Singh et al. [34] in accordance with general guidelines for use of the comet assay [35]. Aliquots of 100 µL from whole blood were suspended in agarose and spread into a glass microscope slide pre-coated with agarose. Slides were placed in ice-cold lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris pH 10.0–10.5 with 10% DMSO and 1% Triton X-100) to remove cell proteins and leaving DNA as “nucleoids”. After the lysis-buffer procedure, the slides were covered with fresh buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH > 13) for 15 min to allow DNA unwinding and then, electrophoresis was performed for 15 min (25 V; 300 mA; 0.9 V/cm). Slides were neutralized with 0.4 M Tris (pH 7.5), washed in bi-distilled water and stained using silver nitrate staining protocol [36]. After drying at room temperature overnight, the samples were analyzed using an optical microscope. One hundred cells (50 cells from each of the two replicate slides) were selected and analyzed. Cells were visually scored according to tail length and received scores from 0 (no migration) to 4 (maximal migration). Therefore, the damage index (DI) was calculated, ranged from 0 (completely undamaged: 100 cells × 0) to 400 (with maximum damage: 100 cells × 4) [35,37]. The slides were analyzed under blind conditions at least by two different individuals.

A digestion step with a bacterial repair enzyme was included in the alkaline comet assay before electrophoresis, in accordance to Dizdaroğlu et al. [38]. The enzyme used was endonuclease III (Endo III, also known as Nth) which converts oxidized pyrimidines (including thymine glycol and uracil glycol) to strand breaks. It was obtained from New England Biolabs (NEB, Ipswich, MA). After lysis, each slide was washed for 5 min in an enzyme buffer (40 mM HEPES-KOH, 1 M KCl, 5 mM EDTA, 2.5 mg/mL bovine serum albumin fraction V-BSA, and pH 8.0). The suspension was added to the slide, covered with coverslip, and incubated for 45 at 37 °C. Subsequent steps were the same as in the alkaline version of comet assay. DNA damage with Endo III was calculated as the score obtained with enzyme minus the score without enzyme (basal).

2.10. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) levels

Urinary 8-OHdG levels, a product of DNA oxidative damage due to the hydroxyl radical attack at the C8 position of deoxyguanosine, were determined by Highly Sensitive 8-OHdG Check ELISA kit (JaICA, Fukuroi, Japan). The 8-OHdG Check ELISA kit is a competitive *in vitro* enzyme-linked immunosorbent assay for quantitative measurement of the oxidative DNA adduct 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine. This assay employs a microplate with 96 wells pre-coated with 8-OHdG, a monoclonal antibody specific for 8-OHdG (primary antibody), an HPR-conjugated antibody (secondary antibody) and colorimetric substrate detection whose absorbance was measured in an ELISA microwell reader at 450 nm. The samples 8-OHdG concentrations (ng/mL) were calculated using a polynomial equation from the relative absorbance of standard curve. After creatinine correction, the results were expressed as ng/mg Cr.

2.11. Pro-inflammatory cytokine Interleukin 6 (IL-6)

Plasma IL-6 was measured by commercial kit Human IL-6 ELISA^{PRO} (Mabtech AB, Sweden). The assay utilizes ELISA strip plates pre-coated with a capture monoclonal antibody (mAb), to which samples were added. Captured cytokine was detected by adding a biotinylated mAb followed by streptavidin–horseradish peroxidase. The addition of the enzyme substrate TMB results in a colored substrate product. The color intensity is directly proportional to the concentration of cytokine in the sample, which is determined by comparison with a serial dilution of recombinant cytokine standard analyzed in parallel. The results were expressed as pg/mL.

2.12. Urinary glycosaminoglycans (GAGs)

The measurement of urinary GAGs was performed according to the technique described by de Jong et al. [30]. The technique principle is based on formation of a complex between sulfated GAGs present in urine with stain 1,9-dimethylmethylene blue (DMB). This complex can be detected in a spectrophotometer at 520 nm. The results were expressed in μg GAGs/mg Cr.

2.13. Urinary creatinine (Cr)

Creatinine was determined using *Creatinine K* kit of Labtest® (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brazil), by reaction with picric acid under alkaline conditions, producing an orange color whose absorbance was determined in a spectrophotometer at 492 nm. Results were expressed as mg Cr/dL.

2.14. Protein determination

Plasma and erythrocyte protein concentrations were determined, respectively, by Biuret method – using the commercial kit of Labtest® (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brazil) – and by the method of Lowry et al. [39].

2.15. Statistical analysis

All results were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Normal distribution was tested by the Shapiro–Wilk test. Logarithmic (log) transformation was done in data not normally distributed in order to transform them in parametric. Unpaired Student's *t* test was used for all comparisons between the two groups. Correlations between parameters were performed by Pearson's correlation test. Differences were considered significant when $p < 0.05$. Analyses were performed by using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Inc., Chicago, IL, USA – SPSS version 19.0) software, and graphics were constructed in GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA – version 5.0) software.

3. Results

3.1. Antioxidant defenses

The concentration of erythrocyte GSH, the main non-enzymatic antioxidant in cells, was significantly reduced in MPS IVA patients (0.060 ± 0.004 nmol/mg protein) when compared to control group (0.079 ± 0.006 nmol/mg protein) ($p < 0.05$) (Fig. 1A). The SOD activity was significantly increased in patients (5.75 ± 0.31 U/mg protein) when compared to controls (4.45 ± 0.38 U/mg protein) ($p < 0.05$) (Fig. 1B), while there was no significant difference in GPx activity between patients (0.11 ± 0.006 U/mg protein) and controls (0.099 ± 0.006 U/mg protein) ($p > 0.05$) (Fig. 1C). All data were expressed as the mean \pm SEM.

3.2. Oxidative damage to biomolecules

Results showed that MPS IVA patients had increased levels of oxidative damage to lipids [urine isoprostanes levels (1233.6 ± 66.6 pg/mg Cr) (Fig. 2A)] ($p < 0.05$), proteins [urine di-Tyr ($16,523.6 \pm 917.4$ FU/mg Cr) (Fig. 2B) and plasma sulfhydryl groups (30.37 ± 0.86 μmol TNB/mg protein) (Fig. 2C)] ($p < 0.01$) when compared to controls (926 ± 93 pg/mg Cr; $11,586.3 \pm 1336.4$ FU/mg Cr, 41.22 ± 0.88 μmol TNB/mg protein, respectively). In addition, MPS IVA patients showed significant increase in basal DNA damage (98.63 ± 5.07 arbitrary units) when compared to controls (31.5 ± 3.79 arbitrary units) ($p < 0.01$) (Fig. 2D). After Endo III enzyme treatment (that indicates pyrimidines bases damage), MPS IVA patients also showed an increased DNA damage (75.38 ± 5.84 in patients versus 30.67 ± 9.58 arbitrary units in controls) ($p < 0.01$) (Fig. 2E). The urinary excretion of 8-OHdG (biomarker of purine bases oxidative damage) was significantly higher in patients (9.25 ± 0.82 ng/mg Cr) when compared to controls (6.1 ± 0.54 ng/mg Cr) ($p < 0.05$) (Fig. 2F). All data were expressed as the mean \pm SEM.

3.3. Pro-inflammatory cytokine

The plasmatic IL-6 (Fig. 3) was increased in MPS IVA patients (30.99 ± 4.53 pg/ml) when compared to controls (11.5 ± 0.33 pg/ml) ($p < 0.01$). The data were expressed as the mean \pm SEM.

3.4. Correlation between oxidative stress and pro-inflammatory cytokine

Erythrocytes GSH levels were inversely correlated with the plasma IL-6 levels (Fig. 4) in MPS IVA patients ($r = -0.848$ $p < 0.05$).

3.5. GAG levels

Results showed that MPS IVA patients presented significant higher levels of urinary GAGs (2 ± 0.02 μg /mg Cr) when compared to controls (1.57 ± 0.07 μg /mg Cr) ($p < 0.01$), despite they are receiving weekly ERT for about 8 months (Fig. 5). The data were expressed as the mean \pm SEM and the values were reported in logarithmic scale.

4. Discussion

The primary biological consequence in LSDs is the increase in size and number of the lysosomes, in an attempt to retain the growing concentration of undegraded macromolecules, due to enzymatic deficiency. However, the biochemical and cellular mechanisms by which this intralysosomal accumulation leads to cell and tissue dysfunction remain not completely clear [40]. Reactive species are formed and degraded during normal aerobic metabolism in cells at physiological concentrations and are required for the proper functioning of the body. However, uncontrolled production of reactive species results in oxidative damage to biomolecules, altering their function and even causing diseases [41].

The involvement of reactive species is described in more than a hundred human diseases, including some IEM [15–18,26–28,42]. Although the relation between oxidative stress and IEM pathophysiology is not well elucidated, the accumulation of toxic metabolites is appointed as the main reason for the increase of free radicals formation [15–18]. Despite the fact that many studies relating oxidative damage to IEM exist, there are few studies on LSDs, especially MPS. It is known that in this diseases group, the imbalance between formation and removal of reactive species might be even more important due to the lysosomal overload [20,25]. Lysosomes are very susceptible to oxidative stress and destabilization of its membranes can result in release of hydrolases and metabolites accumulated in cytosol causing apoptosis or necrosis. Furthermore, the liberation of lysosomal contents can induce mitochondrial damage with secondary enhanced production of superoxide radicals (O_2^-) and hydrogen peroxide (H_2O_2), suggesting that lysosomal

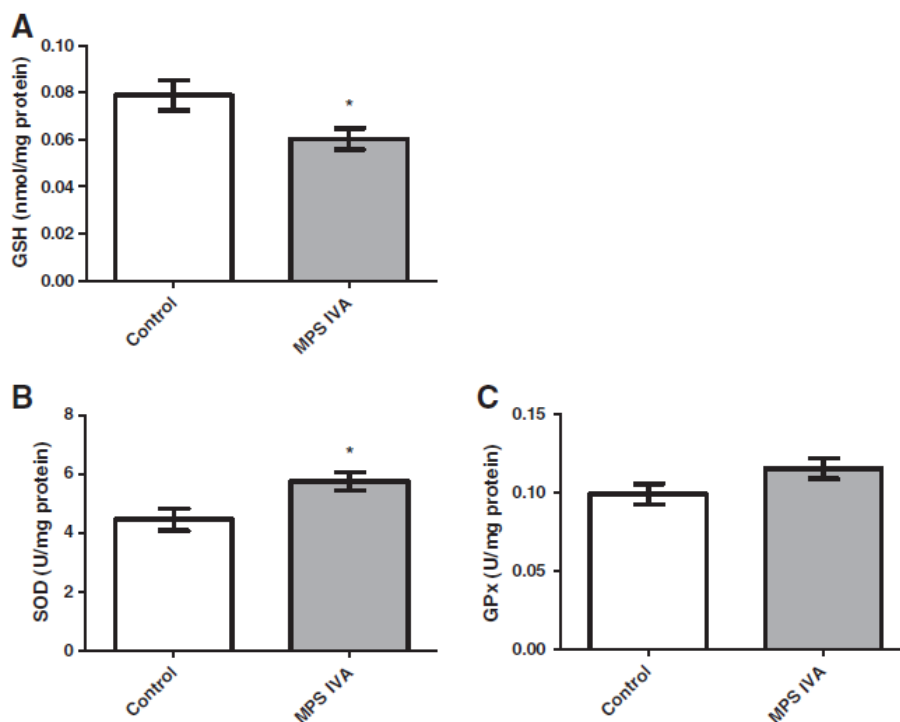


Fig. 1. Antioxidant defenses [reduced glutathione in erythrocytes—GSH (A), superoxide dismutase in erythrocytes—SOD (B), glutathione peroxidase in erythrocytes—GPx (C)] in MPS IVA patients under ERT ($n = 10$ –11) and controls ($n = 10$ –13). Data represent mean \pm SEM. * $p < 0.05$ (Student's t test for unpaired samples) compared to the control group.

damage seems to cause further oxidative stress amplifying loop process [43–46].

Recent studies of our group showed evidence that oxidative stress may be involved in the pathophysiology of MPS II, and that ERT protected against lipid, protein and DNA damage in these patients [26, 27]. Furthermore, another study carried out by our group verified that patients with Fabry disease presented oxidative damage to proteins and lipids, low antioxidant defenses and high pro-inflammatory cytokine levels, even under ERT [29].

Considering this scenario, the aim of this study was to evaluate oxidative stress parameters and inflammation biomarkers in MPS IVA patients under ERT in order to better understand the mechanisms related to the pathophysiology of this complex syndrome.

It is widely established that several reactive oxygen species react with membrane lipids (altering cell membrane fluidity), proteins (giving rise to carbonyl group formation into side-chains, reducing sulfhydryl groups of susceptible amino acids) and DNA (for example causing mutations) [41,47]. In our study we found decreased levels of antioxidant defenses (erythrocyte GSH content) in MPS IVA patients when compared to controls. The low GSH content implies a higher susceptibility to oxidative damage because GSH is the most important non-enzymatic antioxidant, being preferentially oxidized by reactive species and then preserving more important biomolecules [48]. On the other hand, we observed high SOD activity in MPS IVA patients, showing, probably, a response of the body to the increase of reactive species. However, the high SOD activity is not accompanied by an increase of GPx activity, which would be required for the degradation of H_2O_2 formed by the reaction of SOD. Thus, the H_2O_2 remains free and, by Fenton reaction in the presence of Fe^{2+} , yields the highly toxic hydroxyl radical (OH^\bullet). This radical attacks all types of biomolecules around it, being extremely dangerous to the cell [48]. Then, increased activity of SOD could be deleterious and the balance between SOD and the peroxide-removing enzymes like GPx may imply on redox status [49]. Hence, the low GSH content and the high SOD activity presented by MPS IVA patients probably contribute to the oxidative stress process. Confirming our results, an increase of SOD activity in different organs

was already verified in animal models of MPS I and, probably, contributed to oxidative imbalance found in this model [20]. Regarding GSH, Arfi et al. [21] verified a strongly lower ratio of GSH over the oxidized derivative (GSSG) in MPS IIIA mouse model when compared to normal controls. Furthermore, aspirin treatment completely normalizes GSH values, indicating a possible link between inflammation and oxidative stress in this disease [21].

With respect to oxidative damage in biomolecules, we found increased urine isoprostane levels in MPS IVA patients when compared to controls. Isoprostanes are products derived from the free radical-catalyzed peroxidation of arachidonic acid, independent of the cyclooxygenase enzyme. The continued oxidation and fragmentation of fatty acid side chains can produce aldehydes like isoprostanes, malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxynonenal (formed from peroxidation of linolenic, arachidonic or docosahexaenoic acids). These aldehydes may cause rupture of lysosomal (and other organelles) membrane and can bind to membrane proteins, inactivating enzymes and receptors and even attack DNA, forming mutagenic lesions [48,50]. Thus, the increased isoprostane levels verified in MPS IVA patients could be a result of the lysosome destabilization and also may be acting in the maintenance of chain reactions with other molecules. Corroborating with these findings, MPS I patients under ERT also showed damage to lipids, measured by increased TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) levels [25]. However, MPS II patients under ERT presented decrease of MDA when compared to patients without treatment [26].

In this study, we also observed increased levels of di-Tyr in urine and decreased levels of sulfhydryl groups in plasma of MPS IVA patients when compared to controls. Sulfhydryl groups can be reversibly oxidized by reactive species, suggesting that they represent a potential antioxidant, acting in cellular defense against oxidative stress [49]. Since two-thirds of sulfhydryl groups are bonded to proteins, a reduction of these groups also characterizes a protein oxidation [51–53]. The increase of urine di-Tyr levels reinforces protein oxidation found in MPS IVA patients, since di-Tyr is formed by the oxidation of adjacent protein tyrosine residues leading to the formation of a highly stable inter-phenolic bond that does not undergo further metabolism [54].

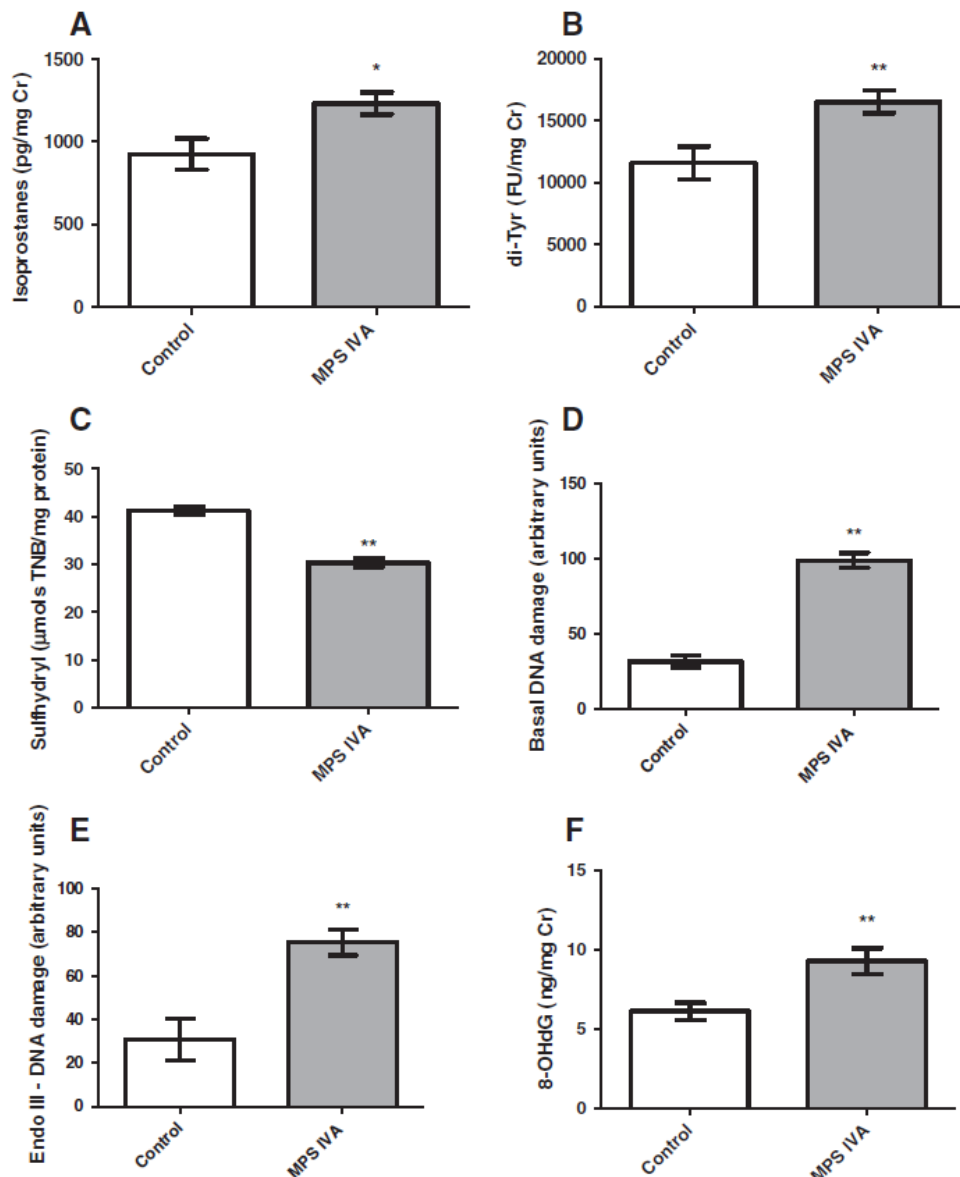


Fig. 2. Damage to lipids [isoprostanes in urine (A)], proteins [di-tyrosine in urine—di-Tyr (B)], sulfhydryl groups in plasma—SH (C) and DNA [basal DNA damage in leukocytes (D); DNA damage with Endo III in leukocytes (E); 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in urine—8-OHdG (G)] in MPS IVA patients under ERT ($n = 7-13$) and controls ($n = 6-13$). Data represent mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Student's t test for unpaired samples) compared to the control group.

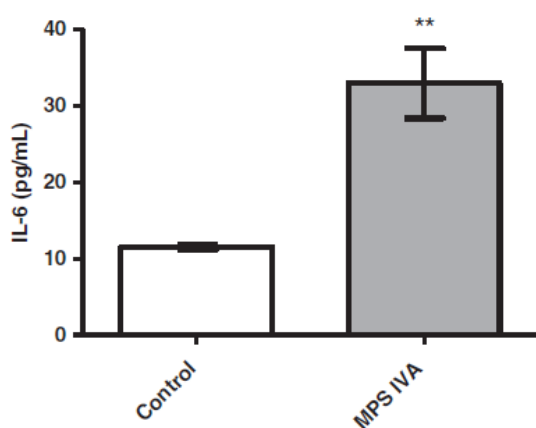


Fig. 3. Pro-inflammatory cytokine interleukin 6 (IL-6) in plasma of MPS IVA patients under ERT ($n = 10$) and controls ($n = 12$). Data represent mean \pm SEM. ** $p < 0.01$ (Student's t test for unpaired samples) compared to the control group.

Oxidative damage to proteins was also observed in animal models of MPS I [20] and in MPS II patients [26]. During the first three months of treatment, the ERT therapy was able to increase sulfhydryl levels. However, after three months, the sulfhydryl groups returned to the values presented before treatment [26].

DNA damage has been associated with various pathologies, including some IEM [17,27,55]. In this work, we investigated DNA damage in MPS IVA patients under ERT by comet assay (single-cell electrophoresis), which is a widely used method, extremely sensitive for DNA damage, inexpensive and quick [56]. In order to investigate the mechanisms underlying DNA damage, we assessed DNA repair using Endo III enzyme which recognizes oxidized pyrimidines bases and converts them into breaks reflected in comet tail [57]. Our results showed higher DNA damage levels in MPS IVA patients when compared to control group and this damage has an oxidative origin in pyrimidines bases. DNA damage was also observed in a study with MPS II patients and in this study ERT was able to decrease, but not reverse the levels of DNA damage [27]. For a more accurate comparison with the data reported by Filippon et al. [27] an investigation of this parameter in MPS IVA patients at diagnosis

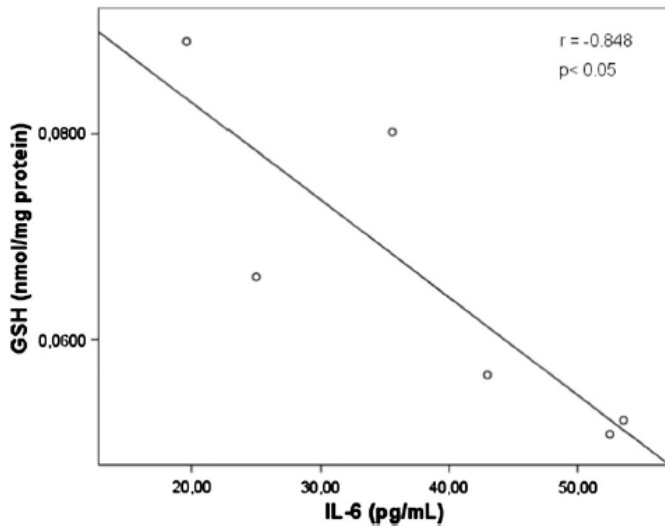


Fig. 4. Correlation between GSH in erythrocytes and IL-6 in plasma of MPS IVA patients under ERT (Pearson's correlation).

is necessary. The product of guanosine oxidation (purine base), 8-OHdG, is formed by attack of reactive oxygen species in nuclear and mitochondrial DNA [41]. The oxidized DNA is continuously repaired and the injured nucleoside is excreted into the bloodstream and urine [58]. Phenylketonuric patients with uncontrolled diet, presented high 8-OHdG levels in serum and this oxidative damage to DNA may be induced by the high phenylalanine levels and the low total antioxidant status verified in the plasma of these patients [59]. Our results are in agreement with the above findings, since MPS IVA patients had higher urinary excretion of 8-OHdG than control group. Combining this result to those obtained by enzymatic comet assay, we can presume that the MPS IVA patients exhibit oxidative damage to purine and pyrimidine bases.

In order to investigate the mechanisms underlying inflammation, we assessed IL-6 inflammatory cytokine. MPS IVA patients showed increased plasma IL-6 levels compared to controls. This result provides evidence that the pro-inflammatory state occurs in these patients. There are few studies about inflammatory mediators in MPSs and most of them were performed in animal models. These studies indicated a high expression of inflammatory molecules and cytokines secondary to the accumulation of GAGs in MPS IIIB, VI and VII [19,22,60]. In our work, we also observed an inverse correlation between GSH and IL-6. These data may suggest that the inflammatory process is associated to

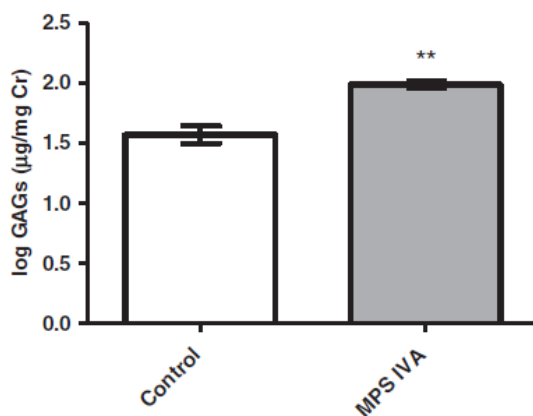


Fig. 5. Glycosaminoglycan (GAG) urinary levels in MPS IVA patients under ERT ($n = 12$) and controls ($n = 13$). Data represent mean \pm SEM. ** $p < 0.01$ (Student's t test for unpaired samples) compared to the control group.

oxidative state in MPS IVA patients and is consistent with studies involving animal model of MPS I, IIIA and IIIB [21,23,24].

Considering that GAG urinary levels in our study were still high in patients compared to the control group, we propose that GAGs are related, at least in part, with the oxidative damage found in MPS IVA patients. The present results for MPS IVA patients are in agreement with those found in treated Fabry patients, once they also showed high lipid and protein oxidative damage, decreased antioxidant defenses and increased inflammatory biomarkers [29].

To the best of our knowledge, this is the first study that describes the increase of oxidative damage to biomolecules in MPS IVA patients. Possibly, these data may provide new targets to future therapeutic strategies in order to improve the life quality of MPS IVA patients. Further researches and clinical trials are needed to reveal how safe and effective would be the supplementation of antioxidants in combination with ERT in MPS IVA disease.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found, in online version.

Acknowledgments

This study was supported by Brazilian Foundation *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) (309093/2013-9), *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) (7481/2011) and *Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos* (FIPE/HCPA) (13-0246). The authors also thank the patients, their families and the staff from *Serviço de Genética Médica/Hospital de Clínicas de Porto Alegre*.

References

- [1] E.F. Neufeld, J. Muenzer, The mucopolysaccharidoses, in: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, eighth edition McGraw-Hill Inc., New York, 2001, pp. 3421–3452.
- [2] P. Meikle, J. Hopwood, A.E. Clague, W. Carey, Prevalence of lysosomal storage disorders, *JAMA* 281 (1999) 249–254.
- [3] J. Singh, N. di Ferrante, P. Niebes, D. Tavella, N-Acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase in man. Absence of the enzyme in Morquio disease, *J. Clin. Invest.* 57 (1976) 1036–1040.
- [4] A.M. Montaña, S. Tomatsu, A. Brusius, M. Smith, T. Orii, Growth charts for patients affected with Morquio A disease, *Am. J. Med. Genet. A* 146A (2008) 1286–1295.
- [5] A.M. Montaña, S. Tomatsu, G.S. Gottesman, M. Smith, T. Orii, International Morquio A Registry: clinical manifestation and natural course of Morquio A disease, *J. Inher. Metab. Dis.* 30 (2007) 165–174.
- [6] A. Morrone, A. Caciotti, R. Atwood, K. Davidson, C. Du, P. Francis-Lyon, P. Hamatz, M. Mealiffe, S. Mooney, T.R. Oron, A. Ryles, K.A. Zawadzki, N. Miller, Morquio A syndrome-associated mutations: a review of alterations in the *GALNS* gene and a new locus-specific database, *Hum. Mutat.* 35 (2014) 1271–1279.
- [7] V.C. Düng, S. Tomatsu, A.M. Montaña, G. Gottesman, M.B. Bober, W. Mackenzie, M. Maeda, G.A. Mitchell, Y. Suzuki, T. Orii, Mucopolysaccharidosis IVA: correlation between genotype, phenotype and keratan sulfate levels, *Mol. Genet. Metab.* 110 (2013) 129–138.
- [8] B.J.A. Lankaster, M. Whitehouse, M.F. Gargan, Morquio syndrome, *Curr. Orthop.* 20 (2006) 128–131.
- [9] L. Martell, K. Lau, M. Miranda, V. Burnett, C. Decker, E.D. Foehr, Biomarker analysis of Morquio syndrome: identification of disease state and drug responsive markers, *Orphanet J. Rare Dis.* 6 (2011) 84.
- [10] S. Tomatsu, A.M. Montaña, H. Oikawa, M. Smith, L. Barrera, Y. Chinen, M.M. Thacker, W.G. Mackenzie, Y. Suzuki, T. Orii, Mucopolysaccharidosis type IVA (Morquio A disease): clinical review and current treatment: a special review, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 12 (2011) 931–945.
- [11] C.R. Scriver, W.A. Sly, A.L. Beaudet, D. Valle, *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, eighth edition McGraw-Hill Inc., New York, 2001.
- [12] S. Tomatsu, K. Okamura, T. Taketani, K.O. Orii, T. Nishioka, M.A. Gutierrez, S. Velez-Castrillon, A.A. Fachel, J.H. Grubb, A. Cooper, M. Thornley, E. Wraith, L.A. Barrera, R. Giugliani, I.V. Schwartz, G.S. Frenking, M. Beck, S.G. Kircher, E. Paschke, S. Yamaguchi, K. Ullrich, K. Isogai, Y. Suzuki, T. Orii, N. Kondo, M. Creer, A. Noguchi, Development and testing of new screening method for keratan sulfate in mucopolysaccharidosis IVA, *Pediatr. Res.* 55 (2004) 592–597.

- [13] H. Northover, R.A. Cowie, J.E. Wraith, Mucopolysaccharidosis type IVA (Morquio syndrome): a clinical review, *J. Inherit. Metab. Dis.* 19 (1996) 357–365.
- [14] C.J. Hendriksz, B. Burton, T.R. Fleming, P. Harmatz, D. Hughes, S.A. Jones, S.P. Lin, E. Mengel, M. Scarpa, V. Valayannopoulos, R. Giugliani, STRIVE Investigators, P. Slasor, D. Lounsbury, W. Dummer, W. Efficacy and safety of enzyme replacement therapy with BMN 110 (elosulfase alfa) for Morquio A syndrome (mucopolysaccharidosis IVA): a phase 3 randomised placebo-controlled study, *J. Inherit. Metab. Dis.* 37 (2014) 979–990.
- [15] A.G. Barschak, A. Sitta, M. Deon, M.H. de Oliveira, A. Haeser, C.S. Dutra-Filho, M. Wajner, C.R. Vargas, Evidence that oxidative stress is increased in plasma from patients with maple syrup urine disease, *Metab. Brain Dis.* 21 (2006) 279–286.
- [16] M. Deon, A. Sitta, A.G. Barschak, D.M. Coelho, M. Pigatto, G.O. Schmitt, L.B. Jardim, R. Giugliani, M. Wajner, C.R. Vargas, Induction of lipid peroxidation and decrease of antioxidant defenses in symptomatic and asymptomatic patients with X-linked adrenoleukodystrophy, *Int. J. Dev. Neurosci.* 25 (2007) 441–444.
- [17] A. Sitta, A.G. Barschak, M. Deon, J.F. de Mari, A.T. Barden, C.S. Vanzin, G.B. Biancini, I.V.D. Schwartz, M. Wajner, C.R. Vargas, L-Carnitine blood levels and oxidative stress in treated phenylketonuric patients, *Cell. Mol. Neurobiol.* 29 (2009) 211–218.
- [18] G.S. Ribas, V. Manfredini, J.F. de Mari, C.Y. Wayhs, C.S. Vanzin, G.B. Biancini, A. Sitta, M. Deon, M. Wajner, C.R. Vargas, Reduction of lipid and protein damage in patients with disorders of propionate metabolism under treatment: a possible protective role of L-carnitine supplementation, *Int. J. Dev. Neurosci.* 28 (2010) 127–132.
- [19] G.R.D. Villani, C. Di Domenico, A. Musella, F. Cecere, D. Di Napoli, P. Di Natale, Mucopolysaccharidosis IIIB: oxidative damage and cytotoxic cell involvement in the neuronal pathogenesis, *Brain Res.* 1279 (2009) 99–108.
- [20] G.K. Reolon, A. Reinke, M.R. de Oliveira, L.M. Braga, M. Camassola, M.E. Andrades, J.C. Moreira, N.B. Nardi, R. Roesler, F. Dal-Pizzol, Alterations in oxidative markers in the cerebellum and peripheral organs in MPS I mice, *Cell. Mol. Neurobiol.* 28 (2009) 443–448.
- [21] A. Arfi, M. Richard, C. Gandolphe, D. Bonnefont-Rousselot, P. Théron, D. Scherman, Neuroinflammatory and oxidative stress phenomena in MPS IIIA mouse model: the positive effect of long-term aspirin treatment, *Mol. Genet. Metab.* 103 (2011) 18–25.
- [22] C.M. Simonaro, M. D'Angelo, X. He, E. Elijahu, N. Shtraizent, M.E. Haskins, E.H. Schuchman, Mechanism of glycosaminoglycan-mediated bone and joint disease: implications for the mucopolysaccharidoses and other connective tissue diseases, *Am. J. Pathol.* 172 (2008) 112–122.
- [23] K. Ohmi, D.S. Greenberg, K.S. Rajavel, S. Ryazantsev, H.H. Li, E.F. Neufeld, Activated microglia in cortex of mouse models of mucopolysaccharidoses I and IIIB, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 1902–1907.
- [24] C. Di Domenico, G.R.D. Villani, D. Di Napoli, E. Nusco, G. Cali, L. Nitsch, P. Di Natale, Intracranial gene delivery of LV-NAGLU vector corrects neuropathology in murine MPS IIIB, *Am. J. Med. Genet. A* 149 (2009) 1209–1218.
- [25] V.G. Pereira, A.M. Martins, C. Micheletti, V. D'Almeida, Mutational and oxidative stress analysis in patients with mucopolysaccharidosis type I undergoing enzyme replacement therapy, *Clin. Chim. Acta* 387 (2008) 75–79.
- [26] L. Filippin, C.S. Vanzin, G.B. Biancini, I.N. Pereira, V. Manfredini, A. Sitta, M.C.R. Peralba, I.V.D. Schwartz, R. Giugliani, C.R. Vargas, Oxidative stress in patients with mucopolysaccharidosis type II before and during enzyme replacement therapy, *Mol. Genet. Metab.* 103 (2011) 121–127.
- [27] L. Filippin, C.A. Wayhs, D.M. Atik, V. Manfredini, S. Heber, C.G. Carvalho, I.G.V. Schwartz, R. Giugliani, C.R. Vargas, DNA damage in leukocytes from pretreatment mucopolysaccharidosis type II patients: protective effect of enzyme replacement therapy, *Mutat. Res.* 721 (2011) 206–210.
- [28] G.W. Negretto, M. Deon, G.B. Biancini, M.G. Burin, R. Giugliani, C.R. Vargas, Glycosaminoglycans can be associated with oxidative damage in mucopolysaccharidosis II patients submitted to enzyme replacement therapy, *Cell Biol. Toxicol.* 30 (2014) 189–193.
- [29] G.B. Biancini, C.S. Vanzin, D.B. Rodrigues, M. Deon, G.S. Ribas, A.G. Barschak, V. Manfredini, C.B.O. Netto, L.B. Jardim, R. Giugliani, C.R. Vargas, Globotriaosylceramide is correlated with oxidative stress and inflammation in Fabry patients treated with enzyme replacement therapy, *Biochim. Biophys. Acta* 1822 (2012) 226–232.
- [30] J.G.N. de Jong, R.A. Wevers, R. Liebrand-van Sambeek, Measuring urinary glycosaminoglycans in the presence of protein: an improved screening procedure for mucopolysaccharidoses based on dimethylmethylene blue, *Clin. Chem.* 38 (1992) 803–807.
- [31] R.W. Browne, D. Armstrong, Reduced glutathione and glutathione disulfide, *Methods Mol. Biol.* 108 (1998) 347–352.
- [32] Kirschbaum, Correlative studies of urine fluorescence and free radical indicators, *Clin. Nephrol.* 58 (2002) 344–349.
- [33] M.Y. Aksenov, W.R. Markesbery, Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease, *Neurosci. Lett.* 302 (2001) 141–145.
- [34] N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider, A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell Res.* 175 (1988) 184–191.
- [35] R.R. Tice, E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J.C. Ryu, Y.F. Sasaki, Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing, *Environ. Mol. Mutagen.* 35 (2000) 206–221.
- [36] S.B. Nadin, L.M. Vargas-Roig, D.R. Ciocca, A silver staining method for single-cell gel assay, *J. Histochem. Cytochem.* 49 (2001) 1183–1186.
- [37] B. Burlinson, R.R. Tice, G. Speit, E. Agurell, S.Y. Brendler-Schwaab, A.R. Collins, P. Escobar, M. Honma, T.S. Kumaravel, M. Nakajima, Y.F. Sasaki, V. Thybaud, Y. Uno, M. Vasquez, A. Hartmann, Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the *in vivo* Comet assay workgroup, *In Vivo Comet Assay Workgroup*, part of the Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing, *Mutat. Res.* 627 (2007) 31–35.
- [38] M. Dizdaroğlu, J. Laval, S. Boiteux, Substrate specificity of the *Escherichia coli* endonuclease III: excision of thymine- and cytosine-derived lesions in DNA produced by radiation-generated free radicals, *Biochemistry* 32 (1993) 12105–12111.
- [39] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [40] A.H. Futerman, G. van Meer, The cell biology of lysosomal storage disorders, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5 (2004) 554–565.
- [41] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, fourth ed. Oxford University Press, New York, 2007.
- [42] C.R. Vargas, M. Wajner, L.R. Sirtori, L. Goulart, M. Chiochetta, D. Coelho, Evidence that oxidative stress is increased in patients with X-linked adrenoleukodystrophy, *Biochim. Biophys. Acta* 1688 (2004) 26–32.
- [43] U.T. Brunk, J. Neuzil, J.W. Eaton, Lysosomal involvement in apoptosis, *Redox Rep.* 6 (2001) 91–97.
- [44] M. Zhao, F. Antunes, J.W. Eaton, U.T. Brunk, Lysosomal enzymes promote mitochondrial oxidant production, cytochrome c release and apoptosis, *Eur. J. Biochem.* 270 (2003) 3778–3786.
- [45] A. Terman, T. Kurz, B. Gustafsson, U.T. Brunk, Lysosomal labilization, *IUBMB Life* 58 (2006) 531–539.
- [46] A. Terman, U.T. Brunk, Oxidative stress, accumulation of biological 'garbage', and aging, *Antioxid. Redox Signal.* 8 (2006) 197–204.
- [47] R.L. Levine, Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease, *Free Radic. Biol. Med.* 32 (2001) 790–796.
- [48] B. Halliwell, Reactive species and antioxidants: redox biology is a fundamental theme of aerobic life, *Plant Physiol.* 141 (2006) 312–322.
- [49] E. Bourdon, D. Blache, The importance of proteins in defense against oxidation, *Antioxid. Redox Signal.* 3 (2001) 293–311.
- [50] H. Esterbauer, R.J. Schaur, H. Zollner, Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes, *Free Radic. Biol. Med.* 11 (1991) 81–128.
- [51] J.A. Thomas, B. Poland, R. Honzatko, Protein sulfhydryls and their role in the antioxidant function of protein S-thiolation, *Arch. Biochem. Biophys.* 319 (1995) 1–9.
- [52] R.E. Hansen, D. Roth, J.R. Winther, Quantifying the global cellular thiol-disulfide status, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 422–427.
- [53] R. Requejo, T.R. Hurd, N.J. Costa, M.P. Murphy, Cysteine residues exposed on protein surfaces are the dominant intramitochondrial thiol and may protect against oxidative damage, *FEBS J.* 277 (2010) 1465–1480.
- [54] P.J. Mc Guire, A. Parikh, G.A. Diaz, Profiling of oxidative stress in patients with inborn errors of metabolism, *Mol. Genet. Metab.* 98 (2009) 173–180.
- [55] G.W. Negretto, M. Deon, M.G. Burin, G.B. Biancini, G. Ribas, S.C. Garcia, G. Goethel, R. Fracasso, L. Giugliani, R. Giugliani, C.R. Vargas, *In vitro* effect of genistein on DNA damage in leukocytes from mucopolysaccharidosis IVA patients, *Mol. Genet. Metab.* 111 (2014) 205–208.
- [56] W. Liao, M.A. McNutt, W.G. Zhu, The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells, *Methods* 48 (2009) 46–53.
- [57] M. Dušinská, A.R. Collins, DNA oxidation, antioxidant effects, and DNA repair measured with the comet assay, in: G. Aldini, K.J. Yeum, E. Niki, R. Russell (Eds.), *Biomarkers for Antioxidant Defense and Oxidative Damage: Principles and Practical Applications*, Blackwell Publishing Ltd., 2010, pp. 261–282.
- [58] M.S. Cooke, M.D. Evans, M. Dizdaroğlu, J. Lunec, Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease, *FASEB J.* 17 (2003) 1195–1214.
- [59] K.H. Schulpis, S. Tsakiris, J. Traeger-Synodinos, I. Papassotiropoulos, Low total antioxidant status is implicated with high 8-hydroxy-2-deoxyguanosine serum concentrations in phenylketonuria, *Clin. Biochem.* 38 (2005) 239–242.
- [60] G.R.D. Villani, N. Gargiulo, R. Faraonio, S. Castaldo, E.G. Reyero, P. Di Natale, Cytokines, neurotrophins, and oxidative stress in brain disease from mucopolysaccharidosis IIIB, *J. Neurosci. Res.* 85 (2007) 612–622.

4. DISCUSSÃO

Os EIM são distúrbios metabólicos de origem genética, em que a deficiência na atividade de uma enzima provoca o bloqueio de uma rota bioquímica e, com isso, ocorre o acúmulo de substratos e seus derivados (Scriver et al., 2001). Conforme Saudubray e Charpentier (2001), os EIM podem ser classificados em três grandes grupos, de acordo com a área do metabolismo afetada. Um destes grupos é composto pelos distúrbios na síntese ou degradação de macromoléculas complexas, caracterizados por sintomas permanentes, progressivos e não relacionados à ingesta alimentar. Fazem parte deste grupo as doenças peroxissomais e as DLD. Entre as DLD, as MPS aparecem como as mais prevalentes (Coelho et al., 1997). As MPSs são DLD ocasionadas pela degradação deficiente dos GAG. A primeira consequência biológica das MPSs é o aumento do número e tamanho dos lisossomos, com o intuito de conter o elevado conteúdo de moléculas não metabolizadas no seu interior. Entretanto, ainda não estão totalmente elucidados os mecanismos bioquímicos e celulares envolvidos com o dano celular e tecidual decorrente deste acúmulo intralisossomal (Futerman e van Meer, 2004).

Muitos estudos vêm demonstrando o envolvimento do estresse oxidativo e inflamação na patogênese dos EIM e, mesmo que esta relação não esteja bem elucidada, o acúmulo de metabólitos é apontado como o principal responsável pelo aumento de RL. (Barschak et al., 2006; Deon et al., 2007; Sitta et al., 2009; Ribas et al., 2010; Biancini et al., 2012; Filippon et al., 2011a). Os RL ou ER são formados e degradados durante o metabolismo aeróbio normal das células e produzem efeitos benéficos quando em concentrações baixas a moderadas. Entre estes efeitos destacam-se: resposta celular contra agentes infecciosos, sinalização celular e transcrição gênica (Zheng e Storz, 2000; Halliwell e Gutteridge, 2007; Valko et al., 2007). Todavia, a produção exarcebada de RL/ER é deletéria e pode causar dano oxidativo a biomoléculas como lipídeos, proteínas, DNA/RNA, culminando em injúria celular e morte tecidual (Halliwell e Guteridge, 2007).

Apesar de haver inúmeros trabalhos relacionando estresse oxidativo aos EIM, existem apenas alguns estudos com DLD, especialmente MPS. Visto que os lisossomos são extremamente suscetíveis ao estresse oxidativo, o desbalanço entre a formação e degradação de ER parece ser de suma importância neste conjunto de doenças (Pereira et al., 2008; Reolon et al., 2009). A desestabilização da membrana lisossomal pode resultar na liberação de hidrolases e metabólitos acumulados para o

citosol, podendo causar apoptose ou necrose. Além disso, devido ao estresse oxidativo, a liberação do conteúdo lisossomal no citosol pode induzir um dano mitocondrial com produção secundária de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , sugerindo que o dano lisossomal possa causar ainda maior estresse oxidativo através da amplificação de um processo cíclico de geração de RL (Brunk et al., 2001; Zhao et al., 2003; Terman et al., 2006; Terman and Brunk, 2006).

Estudos recentes realizados pelo nosso grupo de pesquisa mostraram evidências do envolvimento do estresse oxidativo na fisiopatologia da MPS II, além da demonstração que a TRE se mostrou protetora no que se refere ao dano a lipídeos, proteínas e DNA nestes pacientes (Filippon et al., 2011a; Filippon et al., 2011b). Além disso, outro estudo desenvolvido pelo nosso grupo verificou que pacientes com a doença de Fabry (classificada como DLD) apresentam dano oxidativo a proteínas e lipídeos, diminuição das defesas antioxidantes e aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, mesmo quando submetidos à TRE (Biancini et al., 2012). Até o desenvolvimento do presente trabalho nenhum estudo havia avaliado o estresse oxidativo, em termos de defesas antioxidantes e dano oxidativo a biomoléculas, em pacientes com MPS IVA. Além disso, considerando a recente aprovação da TRE para estes pacientes e a melhora clínica apresentada por eles após o uso da terapia (Hendriksz et al., 2014), o presente trabalho teve como objetivo avaliar os biomarcadores de estresse oxidativo e inflamação durante a vigência deste tratamento.

Foi verificado, no presente trabalho, que o conteúdo eritrocitário de GSH, a mais importante defesa antioxidante não enzimática dessas células, estava diminuído em pacientes MPS IVA em relação aos controles. A GSH age contra ER à medida que as sequestra, oxidando-se, e protegendo biomoléculas importantes (Halliwell, 2006). Dessa maneira, lipídeos, proteínas e DNA ficam mais vulneráveis ao ataque de ER, o que foi confirmado pelos experimentos de avaliação de dano a biomoléculas nestes pacientes. Além disso, foi observado um aumento na atividade enzimática da SOD em pacientes MPS IVA, mostrando, provavelmente, uma resposta do organismo à elevação de ER. Contudo, o aumento na atividade da SOD não foi acompanhado por um acréscimo na atividade da GPx, o qual seria necessário para que houvesse uma correta degradação do H_2O_2 formado pela SOD durante a dismutação do $O_2^{\bullet-}$. Sendo assim, o H_2O_2 formado em excesso

permanece livre e, na presença de Fe^{+2} através da reação de Fenton, produz o OH^{\bullet} , o qual é extremamente danoso a todas as classes de biomoléculas, formando rapidamente peróxidos lipídicos e radicais orgânicos (Halliwell, 2006). Considerando o exposto, pode-se propor, então, que o aumento da atividade de apenas uma enzima antioxidante pode ser prejudicial ao invés de benéfico, já que o equilíbrio entre a SOD e as enzimas de remoção de peróxido (como a GPx) é de importância primordial no sistema de defesa antioxidante celular (Bourdon e Blache, 2001). Corroborando com estes achados, um aumento de SOD sem aumento de GPx já havia sido verificado em modelo animal de MPS I (Reolon et al., 2009). Ainda, foi observado que ratos MPS IIIA apresentavam uma razão extremamente baixa entre GSH e a sua forma oxidada (GSSG), refletindo uma perturbação oxidativa no ambiente celular (Arfi et al., 2011). Sendo assim, em pacientes MPS IVA, o baixo conteúdo de GSH juntamente com o aumento da atividade da SOD sem um aumento na atividade de GPx, provavelmente contribua para o processo de estresse oxidativo encontrado nestes pacientes.

A lipoperoxidação pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação dos RL sobre os lipídeos insaturados das membranas celulares, levando à destruição de sua estrutura, falha dos mecanismos de troca de metabólitos e, numa condição extrema, à morte celular (Halliwell e Gutteridge, 2007). A lipoperoxidação pode ser considerada o evento citotóxico primário que desencadeia uma sequência de lesões na célula. Entre as alterações desencadeadas pela lipoperoxidação podem-se citar (Halliwell e Gutteridge, 2007):

- alterações nas membranas levando a transtornos da permeabilidade, alterando o fluxo iônico (e de outras substâncias) e resultando em perda da seletividade para entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas à célula;
- alterações do DNA, levando a lesões mutagênicas;
- oxidação de lipoproteína de baixa densidade (LDL);
- comprometimento dos componentes da matriz extracelular (proteoglicanos, colágeno e elastina).

Basicamente, a lipoperoxidação consiste na incorporação de oxigênio molecular a um ácido graxo poliinsaturado para produzir um hidroperóxido lipídico (LOOH) como produto inicial. Nos sistemas biológicos este processo pode ocorrer

principalmente por duas vias, sendo a primeira uma via enzimática envolvendo as ciclooxigenases e lipoxigenases na oxigenação dos ácidos graxos poliinsaturados e a segunda a peroxidação não enzimática, que envolve a participação de ERO, ERN, metais de transição e outros RL (Halliwell e Gutteridge, 2007). A lipoperoxidação resulta na formação de hidroperóxidos lipídicos e aldeídos, tais como o malondialdeído, 4-hidroxinonenal e os isoprostanos, que podem ser detectados em amostras biológicas e utilizados para a avaliação do estresse oxidativo. No presente trabalho os níveis de isoprostanos urinários, derivados da oxidação do ácido aracdônico (15-F2t-isoprostano), foram determinados, visto que estão sendo considerados marcadores bastante confiáveis no que diz respeito ao dano oxidativo a lipídeos (Basu, 2008). Os pacientes com MPS IVA apresentaram aumento deste marcador urinário quando comparados com indivíduos controle, demonstrando a presença de lipoperoxidação nestes pacientes mesmo quando submetidos à TRE. Corroborando com os dados apresentados, pacientes MPS I sob TRE também apresentaram dano a lipídeos, mensurado através do aumento dos níveis de TBARS (Pereira et al., 2008). Entretanto, a TRE conseguiu diminuir os níveis de malondialdeído em pacientes MPS II quando comparados aos pacientes antes da terapia (Filippon et al., 2011a).

Ainda no que diz respeito ao dano oxidativo a biomoléculas, nós observamos aumento nos níveis urinários de di-tirosina e diminuição do conteúdo plasmático de grupamentos sulfidríla nos pacientes MPS IVA sob TRE quando comparados com indivíduos controle. Cerca de 60-70% dos grupamentos sulfidríla estão ligados a proteínas, sendo assim é importante enfatizar que a diminuição nos níveis de grupamentos sulfidríla observada no plasma de pacientes com MPS IVA representa, predominantemente, dano oxidativo proteico (Requejo et al., 2010). A maioria dos grupamentos tióis de proteínas está presente nos resíduos de cisteína e a oxidação desses grupos leva à formação de pontes dissulfeto, o que altera o estado redox da molécula, sua estrutura e funcionalidade podendo comprometer a atividade de enzimas, receptores e proteínas transportadoras (Levine et al., 1990; Halliwell e Whiteman, 2004). Levando em consideração os 30-40% de grupamentos sulfidríla restantes estão presentes no plasma na forma de moléculas como a glutathiona, a qual pode ser reversivelmente oxidada por ER atuando como antioxidante, uma diminuição do seu conteúdo aponta para um desbalanço oxidativo (Bourdon e

Blache, 2001). O aumento dos níveis de di-tirosina urinária reforça a ideia de oxidação de proteínas encontradas em pacientes MPS IVA, pois a di-tirosina é formada através da oxidação de resíduos adjacentes de tirosina em proteínas e excretada na urina sem sofrer metabolismo (Mc Guire et al., 2009). O dano oxidativo a proteínas pode ser prejudicial *in vivo* por efeitos diretos (alteração ou perda de função de enzimas ou transportadores) ou por contribuir indiretamente no dano a outras biomoléculas (p. ex. dano a enzimas de reparo pode perpetuar o dano ao DNA). Ainda, a alteração direta da estrutura protéica por oxidação pode desencadear resposta autoimune, visto que as proteínas modificadas são reconhecidas como não próprias pelo sistema imune (Halliwell e Whiteman, 2004). Dano oxidativo a proteínas já foi observado em modelo animal de MPS I, através do aumento de carbonilas (Reolon et al., 2009) e em pacientes MPS II, através de diminuição de sulfidrilas e aumento de carbonila. Nestes últimos, a TRE foi capaz de aumentar os níveis de sulfidrilas somente durante os três primeiros meses de tratamento e não conseguiu alterar os níveis de carbonila (Filippon et al., 2011a).

O dano ao DNA vem sendo associado com um vasto número de patologias, incluindo os EIM (Sitta et al., 2009; Filippon et al., 2011b; Negretto et al., 2014b). Com o intuito de verificar se os pacientes MPS IVA sob TRE apresentavam dano ao DNA nós utilizamos o ensaio cometa. Esta técnica é amplamente utilizada para avaliar o dano ao DNA por se tratar de uma metodologia simples, rápida e de baixo custo (Liao et al., 2009). O ensaio cometa permite avaliar dano ao DNA em células individuais sob condições alcalinas e após a desnaturação do DNA é possível a verificação de quebras simples e duplas e sítios álcali-lábeis (Singh et al., 1988; Tice et al., 2000). Os leucócitos individualizados, misturados à agarose e espalhados sobre uma lâmina são submetidos a uma corrente elétrica que proporciona a migração dos segmentos de DNA livres, resultantes de quebra, para fora do núcleo. Após a eletroforese, as células são coradas e analisadas em microscópio. O dano ao DNA é quantificado, neste método, analisando-se 100 células (leucócitos) da amostra biológica, as quais recebem um escore que varia de 0 (célula sem dano) até 4 (dano máximo) de acordo com o tamanho da cauda, quanto maior a cauda maior o dano ao DNA (Burlinson et al., 2007; Tice et al., 2000). Além disso, para que se possa determinar se o dano tem origem oxidativa é possível adicionar enzimas de reparo (sobre a amostra antes da eletroforese), as quais reconhecem as bases

oxidadas e as removem, aumentando o dano visualizado em microscópio através do aumento da cauda. A enzima utilizada neste trabalho é conhecida como Endonuclease III (Endo III) e reconhece bases pirimidínicas oxidadas (Dušinská e Collins, 2010). Nossos resultados mostraram níveis aumentados de dano ao DNA nos pacientes MPS IVA sob TRE quando comparados ao grupo controle, sendo que o dano observado foi oxidativo em bases pirimidínicas. O dano ao DNA também foi observado em pacientes com MPS II, sendo que a TRE foi capaz de diminuir os níveis deste dano nos pacientes tratados quando comparados com pacientes não tratados, mas os valores não chegaram a níveis de controle. Além disso, foi verificada correlação positiva entre os marcadores de dano oxidativo a proteínas e lipídeos e o dano ao DNA, mostrando que provavelmente o dano ao DNA seja de origem oxidativa (Filippon et al., 2011b).

A 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) é um produto da oxidação da base purínica guanósina e é formada quando o OH^{\bullet} ataca o DNA mitocondrial e nuclear (Halliwell e Gutteridge, 2007). O DNA oxidado é continuamente reparado e os nucleosídeos que sofreram dano são excretados na corrente sanguínea e urina (Cooke et al., 2003). Altas concentrações urinárias de 8-OHdG são encontradas em pacientes com aterosclerose, nefrolitíase, câncer, hipertensão, epilepsia e diabetes tipo II (Nakanish et al., 2004; Wu et al., 2004; Boonla et al., 2007; Ercegovac et al., 2010; Subash et al., 2010; Jaruga et al., 2012). No que concerne aos EIM, foi descrito na literatura que pacientes fenilcetonúricos com altos níveis sanguíneos de fenilalanina (devido ao não seguimento da dieta recomendada) apresentaram aumento de 8-OHdG em soro. Além disso, neste mesmo trabalho foi verificada uma correlação significativa positiva entre os níveis de 8-OHdG e fenilalanina e uma correlação significativa negativa entre os níveis de 8-OHdG e o status antioxidante nos pacientes fenilcetonúricos (Schulpis et al., 2005). Nossos resultados mostraram que pacientes com MPS IVA também apresentam níveis urinários aumentados de 8-OHdG quando comparados com indivíduos saudáveis. Combinando este resultado àqueles obtidos pelo ensaio cometa pode-se presumir que pacientes MPS IVA sob TRE apresentam dano oxidativo ao DNA tanto em bases purínicas quanto em pirimidínicas. Além disso, os níveis aumentados de 8-OHdG nos pacientes com MPS IVA nos permite concluir que o aumento da atividade da SOD não acompanhado

pelo aumento da atividade da GPx, que foi discutido anteriormente, realmente causa um acúmulo de OH^{*}, o qual é capaz de atacar o DNA formando 8-OHdG.

Com o intuito de investigar os mecanismos subjacentes à inflamação, avaliou-se a citocina pró-inflamatória IL-6, a qual se apresentou aumentada em pacientes com MPS IVA sob TRE. Este resultado proporciona indícios de que o estado pró-inflamatório ocorre nestes pacientes. Há poucos estudos sobre mediadores inflamatórios em mucopolissacaridoses, sendo a maioria realizada em modelos animais. Estes estudos apontam para uma elevada expressão de moléculas inflamatórias e citocinas secundárias ao acúmulo de GAG em MPS tipo IIIB, VI e VII (Villani et al., 2009; Villani et al., 2007; Simonaro et al., 2008). Em nosso trabalho também observamos uma correlação inversa entre GSH e IL-6. Estes dados podem sugerir que o processo inflamatório está associado ao estado oxidativo em pacientes com MPS IVA, e é consistente com estudos envolvendo modelo animal de MPS I, IIIA e IIIB (Di Domenico et al, 2009;. Arfi et al, 2011, Ohmi et al., 2003). Além de uma possível liberação de IL-6 decorrente do mecanismo inflamatório desencadeado pelo acúmulo de GAG, pode-se propor que a IL-6 possa ser liberada (como citocina mediadora) durante o processo autoimune iniciado pelo reconhecimento de proteínas oxidadas como não-próprias pelo organismo (Halliwell e Whiteman, 2004). Outra hipótese seria que o aumento de IL-6 nos pacientes MPS IVA poderia ser derivado da cascata inflamatória desencadeada pela produção de anticorpos antidroga, comumente encontrados em pacientes que fazem uso de TRE. Em estudo recente, foi verificado que todos os pacientes MPS IVA tratados com elosulfase alfa produzem anticorpos antidroga, contudo a produção dos anticorpos não apresentou relação com a eficácia da terapia (Schweighardt et al., 2014).

Considerando que os níveis urinários de GAG ainda estavam elevados nos pacientes MPS IVA sob TRE em comparação com o grupo controle, pode-se supor que os GAG estão relacionados, pelo menos em parte, com o dano oxidativo e com a inflamação encontrada em pacientes com MPS IVA. Os dados mostrados pelo presente trabalho, para pacientes com MPS IVA sob TRE, estão de acordo com os encontrados em pacientes com Fabry também submetidos à TRE, uma vez que os pacientes Fabry apresentaram dano oxidativo a lipídeos e proteínas, diminuição das defesas antioxidantes e aumento de biomarcadores inflamatórios (Biancini et al., 2012).

Em suma, a importante contribuição deste trabalho foi a verificação da presença de estresse oxidativo e inflamação em pacientes MPS IVA, mas deve-se analisar os resultados com cuidado, visto que somente pacientes sob TRE foram incluídos. Sobretudo, os dados aqui apresentados apontam para a necessidade de outros estudos propondo novas abordagens terapêuticas complementares à TRE com o intuito de melhorar a qualidade de vida dos pacientes com MPS IVA. Considerando o estresse oxidativo encontrado nestes pacientes, pesquisas e estudos clínicos futuros são necessários para revelar o quão segura e efetiva seria a suplementação com antioxidantes em combinação com a TRE nos pacientes com MPS IVA.

5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste estudo em pacientes MPS IVA sob à TRE, foi possível concluir que os pacientes portadores desta patologia apresentam:

- a) Prejuízo de defesas antioxidantes enzimáticas (aumento de SOD não acompanhado por aumento de GPX) e não enzimáticas (diminuição de GSH);
- b) Dano oxidativo a lipídeos (isoprostanos) e proteínas (sulfidrila e di-tirosina);
- c) Altos níveis de dano ao DNA de origem oxidativa, em bases purínicas e pirimidínicas;
- d) Aumento da citocina pró-inflamatória IL-6;
- e) Correlação significativa negativa de IL-6 com defesa antioxidante não enzimática (GSH),
- f) Aumento de GAG urinários.

Dessa maneira, conclui-se que os estados pró-inflamatório e pró-oxidante ocorrem e estão correlacionados em pacientes com MPS IVA mesmo submetidos à TRE. Assim pode-se sugerir que a suplementação com antioxidantes em combinação com a TRE deve ser considerada como uma promissora abordagem terapêutica aos pacientes portadores de MPS IVA.

6. PERSPECTIVAS

Pretendemos dar continuidade a este trabalho estudando pacientes com MPS IVA antes de iniciar o tratamento com TRE (no momento do diagnóstico) e ao longo da terapia. Para tanto, objetivaremos comparar estes dois grupos de pacientes nos parâmetros já analisados e faremos análises adicionais, incluindo a dosagem de outros marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo. Faremos também um teste *in vitro* com antioxidantes, para verificar o efeito da suplementação com antioxidantes em conjunto com a TRE.

Considerando o exposto, as perspectivas deste trabalho são:

- a) Avaliar as defesas antioxidantes enzimáticas (através da medida da atividade das enzimas CAT, SOD, GPx e GR) e não enzimáticas (através da quantificação de GSH) em eritrócitos e realizar teste *in vitro* com antioxidantes;
- b) Avaliar as defesas antioxidantes não enzimáticas (*Status* Antioxidante Total – TAS – e Reatividade Antioxidante Total – TAR) no plasma e na urina;
- c) Avaliar o dano oxidativo a lipídeos (através da quantificação de MDA em plasma e de isoprostanos e hidroperóxidos na urina) e proteínas (através da quantificação de grupamentos carbonilas e sulfidrilas em plasma e de di-tirosina na urina);
- d) Avaliar o dano ao DNA (pelo ensaio cometa com a adição de enzimas e pela dosagem de 8-OHdG em urina) e realizar teste *in vitro* com antioxidantes;
- e) Quantificar queratan sulfato e condroitin-6-sulfato na urina por LC/MS/MS;
- f) Quantificar biomarcadores inflamatórios (IL-6, IL-1 β , IL-8, TNF α , IFN γ) no plasma,
- g) Correlacionar os parâmetros bioquímicos, oxidativos e inflamatórios entre si.

7. REFERÊNCIAS

Aksenov MY, Markesbery WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 2001,302: 141-145.

Applegarth DA, Toone JR, Lowry RB. Incidence of inborn errors of metabolism in British Columbia, 1969–1996. *Pediatrics*, 2000, 105: 109–205.

Araujo APQC. Psychiatric features of metabolic disorders. *Rev Psiqu Clin*, 2004, 31(6): 285-289.

Arfi A, Richard M, Gandolphe C, Bonnefont-Rousselot D, Thérond P, Scherman D. Neuroinflammatory and oxidative stress phenomena in MPS IIIA mouse model: the positive effect of long-term aspirin treatment. *Mol Genet Metab*, 2011, 103(1): 18-25.

Baehner F, Schmiedeskamp C, Krummenauer F, Miebach E, Bajbouj M, Whybra C, Kohlschütter A, Kampmann C, Beck M. Cumulative incidence rates of the mucopolysaccharidoses in Germany. *J Inher Metab Dis*, 2005, 28: 1011–1017.

Bagewadi S, Robert J, Mercer J, Jones S, Stephenson J, Wraith JE. Home treatment with elaprase and Naglazyme is safe in patient with mucopolysaccharidoses types II and VI, respectively. *J. Inher Metab Dis*, 2008, 31: 733-73.

Ballabio A, Gieselmann V. Lysosomal disorder: From storage to cellular damage. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1793: 684–696.

Barschak AG, Sitta A, Deon M, de Oliveira MH, Haeser A, Dutra-Filho CS, Wajner M, Vargas CR. Evidence that oxidative stress is increased in plasma from patients with maple syrup urine disease. *Metab Brain Dis*, 2006, 21: 279–286.

Barth ML, Giugliani R, Gondenfum SL, Munarski R, Folberg A, Lekhwani C, Slade C, Fensom AH. Application of a flowchart for the detection of lysosomal storage diseases in 105 high-risk Brazilian patients. *Am J Med Genet*, 1990, 37: 388-394.

Basu S. Comprehensive Invited Review. F2-Isoprostanes in Human Health and Diseases: From Molecular Mechanisms to Clinical Implications. *Antioxid Redox Signal*, 2008, 10(8): 1405-1434.

Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev*, 1998, 78(2): 547-581.

Biancini GB, Vanzin CS, Rodrigues DB, Deon M, Ribas GS, Barschak AG, Manfredini V, Netto CBO, Jardim LB, Giugliani R, Vargas CR. Globotriaosylceramide is correlated with oxidative stress and inflammation in Fabry patients treated with enzyme replacement therapy. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1822 (2): 226–232.

Boonla C, Wunsuwan R, Tungsanga K, Tosukhowong P. Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine is elevated in patients with nephrolithiasis. *Urol Res*, 2007, 35: 185-191.

Bourdon E, Blache D. The importance of proteins in defense against oxidation. *Antioxid Redox Signal*, 2001, 3: 293–311.

Browne RW, Armstrong D. Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods Mol Biol*, 1998, 108: 347-352.

Brunk UT, Neuzil J, Eaton JW. Lysosomal involvement in apoptosis. *Redox Rep*, 2001, 6(2): 91–97.

Burlinson B, Tice RR, Speit G, Agurell E, Brendler-Schwaab SY, Collins AR, Escobar P, Honma M, Kumaravel TS, Nakajima M, Sasaki YF, Thybaud V, Uno Y, Vasquez M, Hartmann A. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo Comet assay workgroup, In Vivo Comet Assay Workgroup, part of the Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing. *Mutat Res*, 2007, 627 (1): 31-35.

Burrow TA, Hopkin RJ, Leslie ND, Tinkle BT, Grabowski GA. Enzyme reconstitution/replacement therapy for lysosomal storage diseases. *Curr Opin Pediatr*, 2007, 19(6): 628-635.

Cappelletti R, Del Rosso M, Chiarugi VP. A new electrophoretic method for the complete separation of all known animal glycosaminoglycans in a monodimensional run. *Anal Biochem*, 1979, 99: 311-315.

Chih-Kuang C, Shuan-Pei L, Shyue-Jye L, Tuen-Jen W. MPS screening methods, the Berry spot and acid turbidity tests, cause a high incidence of false-negative results in sanfilippo and morquio syndromes. *J Clin Lab Anal*, 2002, 16(5): 253-258.

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

Coman DJ, Hayes IM, Collins V, Sahhar M, Wraith JE, Delatycki MB. Enzyme replacement therapy for Mucopolysaccharidoses: Opinions of Patients and Families. *J Pediatr*, 2008, 152(5): 723-727.

Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*, 2003, 17: 1195-1214.

de Jong JGN, Wevers RA, Liebrand-van Sambeek R. Measuring urinary glycosaminoglycans in the presence of protein: an improved screening procedure for mucopolysaccharidoses based on dimethylmethylene blue. *Clin. Chem*, 1992, 38 (6): 803-807.

Deon M, Sitta A, Barschak AG, Coelho DM, Pigatto M, Schmitt GO, Jardim LB, Giugliani R, Wajner M, Vargas CR. Induction of lipid peroxidation and decrease of antioxidant defenses in symptomatic and asymptomatic patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Int J Devl Neuroscience*, 2007, 25: 441–444.

Di Domenico C, Villani GRD, Di Napoli D, Nusco E, Cali G, Nitsch L, Di Natale P. Intracranial gene delivery of LV-NAGLU vector corrects neuropathology in murine MPS IIIB. *Am J Med Genet Part A*, 2009, 149A: 1209–1218.

DiRosario J, Divers E, Wang C, Etter J, Charrier A, Jukkola P, Auer H, Best V, Newsom DL, McCarty DM, Fu H. Innate and adaptive immune activation in the brain of MPS IIIB mouse model. *J Neurosci Res*, 2009, 87: 978-990.

Dũng VC, Tomatsu S, Montañó AM, Gottesman G, Bober MB, Mackenzie W, Maeda M, Mitchell GA, Suzuki Y, Orii T. Mucopolysaccharidosis IVA: Correlation between genotype, phenotype and keratan sulfate levels. *Mol Genet Metab*, 2013, 110: 129–138.

Dušinská M, Collins AR. DNA oxidation, antioxidant effects, and DNA repair measured with the comet assay, in: Aldini G, Yeum KJ, Niki E, Russell R (Eds.). *Biomarkers for Antioxidant Defense and Oxidative Damage: Principles and Practical Applications*, Blackwell Publishing Ltd., 2010, 261-282.

Dvorak-Ewell M, Wendt D, Hague C, Christianson T, Koppaka V, Crippen D, Kakkis E, Vellard M. Enzyme Replacement in a Human Model of Mucopolysaccharidosis IVA In Vitro and Its Biodistribution in the Cartilage of Wild Type Mice. *PLoS ONE*, 2010, 5 (8): e12194.

Ercegovac M, Jovic N, Simic T, Beslac-Bumbasirevic L, Sokic D, Djukic T, Savic-Radojevic A, Matic M, Mimic-Oka J, Pljesa-Ercegovac M. Byproducts of protein, lipid and DNA oxidative damage and antioxidant enzyme activities in seizure. *Seizure*, 2010, 19: 205–210.

Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Method Enzymol*, 1990, 186: 407-421.

Filippon L, Vanzin CS, Biancini GB, Pereira IN, Manfredini V, Sitta A, Peralba Mdo C, Schwartz IV, Giugliani R, Vargas CR. Oxidative stress in patients with mucopolysaccharidosis type II before and during enzyme replacement therapy. *Mol Genet Metab*, 2011a, 103(2): 121-127.

Filippon L, Wayhs CA, Atik DM, Manfredini V, Herber S, Carvalho CG, Schwartz IV, Giugliani R, Vargas CR. DNA damage in leukocytes from pretreatment mucopolysaccharidosis type II patients; protective effect of enzyme replacement therapy. *Mutat Res*, 2011b, 721(2): 206-210.

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

Germain DP. Enzyme Replacement therapies for lysosomal storage disorders. *Med Sci (Paris)*, 2005, 21(11): 77-83.

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

Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol*, 2004, 142: 231-255.

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

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

Harmatz P, Giugliani R, Schwartz IV, Guffon N, Teles EL, Miranda MC, Wraith JE, Beck M, Arash L, Scarpa M, Ketteridge D, Hopwood JJ, Plecko B, Steiner R, Whitley CB, Kaplan P, Yu ZF, Swiedler SJ, Decker C. Long-term follow-up of endurance and safety outcomes during enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis VI: final results of three clinical studies of recombinant human N-acetylgalactosamine 4-sulfatase. *Mol Genet Metab*, 2008, 94: 469–475.

Heese BA. Current Strategies in the Management of Lysosomal Storage Diseases. *Semin Pediatr Neurol*, 2008, 15: 119–126.

Hendriksz CJ, Harmatz P, Beck M, Jones S, Wood T, Lachman R, Gravance CG, Orii T, Tomatsu S. Review of clinical presentation and diagnosis of mucopolysaccharidosis IVA. *Mol Genet Metab*, 2013, 110: 54-64.

Hendriksz CJ, Burton B, Fleming TR, Harmatz P, Hughes D, Jones SA, Lin SP, Mengel E, Scarpa M, Valayannopoulos V, Giugliani R; STRIVE Investigators, Slasor P, Lounsbury D, Dummer W. Efficacy and safety of enzyme replacement therapy with BMN 110 (elosulfase alfa) for Morquio A syndrome (mucopolysaccharidosis IVA): a phase 3 randomised placebo-controlled study. *J Inherit Metab Dis*, 2014, 37(6): 979-990.

Humbel R, Chamoles NA. Sequential thin layer chromatography of urinary acid glycosaminoglycans. *Clin. Chim Acta*, 1972, 40: 290-293.
Jardim LB, Ashton-Prolla P. Erros inatos do metabolismo em crianças agudamente enfermas: guia para o seu diagnóstico e manejo. *J Pediatr*, 1996, 72(2): 63-70.

Jaruga P, Rozalski R, Jawien A, Migdalsi A, Olinski R, Dizdaroglu M. DNA damage products (5'R)- and (5'S)-8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosines as potential biomarkers in human urine for atherosclerosis. *Biochemistry*, 2012, 51: 1822–1824.

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

Kasai H. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat Res*, 1997, 387: 147- 163.

Killedar S, DiRosario J, Divers E, Popovich PG, McCarty DM, Fu H. Mucopolysaccharidosis IIIB, a lysosomal storage disease, triggers a pathogenic CNS autoimmune response. *J Neuroinflammation*, 2010, 7:39.

Kirschbaum B. Correlative studies of urine fluorescence and free radical indicators. *Clin Nephrol*, 2002, 58(5): 344-349.

Lankaster BJA, Whitehouse M, Gargan MF. Morquio syndrome. *Curr Orthop*, 2006, 20: 128–131.

Laradi S, Tukul T, Khediri S, Shabbeer J, Erazo M, Chkioua L, Chaabouni M, Ferchichi S, Miled A, Desnick RJ. Mucopolysaccharidosis type IV: N-Acetylgalactosamine-6-sulfatase mutations in Tunisian patients. *Mol Genet Metab*, 2006, 87: 213–218.

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

Liao W, McNutt MA, Zhu WG. The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods*, 2009, 48: 46–53.

Lipiello L, Mankin HJ. Thin-layer chromatographic separation of the isomeric chondroitin sulfates, dermatan sulfate, and keratan sulfate. *Anal Biochem*, 1971, 39: 54-58.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, 193: 265-275.

Luzio JP, Pryor PR, Bright NA. Lysosomes: fusion and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8: 622–632.

Mabe P, Leistner S, Schwartz I, Matte U, Giugliani R. Errores innatos Del metabolismo lisosomal. In: Colombo M, Cornejo V, Raimann E (Eds.). *Errores innatos en el metabolismo del niño*. Santiago de Chile: Editorial Universitaria, 2003, 2^a edición, 225-256.

Martell L, Lau K, Miranda M, Burnett V, Decker C, Foehr ED. Biomarker analysis of Morquio syndrome: identification of disease state and drug responsive markers. *Orphanet J Rare Dis*, 2011, 6: 84.

Martins AM. Inborn errors of metabolism: a clinical overview. *Sao Paulo Med J*, 1999, 117(6): 251-265.

Martins AM. *Erros Inatos do Metabolismo: Abordagem Clínica*, 2^a ed. São Paulo, 2003.

Masue M, Sukegawa K, Orii T, Hashimoto T. N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase in human placenta: purification and characteristics. *J Biochem*, 1991, 110: 965–970

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

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

Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci*, 1993, 84: 407-412.

Montaño AM, Tomatsu S, Gottesman GS, Smith M, Orii T. International Morquio A Registry: Clinical manifestation and natural course of Morquio A disease. *J Inher Metab Dis*, 2007, 30: 165–174.

Morgan AJ, Platt FM, Lloyd-Evans E, Galione A. Molecular mechanisms of endolysosomal Ca²⁺ signalling in health and disease. *Biochem J*, 2011, 439: 349–374.

Morrone A, Caciotti A, Atwood R, Davidson K, Du C, Francis-Lyon P, Harmatz P, Mealiffe M, Mooney S, Oron TR, Ryles A, Zawadzki KA, Miller N. Morquio A Syndrome-Associated Mutations: A Review of Alterations in the *GALNS* gene and a New Locus-Specific Database. *Hum Mutat*, 2014, 35(11): 1271-1279.

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

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

Nakanishi S, Suzuki G, Kusunoki Y, Yamane K, Egusa G, Kohno N. Increasing of oxidative stress from mitochondria in type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab Res Rev*, 2004, 20:399–404.

Nakashima Y, Tomatsu S, Hori T, Fukuda S, Sukegawa K, Kondo N, Suzuki Y, Shimozawa Y, Orii T. Mucopolysaccharidosis IVA: molecular cloning of the human N-acetylgalactosamine-6-sulfatase (*GALNS*) gene and analysis of the 5' N-flanking region. *Genomics*, 1994, 20: 99–104.

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

Negretto GW, Deon M, Burin M, Biancini GB, Ribas G, Garcia SC, Goethel G, Fracasso R, Giugliani L, Giugliani R, Vargas CR. In vitro effect of genistein on DNA

damage in leukocytes from mucopolysaccharidosis IVA patients. *Mol Genet Metab*, 2014b, 111: 205-208.

Nelson J. Incidence of the mucopolysaccharidoses in Northern Ireland. *Hum Genet*, 1997, 101: 355–358.

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

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

Neufeld EF, Muenzer J. The Mucopolysaccharidoses. Em: Valle D, Beaudet AL, Vogelstein B, Kinzler KW, Antonarakis SE, Ballabio A, Gibson K, Mitchell G. eds. *OMMBID - The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*. McGraw-Hill Inc., New York, 2014.

Ohmi K, Greenberg DS, Rajavel KS, Ryazantsev S, Li HH, Neufeld EF. Activated microglia in cortex of mouse models of mucopolysaccharidoses I and IIIB. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(4): 1902–1907.

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

Pennock CA. A review and selection of simple laboratory methods used for the study of glycosaminoglycan excretion and the diagnosis of the mucopolysaccharidoses. *J Clin Pathol*, 1976, 29: 111-123.

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

Platt FM, Boland B, van der Spoel AC. Lysosomal storage disorders: The cellular impact of lysosomal dysfunction. *J Cell Biol*, 2012, 199(5): 723–734.

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

Pshezhetsky AV, Potier M. Association of N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase with the multienzyme lysosomal complex of beta-galactosidase, cathepsin A, and neuraminidase. Possible implication for intralysosomal catabolism of keratan sulfate, *J Biol Chem*, 1996, 271: 28359–28365.

Ramos-Vasconcelos GR, Alves ALH, Hermes-Lima M. Radicais livres, antioxidantes e a adaptabilidade animal. Em: *O Que é Vida: Para Entender a Biologia do Século*

XXI, 9: 209-231. Editado por El-Hani CN e Videira AAP. Editora Relume Dumará, Rio de Janeiro, 2000, 209-331.

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

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

Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Meth Enzymol*, 1994, 233: 357-363.

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

Rodríguez A, Espejo AJ, Hernández A, Velásquez OL, Lizaraso LM, Cordoba HA, Sánchez OF, Alméciga-Díaz CJ, Barrera LA. Enzyme replacement therapy for Morquio A: an active recombinant N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase produced in *Escherichia coli* BL21. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2010, 37: 1193–1201.

Saftig P, Klumperman J. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10: 623–635.

Sanseverino MTV, Wajner M, Giugliani R. Aplicação de um protocolo clínico-laboratorial para identificação de erros inatos do metabolismo em crianças gravemente enfermas. *J Pediatr*, 2000, 76(5): 375-382

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

Schulpis KH, Tsakiris S, Traeger-Synodinos J, Papassotiriou I. Low total antioxidant status is implicated with high 8-hydroxy-2-deoxyguanosine serum concentrations in phenylketonuria. *Clin Biochem*, 2005, 38(3):239-42.

Schweighardt B, Tompkins T, Lau K, Jesaitis L, Qi Y, Musson DG, Farmer P, Haller C, Shaywitz AJ, Yang K, O'Neill CA. Immunogenicity of Elosulfase Alfa, an Enzyme Replacement Therapy in Patients With Morquio A Syndrome: Results From MOR-004, a Phase III Trial. *Clin Ther*, 2014 – ARTICLE IN PRESS.

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

ShenSaito S, Yamauchi H, Hasui Y, Kurashige J, Ochi H, Yoshida K. Quantitative determination of urinary-8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) by using ELISA. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, 2000, 107: 39-44.

Simonaro CM, Haskins ME, Schuchman EH. Articular chondrocytes from animals with a dermatan sulfate storage disease undergo a high rate of apoptosis and release nitric oxide and inflammatory cytokines: a possible mechanism underlying degenerative joint disease in the mucopolysaccharidoses. *Lab Invest*, 2001, 81: 1319-1328.

Simonaro CM, D'Angelo M, He X, Eliyahu E, Shtraizent N, Haskins ME, Schuchman EH. Mechanism of glycosaminoglycan-mediated bone and joint disease: implications for the mucopolysaccharidoses and other connective tissue diseases. *Am J Pathol*, 2008, 172(1): 112–122.

Simonaro CM, Ge Y, Eliyahu E. Involvement of the Toll-like receptor 4 pathway and use of TNF-alpha antagonists for treatment of the mucopolysaccharidoses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(1): 222–227.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individuals cells. *Exp Cell Res*, 1988, 175: 184-191.

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

Souza ICN. Triagem urinária para erros inatos do metabolismo em crianças com atraso no desenvolvimento [Tese – Mestrado]. São Paulo (SP): Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina; 2002.

Souza CFM, Schwartz IV, Giugliani R. Triagem neonatal de distúrbios metabólicos. *Ciência & Saúde Coletiva*, 2002, 7(1): 129-137.

Subash P, Gurusurthy P, Sarasabharathi A, Cherian KM. Urinary 8-OHdG: A marker of oxidative stress to DNA and total antioxidant status in essential hypertension with south Indian population. *Indian J Clin Biochem*, 2010, 25: 127–132.

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

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

Tessitore A, Pirozzi M, Auricchio A. Abnormal autophagy, ubiquitination, inflammation and apoptosis are dependent upon lysosomal storage and are useful biomarkers of mucopolysaccharidosis VI. *Pathogenetics*, 2009, 2:4.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*, 2000, 35: 206–221.

Tomatsu S, Fukuda S, Masue M, Sukegawa K, Fukao T, Yamagishi A, Hori T, Iwata H, Ogawa T, Nakashima Y, Hanyu Y, Hashimoto T, Titani K, Oyama R, Suzuki M, Yagi K, Hayashi Y, Orii T. Morquio disease: isolation, characterization and expression of full-length cDNA for human N-Acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase, *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, 181: 677–682.

Tomatsu S, Montaña AM, Oguma T, Dung VC, Oikawa H, de Carvalho TG, Gutiérrez ML, Yamaguchi S, Suzuki Y, Fukushi M, Kida K, Kubota M, Barrera L, Orii T. Validation of keratan sulfate level in mucopolysaccharidosis type IVA by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Inher Metab Dis*, 2010, 33 (Suppl 3): S35-42.

Tomatsu S, Montaña AM, Oikawa H, Smith M, Barrera L, Chinen Y, Thacker MM, Mackenzie WG, Suzuki Y, Orii T. Mucopolysaccharidosis Type IVA (Morquio A Disease): clinical Review and current treatment. *Curr Pharm Biotechnol*, 2011, 12(6): 931-945.

Valko M, Leibfritz D, Moncola J, Cronin M, Mazura M, Telser I. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39(1): 44-84.

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

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

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

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

Zheng M, Storz G. Redox sensing by prokaryotic transcription factors. *Biochem Pharmacol*, 2000, 59(1):1-6.

Waber L. Inborn errors of metabolism. *Ped Ann*, 1990, 19(2): 105-118.

Wang JY, Roehrl MH. Glycosaminoglycans are a potential cause of rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99:14362-14367.

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

Wood TC, Harvey K, Beck M, Burin MG, Chien YH, Church HJ, D'Almeida V, van Diggelen OP, Fietz M, Giugliani R, Harmatz P, Hawley SM, Hwu WL, Ketteridge D, Lukacs Z, Miller N, Pasquali M, Schenone A, Thompson JN, Tylee K, Yu C, Hendriksz CJ. Diagnosing mucopolysaccharidosis IVA. *J Inherit Metab Dis*, 2013, 36: 293-307.

Wraith JE. The Mucopolysaccharidosis: A clinical review and guide to management. *Arch Dis Chil*, 1995, 75: 263 -267.

Wraith JE. Limitations of enzyme replacement therapy: Current and future. *J Inherit Metab Dis*, 2006, 29: 442–447.

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

Wu LL, Chiou CC, Chang PY, Wu JT. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta*, 2004, 339: 1–9.

8. ANEXOS

8.1 ANEXO 1- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PACIENTES COM MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO IVA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PACIENTES COM MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO IVA

Você, portador de Mucopolissacaridose tipo IVA (MPS IVA), está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa intitulado “Investigação dos Biomarcadores de Estresse Oxidativo em pacientes portadores de mucopolissacaridose tipo IVA submetidos à terapia de reposição enzimática”. O presente projeto de pesquisa tem por objetivo verificar os efeitos da ação dos radicais livres (por exemplo, formados por radiação solar) e de substâncias antioxidantes (por exemplo, vitaminas) em pacientes com mucopolissacaridose tipo IVA. Também será avaliado o efeito da terapia de reposição enzimática utilizada para esta doença sobre a ação destas substâncias antioxidantes e dos radicais livres. Os dados necessários para a realização do projeto serão obtidos através de entrevistas realizadas com você (portador de MPS IVA) e/ou seus responsáveis legais, das coletas de sangue periférico e urina. Estes dados serão coletados nos dias de consultas rotineiras, não sendo necessário o seu comparecimento em consultas extras. Caso sejam necessários dados adicionais estes serão obtidos no seu prontuário do Hospital.

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

Os riscos e desconfortos causados pela coleta de material biológico para o estudo são semelhantes aos envolvidos na coleta de sangue e urina para exames laboratoriais de rotina. O material coletado será utilizado única e exclusivamente para fins do projeto de pesquisa, sendo garantido o sigilo das informações obtidas e que o indivíduo, ou seja, você terá acesso às mesmas. Os materiais coletados não serão armazenados em banco de material biológico e os resultados obtidos serão agrupados e expressos através de resultados

numéricos, sem qualquer referência a elementos que possam identificar as pessoas que participaram do estudo.

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

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

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

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

Data:_____

Nome:_____

Nome do responsável legal:_____

Assinatura:_____

Nome do pesquisador:_____

Assinatura do pesquisador:_____

8.2 ANEXO 2- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PACIENTES CONTROLE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PACIENTES CONTROLES

Você está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa intitulado “Investigação dos Biomarcadores de Estresse Oxidativo em pacientes portadores de mucopolissacaridose tipo IVA submetidos à terapia de reposição enzimática”. O presente projeto de pesquisa tem por objetivo verificar os efeitos da ação dos radicais livres (por exemplo, formados por radiação solar) e de substâncias antioxidantes (por exemplo, vitaminas) em pacientes com a doença genética mucopolissacaridose tipo IVA. Também será avaliado o efeito da terapia de reposição enzimática utilizada para esta doença sobre a ação destas substâncias antioxidantes e dos radicais livres.

Para que este estudo seja realizado, é necessária uma comparação entre um grupo de pacientes que apresentam a doença com um grupo de pacientes que não apresentam. Você, portanto, está sendo convidado a participar deste estudo como controle, ou seja, como não portador de mucopolissacaridose tipo IVA. Os dados necessários para a realização do projeto serão obtidos através de entrevistas realizadas com você e/ou seus responsáveis legais, das coletas de sangue periférico e urina. Estes dados serão coletados nos dias de consultas rotineiras, não sendo necessário o seu comparecimento em consultas extras.

Para participar, você fará coleta de sangue e urina, juntamente com as coletas solicitadas rotineiramente pelo seu médico. Os riscos e desconfortos causados pela coleta de material biológico para o estudo são semelhantes aos envolvidos na coleta de sangue para exames laboratoriais de rotina. A sua participação neste estudo não trará benefício direto a você, porém, os dados advindos com a sua doação são de importância científica relevante para o estabelecimento de novos tratamentos para esta doença, bem como para o melhor entendimento desta patologia. O material coletado será única e exclusivamente utilizado para fins do projeto de pesquisa, sendo reservado a

você o acesso às mesmas. Além disso, o material coletado não será armazenado em banco de material biológico.

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

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

Caso você queira retirar-se em definitivo da pesquisa, terá total liberdade para fazê-lo, sem que isso prejudique futuros atendimentos no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

O seu material (sangue) coletado, após análise, será destruído e os seus dados excluídos do nosso banco de dados.

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

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

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

Data: _____

Nome: _____

Nome do responsável legal: _____

Assinatura: _____

Nome do pesquisador: _____

Assinatura do pesquisador: _____

8.3 ANEXO 3- COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



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

COMISSÃO CIENTÍFICA

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

Projeto: 130246

Data da Versão do Projeto:

Pesquisadores:

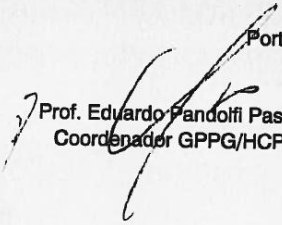
ROBERTO GIUGLIANI
LUCIANA GIUGLIANI
ANDRESSA FEDERHEN
CARMEN REGLA VARGAS
TATIANE GRAZIELI HAMMERSCHMIDT
GRAZIELA DE OLIVEIRA SCHMITT RIBAS
DESIREE PADILHA MARCHETTI
BRUNA DONIDA

Título: Investigação dos Biomarcadores de Estresse Oxidativo em pacientes portadores de mucopolissacaridose tipo IV submetidos à terapia de reposição enzimática

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

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

Porto Alegre, 10 de dezembro de 2013.


Prof. Eduardo Pandolfi Passos
Coordenador GPPG/HCPA