

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR**

**INVESTIGAÇÃO DA AUTOIMUNIDADE EM
CAMUNDONGOS COM MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO I**

Talita Giacomet de Carvalho

**Orientador: Prof. Roberto Giugliani
Co-orientadora: Profa. Ursula Matte**

Porto Alegre, março de 2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
E BIOLOGIA MOLECULAR**

**INVESTIGAÇÃO DA AUTOIMUNIDADE EM
CAMUNDONGOS COM MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO**

Talita Giacomet de Carvalho

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

**Orientador: Prof. Roberto Giugliani
Co-orientadora: Profa. Ursula Matte**

Porto Alegre, março de 2012

AGRADECIMENTOS

Ao professor Roberto Giugliani pela orientação, pelas oportunidades oferecidas, e por ter confiado no meu trabalho.

À professora Ursula Matte pela orientação, confiança, idéias, atenção, paciência, e por tornar tudo mais simples.

Aos colegas do Centro de Terapia Gênica pela amizade, carinho, conversas, ajudas e companheirismo.

Aos demais colegas do Centro de Pesquisas, em especial ao pessoal da UEA, à Priscila, do LDAI e aos guris do VAP, pelo apoio e auxílio com as técnicas.

À Val, por toda a ajuda com os experimentos e pela amizade.

À Bim, pelo apoio de sempre, ajuda, companheirismo e amizade.

Aos colegas da Biomedicina, em especial à Bim, Ana, Duda, Fer e Daia, que mesmo sem a convivência diária dos anos de faculdade, continuam sempre presentes.

Aos demais amigos que de alguma forma me ajudaram a chegar até aqui.

Aos professores do PPGBM pelos conhecimentos repassados durante esse período.

Ao Elmo por estar sempre disposto a ajudar.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre pela infraestrutura essencial ao desenvolvimento deste trabalho.

À minha família, por tudo.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1. Doenças lisossômicas.....	10
1.2. Glicosaminoglicanos e a matriz extracelular.....	12
1.3. Mucopolissacaridose tipo I.....	13
1.4. Doenças lisossômicas e imunidade.....	17
2. OBJETIVOS.....	21
2.1. Objetivo geral.....	21
2.2. Objetivos específicos.....	21
3. ARTIGO CIENTÍFICO.....	22
4. DISCUSSÃO.....	42
5. CONCLUSÕES.....	46
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tipos de Mucopolissacaridoses, epônimo, substato armazenado e enzima deficiente.....	12
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Rota de degradação do dermatan sulfato e heparan sulfato.....	15
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

CD: do inglês *cluster of differentiation*

ConA: Concanavalina A

CS: Condroitin sulfato

DL: Doenças lisossômicas

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DS: Dermatan sulfato

GAGs: Glicosaminoglicanos

GFAP: Proteína glial fibrilar ácida

HLA: Antígeno leucocitário humano

HS: Heparan sulfato

IDUA: alfa-L-iduronidase

IFN α : Interferon α

IgG: Imunoglobulina G

IL: Interleucina

kDa: Quilodalton

KS: Keratan sulfato

M6P: Manose-6-fosfato

MHC: do inglês *Major Histocompatibility Complex*

MPS I: Mucopolissacaridose tipo I

MPS II: Mucopolissacaridose tipo II

MPS III: Mucopolissacaridose tipo III

MPS IIIB: Mucopolissacaridose tipo III B

MPS IV: Mucopolissacaridose tipo IV

MPS VI: Mucopolissacaridose tipo VI

MPS VII: Mucopolissacaridose tipo VII

MPS IX: Mucopolissacaridose tipo IX

MPS: Mucopolissacaridoses

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

OMIM – do inglês *Online Mendelian Inheritance in Man*

PVDF: do inglês *polyvinylidene difluoride*

SNC: Sistema nervoso central

TCTH: Transplante de células tronco hematopoiéticas

TNF α : do inglês *Tumor necrosis fator α*

TRE: Terapia de reposição enzimática

wt: do inglês *wild type*

RESUMO

A mucopolissacaridose tipo I (MPS I) é uma doença herdada de forma autossômica recessiva. É causada pela deficiência da enzima alfa-L-iduronidase, que leva ao acúmulo intralissossômico de heparan e dermatan sulfato. Os sintomas são heterogêneos e pacientes com a forma mais grave da doença têm alterações neurocognitivas. O mecanismo de patogênese ainda é, em grande parte, desconhecido. Entretanto, há evidências crescentes da participação de alterações do sistema imune neste processo. O objetivo deste trabalho foi investigar a ocorrência de resposta autoimune e sua contribuição para os sintomas clínicos de camundongos com MPS I. Para verificar a ocorrência de autoantígenos em camundongos MPS I, extratos de proteína do hipocampo e fígado foram submetidos a western blot, e soro de camundongos afetados e normais foi usado como anticorpo primário. Os resultados mostraram que não há diferença entre animais normais e MPS I, indicando ausência de autoantígenos patológicos. Para verificar ativação anormal de células T em camundongos MPS I, linfócitos foram ativados com Concanavalina A e a proliferação foi verificada por ensaio de MTT. Os resultados mostraram proliferação normal de células T nos camundongos afetados. Para verificar o potencial patogênico de células T de animais MPS I, linfócitos destes foram ativados e transferidos para camundongos normais, que foram então submetidos a testes comportamentais para verificar atividade exploratória, locomoção e atividade cerebelar. Para isso foram utilizados testes de campo aberto e análise de caminhada. Os resultados obtidos mostraram comportamento similar ao de animais do grupo controle, que recebeu linfócitos de camundongos normais, e também de camundongos normais que não sofreram intervenção. Os receptores de linfócitos MPS I também não apresentaram evidência de neuroinflamação, resultado demonstrado por meio de imunohistoquímica para GFAP. Com os resultados obtidos neste trabalho sugere-se que características autoimunes não apresentam uma contribuição significativa para a patogênese da MPS I. Isso, porém, não exclui a existência de outras alterações imunológicas nesta doença. Por isso, uma caracterização mais detalhada do perfil imunológico de camundongos com MPS I é necessária.

ABSTRACT

Mucopolysaccharidosis type I (MPS I) is an autosomal recessive disorder caused by the deficiency of alpha-L-iduronidase, leading to accumulation of heparan sulfate and dermatan sulfate within the lysosome. The clinical signs are heterogeneous, and patients with the severe form of disease exhibit neurological impairment. The mechanism of pathogenesis is unknown, but there is increasing evidence of the participation of immune system abnormalities on the pathology of MPS I. Therefore we conducted a study to verify the occurrence of autoimmune response and its contribution to the clinical symptoms of MPS I mice. Western blot analysis of protein extracts from liver and hippocampus demonstrated that there are no putatives autoantigens exclusive of MPS I mice. Lymphocyte proliferation assays showed normal T-cell activation in these animals. Lymphocyte transfer from MPS I mice to normal mice did not cause any damage to the central nervous system of receptor mice detectable by behavioral tests. Receptor animals also did not show signs of neuroinflammation, demonstrated by GFAP staining. The present study suggests that autoimmune reactions are not involved in the pathogenesis of MPS I. However the existence of other immune system abnormalities cannot be excluded. Therefore a more detailed characterization of immune profile of MPS I mice is required.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doenças lisossômicas

Os lisossomos são organelas envoltas por membrana responsáveis pela degradação de diferentes substratos dentro das células eucarióticas. Este processo catabólico é realizado por mais de 60 enzimas solúveis presentes em seu lúmen. Todas são hidrolases ácidas. Proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos e sacarídeos estão entre as macromoléculas celulares que chegam ao lisossomo por meio de endocitose, fagocitose, autofagia ou outras rotas para serem degradadas. Estes substratos sofrem sucessivas hidrólises em ligações específicas por meio da ação gradual de enzimas individuais. Se um membro da cascata enzimática estiver deficiente a sequência de degradação é interrompida (Schultz et al., 2011).

As doenças lisossômicas (DL) são um grupo de doenças herdadas que abrangem aproximadamente 50 patologias. São erros inatos do metabolismo que possuem uma fisiopatologia comum, na qual há deficiência total ou parcial de uma enzima específica envolvida nas vias de degradação de macromoléculas no lisossomo (Giugliani, 2012). São normalmente monogênicas, e para a maioria delas um grande número de mutações no mesmo gene em pacientes diferentes já foram descritas. Algumas mutações causam a perda total da atividade enzimática, enquanto outras apenas reduzem esta atividade. Entretanto, correlações genótipo-fenótipo foram estabelecidas em poucos casos, e para a maioria dos pacientes a predição do curso clínico da doença não pode ser feita com base na análise da mutação (Futerman and van Meer, 2004).

Apesar da grande heterogeneidade de sintomas, a maioria destas doenças caracteriza-se por seu curso progressivo. A maior parte dos pacientes é assintomática ao nascimento e apresenta os primeiros sintomas durante a infância. As DL apresentam alta morbidade que reduz, às vezes drasticamente, o tempo de vida. A sua frequência varia em diferentes regiões e populações. Apesar de individualmente raras, sua prevalência conjunta estimada varia de 1:4000 a 1:9000 nascidos vivos (Giugliani, 2012). Em adultos as doenças de Gaucher (OMIM #230800), Fabry (OMIM #301500) e Niemann-Pick tipo A (OMIM #257200) são as DL mais comuns (Wilcox, 2004). Convencionalmente as DL são agrupadas pelo nome químico dos substratos não degradados que se acumulam, em esfingolipidoses, mucopolissacaridoses, glicoproteinoses e outras.

As mucopolissacaridoses (MPS) são DL causadas pela deficiência na atividade de enzimas que degradam glicosaminocanos (GAGs), principais componentes da matriz extracelular. São caracterizadas bioquimicamente pelo acúmulo de GAGs parcialmente degradados nos lisossomos e pela elevação destes na urina, no sangue e no líquido (Muenzer, 2011).

As manifestações clínicas incluem principalmente rigidez articular, malformações ósseas, retardo de crescimento, alterações pulmonares, oculares, hepáticas e cardíacas, além de anormalidades neurológicas (Lehman et al., 2011). Já foram descritas 7 formas principais de MPS, que se diferenciam principalmente pela enzima deficiente, e que são classificadas numericamente de MPS I a IX, sendo que as MPS V e VIII são inexistentes. Com exceção da MPS II, que tem herança ligada ao cromossomo X, todas as outras MPS são herdadas de forma autossômica recessiva (Tabela 1).

Tabela 1: Tipos de Mucopolissacaridoses, epônimo, substato armazenado e enzima deficiente.

Tipo de MPS	Epônimo	GAG acumulado	Enzima deficiente
MPS I	Hurler, Hurler-Scheie Scheie	DS, HS	α -L-iduronidase
MPS II	Hunter	DS, HS	iduronato sulfatase
MPS III	Sanfilippo, tipos A-D	HS	A: heparan-N-sulfatase B: α -N-acetilglicosaminidase C: acetil-CoA: α -glicosaminida-N-acetiltransferase D: N-acetilglicosamina-6-sulfatase
MPS IV	Morquio, tipos A e B	A: KS, CS B: KS	A: N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatase B: β -galactosidase
MPS VI	Maroteaux-Lamy	DS	arilsulfatase B
MPS VII	Sly	DS, HS, CS	β -glucuronidase
MPS IX	Deficiência de hialuronidase	Desconhecido	hialuronidase

DS: Dermatan sulfato; HS: Heparan sulfato; KS: Keratan sulfato; CS: Condroitin sulfato

1.2. Glicosaminoglicanos e a matriz extracelular

A matriz extracelular é uma rede complexa de macromoléculas que preenche o espaço extracelular. É composta por uma grande variedade de proteínas e polissacarídeos que são secretados localmente e formam uma rede organizada, em estreita associação com a superfície celular que os produz. A matriz desempenha um papel complexo na regulação do comportamento das células, influenciando seu desenvolvimento, migração, proliferação, forma e função (Jun e Lau, 2011).

Duas principais classes de macromoléculas extracelulares formam a matriz extracelular. Uma delas é formada pelas proteínas fibrosas, que incluem o colágeno, a elastina, a fibronectina e a laminina, e exercem funções adesivas e estruturais. A outra classe é representada pelos GAGs, que estão, normalmente, ligados a proteínas na forma de proteoglicanos (Kim et al., 2011).

Os glicosaminoglicanos são cadeias polissacarídicas não ramificadas, compostas por unidades dissacarídicas repetidas e carregadas negativamente, com peso molecular variando de 10 a 100 kDa. Elas recebem este nome porque um dos dois açúcares no sacarídeo repetido é um amino açúcar (N-acetilglicosamina ou N-acetilgalactosamina) o qual, na maioria das vezes, é sulfatado. O segundo açúcar é normalmente um ácido urônico (glucurônico ou idurônico). Quatro principais grupos de GAGs são distinguidos, de acordo com seus açúcares e o número e localização do grupo sulfato: (1) hialuronan, (2) condroitin sulfato e dermatan sulfato, (3) heparan sulfato e (4) queratan sulfato (Kim et al. 2011).

As moléculas de GAGs interagem com uma grande variedade de proteínas envolvidas em processos fisiológicos e patológicos. Já foram chamadas de mucopolissacarídeos, devido a sua viscosidade, propriedades lubrificantes, e por estarem presentes em secreções mucosas (Gandhi e Mancera, 2008). Além das funções de sustentação, permeabilidade e organização da estrutura da matriz extracelular, os GAGs também interferem na estabilidade e atividade de proteínas, e atuam como moléculas sinalizadoras no matriz (Clarke, 2011). Portanto alterações na composição de GAGs podem ter consequências diversas em um organismo.

Os GAG são degradados por diversas enzimas lisossômicas que atuam em sequência (Winchester, 1996), formando monossacarídeos e sulfatos inorgânicos

(Hopwood e Morris, 1990). O heparan sulfato é composto principalmente por ácido glicurônico e glicosaminas, estando presente em proteoglicanos associados à membrana plasmática de diversos tipos celulares, inclusive de neurônios (Maeda et al., 2011). O dermatan sulfato é composto principalmente por ácido L-idurônico e N-acetilgalactosamina sulfatada e está presente na matriz em tecidos conectivos, como tendões e válvulas cardíacas (Hopwood e Morris, 1990).

1.3. Mucopolissacaridose tipo I

A MPS I é causada pela deficiência na atividade da enzima lisossômica alfa-L-iduronidase (IDUA; EC 3.2.1.76), que leva ao acúmulo de seus substratos catabólicos DS e HS nos tecidos (D'Aco et al., 2012) (Figura 1). É uma doença crônica, progressiva, com manifestações clínicas heterogêneas. É historicamente classificada clinicamente em 3 síndromes, de acordo com a idade de aparecimento dos sintomas, a velocidade de progressão e a presença e grau de comprometimento neurológico (Pastores et al., 2007). Entretanto, as manifestações clínicas se apresentam dentro de um espectro contínuo de variabilidade fenotípica, e a maioria dos pacientes têm características intermediárias, o que torna difícil a classificação em uma das 3 divisões (Muñoz-Rojas et al., 2011).

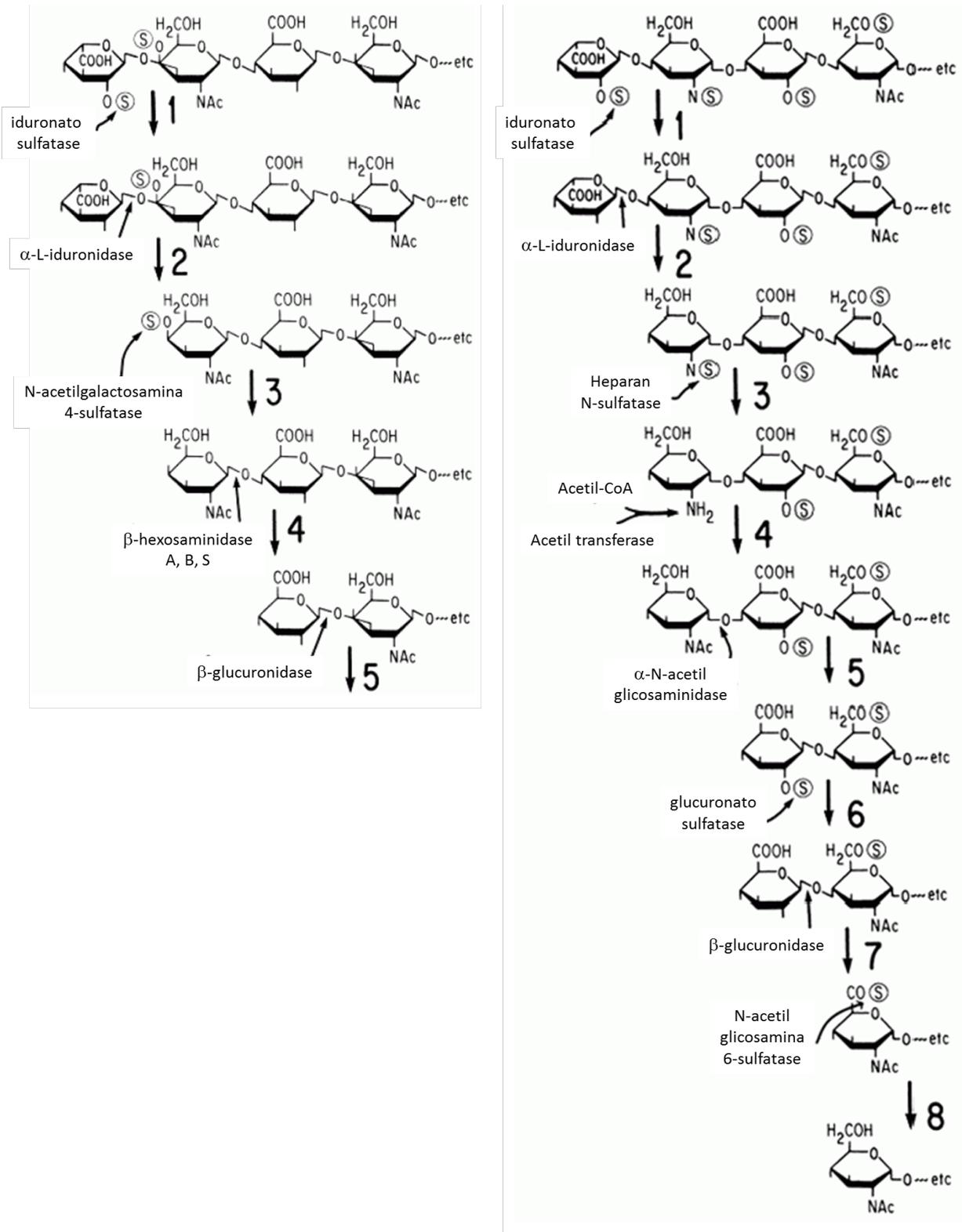


Figura 1: Rota de degradação do dermatan sulfato (esquerda) e heparan sulfato (direita). A deficiência da atividade enzimática da enzima alfa-L-iduronidase, segunda enzima na cascata, causa a Mucopolissacaridose tipo I. Adaptado de Neufeld e Muenzer, 2001.

Nos pacientes que desenvolvem os sintomas mais graves da MPS I, fenótipo historicamente chamado de síndrome de Hurler (OMIM #607014), as manifestações clínicas sistêmicas aparecem no primeiro ano de vida, e progridem com aparecimento de defeitos cognitivos, doença valvular cardíaca, anormalidades respiratórias e esqueléticas, rigidez nas articulações, hepatoesplenomegalia e opacidade da córnea, o que leva à morte precoce usualmente antes dos 10 anos de vida (Giugliani et al., 2010). Pacientes com a forma mais atenuada da doença, síndrome de Scheie (OMIM#607016), não apresentam manifestações neurológicas. Os sintomas incluem, em intensidade variável, rigidez articular, valvulopatia aórtica, opacidade da córnea e outras complicações, como surdez, hérnia umbilical e inguinal e glaucoma, e aparecem mais tardiamente na infância. Os afetados geralmente sobrevivem até a idade adulta (Tomatsu et al., 2010). A forma intermediária da doença, síndrome de Hurler-Scheie (OMIM #607015), tem pouca ou nenhuma alteração cognitiva, e sobrevivência até a adolescência ou início da fase adulta, sendo as complicações cardíacas e a obstrução das vias aéreas superiores as principais causas de morte (Neufeld e Muenzer, 2001).

A incidência mundial estimada da MPS I é de 1 caso pra cada 100.000 nascidos vivos. Aproximadamente 50 a 80% dos pacientes têm a forma mais grave da doença (Muenzer et al., 2009). Entretanto, esta estimativa pode não estar totalmente correta, já que os casos mais graves são mais facilmente diagnosticados do que os casos atenuados. No Brasil a incidência geral de MPS I de 1:106000 nascidos vivos (Beiguelman, 1994). O diagnóstico inicial da MPS I é baseado no reconhecimento dos sintomas clínicos e em testes bioquímicos para detecção de GAGs na urina e ensaios enzimáticos. Estes são realizados em fibroblastos cultivados, plasma ou leucócitos e utilizam substratos fluorescentes específicos para IDUA. A deficiência na atividade da enzima e a excreção aumentada de GAGs urinários estão presentes em todos os pacientes, mas não são preditores da gravidade da doença. Por meio da análise de DNA dos pacientes é possível determinar quais são as mutações causadoras da doença, e em alguns casos, estabelecer correlações genótipo-fenótipo (Matte et al., 2003, Sugawara et al., 2008). Entretanto, das mais de 100 mutações patogênicas já descritas, a maioria delas é única e ainda não caracterizada (D'Aco et al., 2012).

Antes do desenvolvimento de terapias específicas para a doença, o tratamento da MPS I era paliativo e baseado em sintomas. Atualmente existem duas opções de

tratamento, o transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) e terapia de reposição enzimática (TRE), porém nenhuma é totalmente eficaz e curativa.

O transplante de células tronco hematopoiéticas foi primeiramente utilizado em pacientes com síndrome de Hurler em 1981 (Hobbs et al., 1981), e desde então mais de 500 pacientes já foram tratados com esta técnica. No TCTH, são transplantadas células tronco da medula óssea ou do cordão umbilical de doadores saudáveis. A IDUA produzida por estas células é liberada no plasma do paciente e pode ser internalizada pelas células que não a produzem através de receptores específicos para enzimas lisossômicas, os receptores de manose-6-fosfato (M6P). Quando bem sucedido, o TCTH pode prolongar a vida do paciente, preservar a neurocognição e melhorar as alterações somáticas. Um ano após o transplante, em muitos casos, é possível observar redução da hepatoesplenomegalia, das características fenotípicas faciais, da rigidez articular, da apneia do sono e melhora dos problemas cardíacos e da audição (Martins et al., 2009). Entretanto, devido aos riscos associados a este procedimento, entre eles a possibilidade de desenvolvimento da doença do enxerto contra o hospedeiro, ele só é recomendado para pacientes com a forma grave da MPS I e que tenham menos de 2 anos de idade, o que ressalta a importância do diagnóstico precoce. Outras limitações do tratamento são a dificuldade de encontrar doadores HLA compatíveis, o aparecimento de quimerismo nos pacientes e a falta de efeito sobre as deformidades ósseas e neurológicas já existentes (Giugliani et al., 2010).

A terapia de reposição enzimática consiste na administração da enzima deficiente por meio de repetidas injeções intravenosas. Em 1990 os pacientes com doença de Gaucher foram os primeiros beneficiados por este tratamento, que hoje também está disponível para doença de Fabry, doença de Pompe, MPS I, II e VI (Giugliani, 2012). A TRE também se baseia na internalização da IDUA por meio da ligação desta aos receptores de M6P presentes nas células do paciente. A enzima comercial utilizada para o tratamento de MPS I, laronidase (IDUA humana recombinante, Aldurazyme®, BioMarin/Genzyme, EUA), foi aprovada em 2003 para o tratamento das manifestações não neurológicas da doença. É a primeira opção de tratamento para pacientes com síndromes de Hurler-Scheie e Scheie, e também é utilizada em pacientes Hurler que não são candidatos a TCTH (Dickson et al., 2011). A laronidase deve ser administrada por via intravenosa semanalmente ou a cada duas semanas durante toda a vida do paciente. Entre os benefícios observados nas pessoas

tratadas com TRE estão melhora na mobilidade das articulações, na capacidade de caminhar, nas funções respiratória e cardíaca, redução do volume do fígado e do baço e redução da excreção de GAGs urinários (Valayannopoulos e Wijburg, 2011). Apesar de ser a opção terapêutica disponível mais segura, a TRE ainda tem limitações importantes. Entre elas estão as reações adversas apresentadas por alguns pacientes (cefaleia, dor abdominal, dispneia, calafrios, artralgia, hipertensão/hipotensão, reações de hipersensibilidade e exantema), e o alto custo para o sistema público de saúde (Souza et al., 2008). Entretanto o principal fator limitante da TRE é a incapacidade da enzima administrada passar a barreira hematoencefálica e assim atingir o sistema nervoso central e corrigir os sintomas neurológicos da doença (Giugliani et al., 2010).

Como tanto o TCTH quanto a TRE falham em corrigir alguns dos sintomas mais importantes observados em pacientes com MPS I, novas alternativas terapêuticas são necessárias e estão sendo investigadas, principalmente para o tratamento das formas mais graves da doença. Essas alternativas incluem a TRE intratecal (Muñoz-Rojas et al., 2008, Dickson & Chen, 2011), terapia gênica (Liu et al., 2005; Di Domenico et al., 2005; Wolf et al., 2011), microencapsulação celular (Matte et al., 2011; Baldo et al., 2011; Barsoum et al., 2003) e tradução alternativa (Keeling et al., 2001; Hein et al., 2004). Outras terapias alternativas que estão sendo investigadas em outras e no futuro podem ter aplicação para o tratamento da MPS I incluem a terapia de redução do substrato (Cox et al., 2000; Roberts et al., 2007; Piotrowska et al., 2008) e a administração de chaperonas farmacológicas (Maegawa et al., 2007; Okumiya et al., 2007; Frustaci et al., 2001).

Portanto, para muitos pacientes ainda não existe um tratamento definitivo, e as opções são limitadas ao tratamento dos sintomas. Sem o conhecimento detalhado dos mecanismos precisos que atuam na MPS I, é difícil desenvolver tratamentos eficazes. Novas alternativas terapêuticas devem aparecer quando as rotas bioquímicas e celulares que são afetadas pela doença forem desvendadas.

1.4. Doenças lisossômicas e imunidade

Desde que foi descrito por de Duve e colaboradores há mais de 50 anos, o papel do lisossomo, e principalmente sua relação com as doenças que resultam de falhas no

seu funcionamento têm sido amplamente investigadas. Um grande número de deficiências metabólicas em enzimas lisossômicas foram descritas, e bases genéticas e moleculares têm sido determinadas para várias delas. Entretanto, grande parte das relações entre a deficiência enzimática, o acúmulo do substrato, alterações bioquímicas e celulares secundárias e, por fim, os danos teciduais e aparecimento dos sintomas ainda são desconhecidas.

Além de seu papel essencial na degradação de diversas macromoléculas, os lisossomos também são fundamentais para o funcionamento normal do sistema imune, estando envolvidos no controle da transdução de sinal mediada por receptores de membrana. Portanto, o catabolismo de macromoléculas no lisossomo é importante para a função correta de diversas funções do sistema imune, incluindo o processamento e apresentação de antígenos via MHC, secreção de citocinas e fagocitose (Castaneda et al., 2008).

Estudos recentes têm demonstrado que em diversas DL são identificadas irregularidades na função do sistema imune. Modelos animais destas doenças apresentam alterações em parâmetros que são fundamentais para o bom funcionamento dos lisossomos e conseqüentemente do sistema imune. Estas incluem modificações no pH intralissossômico, em estados oxidativos/reduativos, e acúmulo de material não degradado. Qualquer uma destas alterações tem potencial para modificar a forma como antígenos são processados no compartimento lisossômico. Já foram demonstradas irregularidades imunológicas em DL que se manifestam tanto como imunossupressão (doença de Gaucher, Niemann-Pick, MPS VII e manosidose), quanto como hiperativação ou autoimunidade (Gangliosidose GM2, leucodistrofia de células globóides, Niemann-Pick tipo C1, MPS III) (Castaneda et al., 2008). Apesar de essas evidências existirem, a relação entre a modificação do compartimento lisossômico e a modulação do sistema imune, e a influência que estas alterações têm na patogênese das doenças, não está caracterizada.

Alguns trabalhos têm demonstrado que, para um grupo de DL, alterações em respostas imunes sistêmicas e neurológicas podem estar ligadas a manifestações neurocognitivas da doença. Estudos têm comprovado a existência de resposta inflamatória em cérebros de camundongos com MPS IIIB, doença de Sandhoff, deficiência múltipla de sulfatases e também com MPS I (Ohmi et al., 2003, German et al., 2002, Wada et al., 2000). Muitos componentes celulares e moleculares dos sistemas

imune inato e adaptativo têm sido relacionados a danos no sistema nervoso central (SNC), incluindo degeneração, desmielinização, autoimunidade, infecção e tumor. Astrócitos e células da microglia estão ativamente envolvidos em inflamação e possivelmente na apresentação de antígenos. Linfócitos reativos a antígenos neuronais e inflamação parecem ser responsáveis por dano tecidual, desmielinização e degeneração do SNC observados em pacientes com esclerose múltipla, encefalomielite aguda, e em um modelo animal de encefalomielite autoimune (Amor et al., 2010).

Recentes estudos em glicobiologia têm revelado a participação de GAGs e seus proteoglicanos na iniciação e controle de eventos associados à inflamação e autoimunidade. Dermatan sulfato tem alta afinidade por antígenos de células mortas ou apoptóticas, e quando associado a eles, estimula a expansão de linfócitos B-1a, que são células relacionadas a produção de autoanticorpos (Wang et al., 2011). Heparan sulfato interage com citocinas e quimiocinas, promove ativação de células T, células B, macrófagos, células dendríticas, e está envolvido no recrutamento de leucócitos para tecidos danificados (Dreyfuss et al., 2009). Além disso, é também um ligante de receptores Toll-like que pode desencadear autoimunidade (Marshak-Rothstein, 2006).

O modelo animal de MPS VII, que apresenta acúmulo de HS, DS e CS, é imunocomprometido, sendo os macrófagos as células mais afetadas. Além disso, esses animais apresentaram redução da produção de anticorpos após exposição a diferentes antígenos, e isso foi justificado pelo provável processamento incorreto de antígenos (Daly et al., 2000). Em um estudo realizado em camundongos com MPS IIIB, que apresentam acúmulo de HS, DiRosario e colaboradores (2009) demonstraram intensa participação das respostas imunes inata e adaptativa na neuropatologia da doença. A presença de anticorpos reagentes contra antígenos próprios do cérebro dos animais indica a ocorrência de reação autoimune que pode estar envolvida na patologia da doença, e que talvez seja comum a outros tipos de MPS. Outro estudo deste mesmo grupo também demonstrou que quando linfócitos isolados de camundongos com MPS IIIB são transplantados em camundongos normais, estes passam a apresentar resposta imune alterada, com presença de neuroinflamação e sinais clínicos de MPS IIIB, indicando a contribuição de um fator autoimune para a patologia da doença (Killedar et al., 2010). Tessitore e colaboradores (2009) também demonstraram a relação entre o acúmulo de GAGs e resposta imune alterada em camundongos com MPS VI. Além de alterações na autofagia, degradação de proteínas, função mitocondrial e apoptose, eles

detectaram, por meio de imunohistoquímica, a presença aumentada de CD68, que é uma molécula expressa principalmente por macrófagos e monócitos. Essa alteração estava presente somente em órgãos periféricos, o que condiz com a patologia da MPS VI, na qual não se observa acúmulo lisossômico no SNC.

Estudos com modelos animais de algumas DL sugerem que a manipulação de diferentes componentes do sistema imune pode ter benefícios terapêuticos (Wu et al. 2004; DiRosario et al., 2009). Entretanto, como o conhecimento sobre as rotas do sistema imune afetadas nestas doenças ainda é bastante incompleto, é difícil estabelecer alvos terapêuticos específicos para cada uma delas. Portanto, a caracterização das rotas afetadas é importante não só para o melhor entendimento da história clínica da doença, mas também para a identificação de novas formas de tratamentos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi verificar a formação de resposta autoimune e sua possível contribuição para o aparecimento dos sintomas em camundongos com MPS I.

2.2. Objetivos específicos

- Detectar o reconhecimento de autoantígenos hipocámpais e hepáticos por anticorpos presentes no soro de camundongos MPS I;

- Comparar a ativação de linfócitos após estímulo entre camundongos com MPS I e normais;

- Verificar se linfócitos transplantados de camundongos MPS I para camundongos normais são capazes de causar ativação de resposta imune e aparecimento de sinais da doença observáveis através de testes comportamentais e imunohistoquímica.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

LACK OF EVIDENCE FOR AUTOIMMUNE INVOLVEMENT IN MUCOPOLYSACCHARIDOSIS TYPE I

Talita Giacomet de Carvalho^{1,2}, Valeska Lizzi Lagranha^{1,2}, Fabiana Quoos Mayer²,
Guilherme Baldo², Ursula Matte^{1,2} and Roberto Giugliani^{1,2,3}

¹ Post-Graduation Program on Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

² Gene Therapy Center, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

³ Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

Corresponding Author:

Ursula Matte

Gene Therapy Center

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350

Porto Alegre, RS

90035-903

Fone: 55 51 3359 8841 / 8838

Fax: 55 51 3359 8010

SUMMARY

Mucopolysaccharidosis type I (MPS I) is a disorder caused by the deficiency of alpha-L-iduronidase, leading to accumulation of heparan sulfate and dermatan sulfate within the lysosome. The mechanism of pathogenesis is unknown, but there is increasing evidence of the participation of immune system irregularities on the pathology of MPS I. Therefore we conducted a study to verify the occurrence of an autoimmune response and its contribution to the clinical symptoms of MPS I mice. Western blot analysis of protein extracts from liver and hippocampus demonstrated that there are no putative autoantigens exclusive of MPS I mice. Lymphocyte proliferation assays showed normal T-cell activation in these animals. Lymphocyte transfer from MPS I mice to wt mice did not cause any damage detectable by behavioral tests to the central nervous system of receptor mice. Receptor animals also did not show signs of neuroinflammation, demonstrated by GFAP staining. In summary, the present study contributes to clarify the pathogenesis of MPS I, demonstrating that autoimmune reactions are not involved in the genesis of this disease.

Key words: mucopolysaccharidosis type I, autoimmunity, central nervous system

INTRODUCTION

Mucopolysaccharidosis type I (MPS I) is an autosomal recessive disorder caused by the deficiency of the lysosomal enzyme alpha-L-iduronidase (IDUA). IDUA hydrolyzes the glycosaminoglycans (GAGs) heparan sulfate (HS) and dermatan sulfate (DS), and its deficiency leads to accumulation of these substrates in various cells and tissues. MPS I is a chronic, progressive disease affecting the heart, eyes, bones, joints, respiratory system, viscera, and often the central nervous system (D'Aco et al., 2012).

The intra-lysosomal accumulation of unmetabolized substrates is the primary cause of MPS I, but the extensive range of symptoms indicates that many secondary biochemical and cellular pathways must also be activated. In addition to its essential role in the degradation of various macromolecules, lysosomes are also essential for normal functioning of the immune system. Therefore, the catabolism of macromolecules in the lysosome can affect several immune functions, including the

processing and presentation of antigens, cytokine secretion and phagocytosis (Castaneda et al., 2008).

GAGs are also related with functions of the immune system, including inflammation and autoimmunity. Dermatan sulfate has a high affinity for antigens of dead or apoptotic cells, and when associated with them, stimulates the proliferation of B-1a lymphocytes, cells related with auto-antibody generation (Wang et al. 2011). Heparan sulfate interacts with cytokines and chemokines, promotes activation of T-cells, B-cells, macrophages and dendritic cells, and is involved with recruitment of leucocytes to damaged tissues (Dreyfuss et al., 2009).

Moreover, recent studies on the pathology of related diseases demonstrate that alterations in systemic and neuroimmune responses can be linked to the clinical manifestations observed. Higher expression of CD68, a marker of monocytes and macrophages, was observed in MPS VI mice, which accumulates DS (Tessitore et al., 2009). DiRosario et al. (2009) showed intense participation of innate and adaptive immune responses in the neuropathology of mice with MPS IIIB, another type of MPS that accumulates HS. The presence of antibodies reactive against self-antigens of the mouse brain indicate the occurrence of an autoimmune reaction, and adoptive transfer experiments proved the contribution of lymphocytes to MPS IIIB neuropathology (Killedar et al., 2010).

The animal model of MPS I (Ohmi et al., 2003) has been proven to be an important tool for the study of different aspects of the pathogenesis of MPS I (Ohmi et al, 2003; Ma et al, 2008, Baldo et al., submitted). Previous studies reported alterations in memory tasks (Reolon et al., 2006), oxidative stress (Reolon et al., 2009), acoustic startle behaviors (Pan et al, 2008) and glial activation in the cortex (Ohmi et al., 2003). Moreover, the progressive motor dysfunction observed in these mice has been related to a neuroinflammatory process (Baldo et al., submitted). Nevertheless, the relationship between immune abnormalities and pathology in MPS I is not well understood. Better characterizing these mechanisms is important to understand how the disease occurs and also to evaluate treatment options. Therefore we conducted a study to verify the occurrence of an autoimmune response and its contribution to the clinical signs of MPS I mice.

MATERIALS AND METHODS

Animals

The MPS I knockout mouse model (Ohmi et al, 2003), kindly donated by Dr Elizabeth Neufeld, (UCLA, USA), was maintained on an inbred background (C57/B6) by back crosses of heterozygous mates. All mice were genotyped by polymerase chain reaction. Animals were maintained to conventional housing under a 12 h light/12 h dark cycle with controlled temperature ($19 \pm 1^\circ\text{C}$) and humidity ($50 \pm 10\%$). Handling, care and processing of animals were carried out according to regulations approved by the Research Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Experimental design

Male MPS I and their age-matched wild type littermates (referred as wt group) were used for the experiments. At 8 months of age MPS I (n=8) and wt (n=7) mice were submitted to behavioral tests. After that, they were anesthetized by intraperitoneal injection of 100 mg/kg 10% ketamine (Eurofarma, Brazil) and 10 mg/kg 2% Xylazine (Sespo, Brazil), 0.5 mL of blood was collected through retro orbital puncture and mice were perfused transcardially with 20 mL of phosphate saline buffer to minimize blood contamination of tissues. Brain cortex, hippocampus, liver and lymph nodes were collected and maintained at -80°C before being processed, except for lymph nodes were immediately processed for assays.

Western Blot

Whole-cell proteins were extracted from hippocampus and liver samples. The protein fractions were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a PVDF membrane (Millipore, USA) with a semidry electrotransfer device (BioRad). Then the membranes were blocked with 5% non-fat powder milk, probed with serum (1:200) of MPS I or wt mice as primary antibodies, followed by horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody against mouse IgG (Sigma-Aldrich, USA), and developed with chemiluminescent substrate (Millipore, USA).

Lymphocyte preparation

Lymph nodes from MPS I and wt mice were macerated and the cells were filtered through a 70 μm nylon cell strainer (BD Bioscience, USA) in growth media (RPMI 1640 media, 10% bovine fetal serum, 1% Penicillin-Streptomycin, 2 mM L-Glutamine and 50 μM 2-Mercaptoethanol). Cells were then centrifuged, counted by Trypan Blue exclusion and resuspended in growth media.

Lymphocyte proliferation assay

Lymphocytes extracted from lymph nodes were assayed for proliferation index with Concanavalin A (ConA) (Invitrogen, USA) as stimulator. Cells in growth media were plated in 96-well tissue culture plates (2.5×10^5 cell per well, in triplicates) and incubated or not with 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ConA diluted in growth media. After 48 hours at normal tissue culture conditions (37°C, 5% CO₂) 5 mg/mL of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma, USA) was added in each well, followed by 4 hour incubation. Dimethyl sulfoxide (Sigma, USA) was added for cell lysis and formazan dissolution. Absorbance was measured at 570 nm in a plate reader. Lymphocyte proliferation was expressed as proliferation index: A570 with ConA/A570 without ConA.

Adoptive transfer

Lymphocytes were stimulated with 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ConA diluted in growth media for 72 h. The non-adherent cells were collected counted by Trypan Blue, resuspended in PBS and injected (2×10^7 cells/mouse) in the tail vein of 2-3 months old wt male mice. The receptor animals receiving either wt or MPS I lymphocytes (herein referred to as donor wt and donor MPS I) were evaluated assessed daily for during 15 days in search for any evidence of disease. From day 13th to 15th after cells transfer, they were submitted to behavioral tests, as described below.

Behavioral assessments

Open Field

Exploratory and locomotor activities were accessed using an open field test. The animal was placed in one of the corners of an automatic activity monitor chamber

(Insight, Brazil) and activity (number of rearings, crossings, velocity and the distance moved) was detected during 5 minutes for both wt, MPS I, donor wt and donor MPS I animals.

Gait analysis

Hind-limb gait was determined with a footprint test, as previously described for the MPS III mice (Hemsley and Hopwood, 2005). Animals had their paws painted with non-toxic ink and were placed at the beginning of a well-lit runway approximately 50 cm long and 12 cm wide, with walls of 15 cm height, and allowed to move towards the end of the runway. Once dried, the average distance between footprints was determined for both left and right hind-limbs and gait length for each limb was determined. In addition, a line perpendicular to the direction of movement from one foot to the other was drawn, to determine gait width. The average of at least three lengths and five widths was taken for each run. The first and last two strides were discarded due to alterations in speed in the beginning and in the end of the runway.

Immunohistochemistry

Fifteen days after adoptive transfer, receptor mice were sacrificed by cervical dislocation. Brains were collected, fixed in 10% buffered formalin, and sections were submitted to routine histological processing. Immunohistochemistry for glial fibrillary acidic protein (GFAP) was performed in hippocampus using specific antibody conjugated to horseradish peroxidase (Dako Cytomation, Polyclonal Rabbit anti-GFAP) and analyzed by a researcher blinded to the groups. Cells positively stained for GFAP were counted in 7-10 fields per slide, with a 40X magnification.

Statistical Analysis

For statistical analysis the Predictive Analytics SoftWare (PASW, version 18.0) was used. Student t Test was used for comparison of groups for western blot, lymphocyte proliferation, gait analysis and GFAP staining. For comparison among different groups in the open field test and for number of GFAP positive cells, one-way ANOVA with Tukey as post hoc was used. Statistical differences among groups were considered when $p < 0.05$.

RESULTS

To determine if B-cell autoimmune responses occur in MPS I mice, protein extracts from hippocampus and liver of MPS I or wt mice were immunoblotted and probed with serum from MPS I or wt mice. A main band of approximately 30 kDa was detected in hippocampus extracts from MPS I and wt mice. As this band was present both in the membrane blotted with MPS I and wt serum, it indicates the presence of a self-antigen that bounds to IgG in both MPS I and wt mice. The intensity of the band was similar in both membranes (one for each serum) and also in the same membrane for both protein extracts thus indicating that the autoantibodies are probably not related with the disease. The same was observed for liver protein extracts, but the main band had a different size, between 50 and 70 kDa (Figure 1).

To verify if there was T-cell activation in MPS I mice, we assayed lymphocytes with a T-cell mitogen ConA as stimulus and performed MTT as indicator of cell proliferation. The stimulation index of MPS I mice lymphocytes was the same as the wt group (Figure 2), indicating normal activation of T-cells in MPS I mice.

Adoptive transfer was performed to verify the pathogenic potential of MPS I lymphocytes. Lymphocytes extracted from lymph nodes of 8 months old MPS I or wt mice were stimulated with ConA and injected intravenously in 2-3 months old wt mice. During 15 days post transplantation, in both group animals that received wt or MPS I lymphocytes, no visible signs of neurological impairment were detected. From day 13, all the animals were submitted to controlled behavioral assays. In order to compare the results with donor MPS I and donor wt mice, 8 months old MPS I and wt mice were also analyzed.

The open field test was used to evaluate locomotor and exploratory activities, and showed differences in all the parameters analyzed (crossings, rearings, velocity and distance moved) for 8 months old MPS I and wt mice. Donor wt and donor MPS I had similar behavior to wt mice, and without difference between them (Figure 3). Gait analysis, to access cerebellar function, showed a reduction in length in MPS I compared to wt mice (Figure 4). No difference was found between donor MPS I and donor wt.

Fifteen days after adoptive transfer the mice were euthanized and the brains were collected. To further evaluate if there was a neuropathological impact of adoptively transferred MPS I lymphocytes that was not detectable by behavior tests, immunohistochemistry for GFAP, a marker of glial activation that is overexpressed in

MPS I mice, was performed in hippocampus of donor wt and donor MPS I. As it can be seen in figure 5, there was no difference between the two groups.

DISCUSSION

There is increasing evidence of the participation of immune system abnormalities in the pathogenesis of MPS I and related diseases. However, the mechanisms by which it happens are yet to be elucidated. The present study aimed to investigate whether an autoimmune response could contribute to clinical symptoms of MPS I mice.

For the experiments of lymphocyte proliferation, western blotting, and as donors for adoptive transfer, we used 8 months old mice. This specific age was chosen based on previous studies from our group that have demonstrated the establishment of all the main features of disease at this age. From 8 months on, a marked neurological impairment, demonstrated by behavior tests observation of neuroinflammation, can be seen (Baldo et al., submitted). Thus, at this age, immune abnormalities, if present, should also be detectable.

We did not find evidence of autoantigens specific for MPS I. The results from western blot showed the recognition of self-antigens in hippocampus and liver protein extracts, both by MPS I and wt mice. Thus, it indicates the presence of polyreactive autoantibodies that are frequently found in healthy subjects and are considered to be nonpathogenic (Pluchino et al., 2003). These results are different from those that DiRosario et al. (2009) have described for MPS IIIB. These authors reported the presence of a putative autoantigen in brain extracts that reacted with serum IgG from MPS IIIB mouse.

In the same paper, a number of genes related to immune cells and molecules that are up-regulated were described and T-cell activation and autoimmunity was demonstrated (DiRosario et al., 2009). We did not observe lymph node enlargement (data not shown) and upon activation with ConA MPS I lymphocytes did not present increased proliferation compared to wt. The adoptive transfer of MPS I lymphocytes to wt type mice was performed to assess whether T-cell have the potential to start a pathogenic process in the central nervous system of recipient wt mice. During 15 days after transfer, we did not observe any signal of disease. All the tests we performed in

receptor mice were performed also in 8 months old MPS I and wt mice, that were used as lymphocyte donors. In the open field test, used as a measure of locomotor and exploratory activities, MPS I mice demonstrated worse performance than wt mice in all the parameters analyzed. The gait analysis suggested impairment of cerebellar function in MPS I mice. All these tests confirmed the results from Wang et al. (2009) and Baldo et al. (submitted). However, when the receptors of adoptively transferred lymphocytes were submitted to the same tests, they demonstrated similar performance to the 8 months wt mouse regardless of the donor status, thus indicating the lack of influence of MPS I lymphocytes in brain pathology. The results from glial activation also did not indicate any influence of transferred T-cells.

Killedar et al., (2010), demonstrated that lymphocytes isolated from MPS IIIB and transferred to wt mice caused a mild paralytic disease, with visible signs that include tail and lower trunk weakness with delayed weight gain, with a peak of disease at 14 days after transfer. They also observed neuroinflammation within the central nervous system of receptors and worse performance at behavioral tests when compared to receptors of wt lymphocytes. These data, together with DiRosario et al. (2009) findings, indicate the contribution of autoimmunity to MPS IIIB pathology.

Thus, despite the many similarities between MPS I and MPS IIIB, including the storage of the same substrate, HS, the mechanism of pathogenesis seems to be quite different regarding the immune system. Whether this difference is due to the presence of undegraded DS in MPS I or because of the step at which HS degradation is interrupted is still unknown. It is worth noticing that in the MPS IIIB mouse model, the onset of clinical symptoms is much earlier in life, around 4 months, and the severity of clinical manifestations is more intense. As already described, the disease in MPS I mice is completely established just from 7-8 months of age. So, it is possible that the adoptively transferred lymphocytes are not sufficient to damage the central nervous system of the receptors, or that the observation time is not enough for the symptoms to become detectable. To test if this is indeed a bias, more than one injection of lymphocytes would be required, since the transferred cells are not detectable in circulation 21 days after transplant (Roth and Mamula, 1997).

Our findings do not rule out the presence of immune system abnormalities, such as inflammation, that have been reported in MPS I brain (GFAP activation) and joint (Baldo et al., submitted). However, we have shown the absence of autoimmune

response in MPS I mice as opposite to what has been demonstrated in MPS IIIB mice. It suggests that it is not possible to make general assumptions for all MPS, even if they have similar characteristics. It is worth noticing that severely affected MPS I patients show neurological abnormalities sooner than their MPS IIIB counterparts, which also may imply that this observation in the animal model may not reflect what happens in the human patients. In summary, the present study contributes to clarify the pathogenesis of MPS I, demonstrating that autoimmune reactions are not involved in the genesis of this disease.

Acknowledgements

We would like to thank Dr. Elisabeth Neufeld (UCLA, USA) and Dr Nance Nardi for the generous gift of MPS I mice. This work was supported by grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundo de Incentivo a Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA).

REFERENCES

- Castaneda, J. a, Lim, M.J., Cooper, J.D., Pearce, D. a, 2008. Immune system irregularities in lysosomal storage disorders. *Acta neuropathologica* 115, 159-74.
- DiRosario, J., Divers, E., Wang, C., Etter, J., Charrier, A., Jukkola, P., Auer, H., Best, V., Newsom, D.L., McCarty, D.M., Fu, H., 2009. Innate and adaptive immune activation in the brain of MPS IIIB mouse model. *Journal of neuroscience research* 87, 978-90.
- Dreyfuss, J.L., Regatieri, C.V., Jarrouge, T.R., Cavalheiro, R.P., Sampaio, L.O., Nader, H.B., 2009. Heparan sulfate proteoglycans: structure, protein interactions and cell signaling. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 81, 409-29.
- D'Aco, K., Underhill, L., Rangachari, L., Arn, P., Cox, G.F., Giugliani, R., Okuyama, T., Wijburg, F., Kaplan, P., 2012. Diagnosis and treatment trends in mucopolysaccharidosis I: findings from the MPS I Registry. *European journal of pediatrics*.
- Hemsley, K.M., Hopwood, J.J., 2005. Development of motor deficits in a murine model of mucopolysaccharidosis type IIIA (MPS-III A). *Behavioural brain research* 158, 191-9.
- Killedar, S., Dirosario, J., Divers, E., Popovich, P.G., McCarty, D.M., Fu, H., 2010. Mucopolysaccharidosis IIIB, a lysosomal storage disease, triggers a pathogenic CNS autoimmune response. *Journal of neuroinflammation* 7, 39.
- Ma X, Tittiger M, Knutsen RH, Kovacs A, Schaller L, Mecham RP, Ponder KP, 2008. Upregulation of elastase proteins results in aortic dilatation in mucopolysaccharidosis I mice. *Mol Genet Metab.* 94:298-304.
- Ohmi, K., Greenberg, D.S., Rajavel, K.S., Ryazantsev, S., Li, H.H., Neufeld, E.F., 2003. Activated microglia in cortex of mouse models of mucopolysaccharidoses I and IIIB. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 1902-7.
- Pan D, Sciascia A 2nd, Vorhees CV, Williams MT, 2007. Progression of multiple behavioral deficits with various ages of onset in a murine model of Hurler syndrome. *Brain Res.* 1188:241-53.
- Pluchino, S., Zanotti, L., Martino, G., 2003. Antibodies and myelination: facts and misacts. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology* 24 Suppl 4, S231-3.
- Reolon, G.K., Braga, L.M., Camassola, M., Luft, T., Henriques, J.A.P., Nardi, N.B., Roesler, R., 2006. Long-term memory for aversive training is impaired in Idua(-/-) mice, a genetic model of mucopolysaccharidosis type I. *Brain research* 1076, 225-30.

- Reolon, G.K., Reinke, A., de Oliveira, M.R., Braga, L.M., Camassola, M., Andrades, M.E., Moreira, J.C.F., Nardi, N.B., Roesler, R., Dal-Pizzol, F., 2009. Alterations in oxidative markers in the cerebellum and peripheral organs in MPS I mice. *Cellular and molecular neurobiology* 29, 443-8.
- Roth, R., Mamula, M.J., 1997. Trafficking of adoptively transferred B lymphocytes in B-lymphocyte-deficient mice. *The Journal of experimental biology* 200, 2057-62.
- Tessitore, A., Pirozzi, M., Auricchio, A., 2009. Abnormal autophagy, ubiquitination, inflammation and apoptosis are dependent upon lysosomal storage and are useful biomarkers of mucopolysaccharidosis VI. *PathoGenetics* 2, 4.
- Wang, D., Zhang, W., Kalfa, T.A., Grabowski, G., Davies, S., Malik, P., 2009. Reprogramming erythroid cells for lysosomal enzyme production leads to visceral and CNS cross-correction. *PNAS* 106.
- Wang JY, Lee J, Yan M, Rho JH, Roehrl MH, 2011. Dermatan sulfate interacts with dead cells and regulates CD5(+) B-cell fate: implications for a key role in autoimmunity. *Am J Pathol.* 178:2168-76.

FIGURES LEGENDS

Figure1: Western blot analysis for detection of autoantigens in MPS I mouse liver and hippocampus. Serum of MPS I (A) or wt mice (B) were used as primary antibody.

Figure 2: Lymphocyte proliferation assay. MTT assay in lymphocytes isolated from lymph nodes of MPS I or wt mice activated with ConA. Lymphocyte proliferation was expressed as proliferation index: A570 with ConA/A570 without ConA. Independent samples Student's t test, $p=0.16$.

Figure 3: Open field test. MPS I and wt mice were submitted to the test for 5 minutes. Number of crossings, rearings, distance moved and velocity were recorded by an automatic activity monitor chamber. One-way ANOVA with Tukey *post-hoc*, $*p<0.05$ compared to other groups.

Figure 4: Gait analysis. The length of right (R) and left (L) steps, and width (W) were measured. A) MPS I and wt mice at 8 months of age. B) Adoptive transfer receptors from MPS I and wt donors after 15 days. Independent samples Student's t test, $*p<0.05$ compared to 8 month old wt.

Figure 5: Glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunohistochemistry, arrows indicate GFAP positive cells. Sections from adoptive transfer receptors from wt (A) and MPS I (B) donors. C) Number of positive cells counted in 7-10 fields (40X magnification) in mouse hippocampus. One-way ANOVA with Tukey *post hoc*, $*p<0.05$ compared to wt.

FIGURES

Figure 1

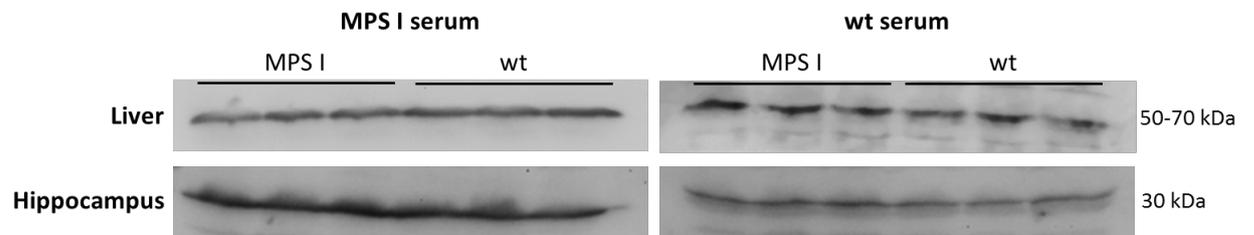


Figure 2

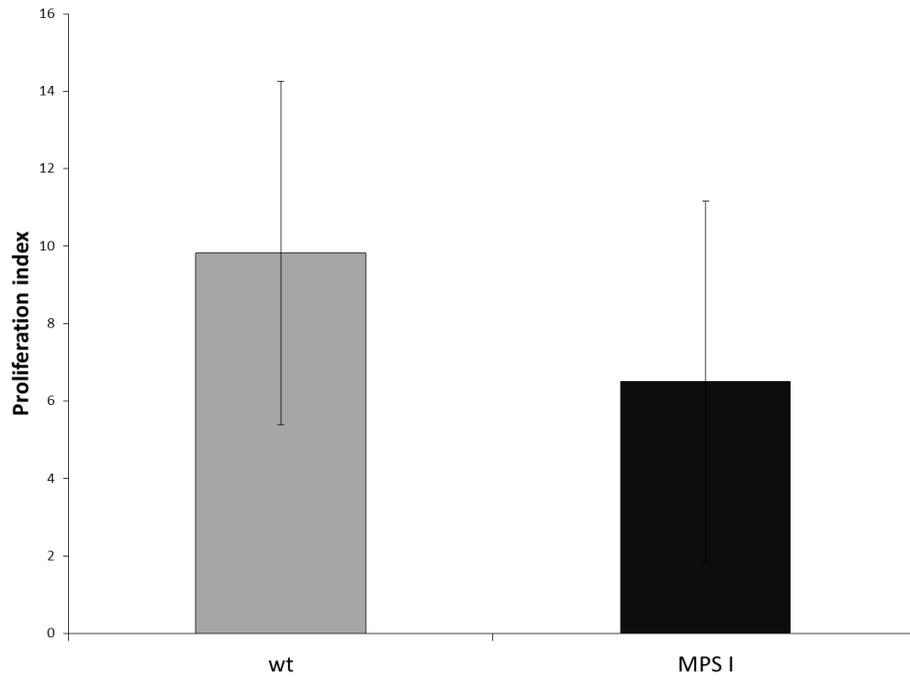


Figure 3

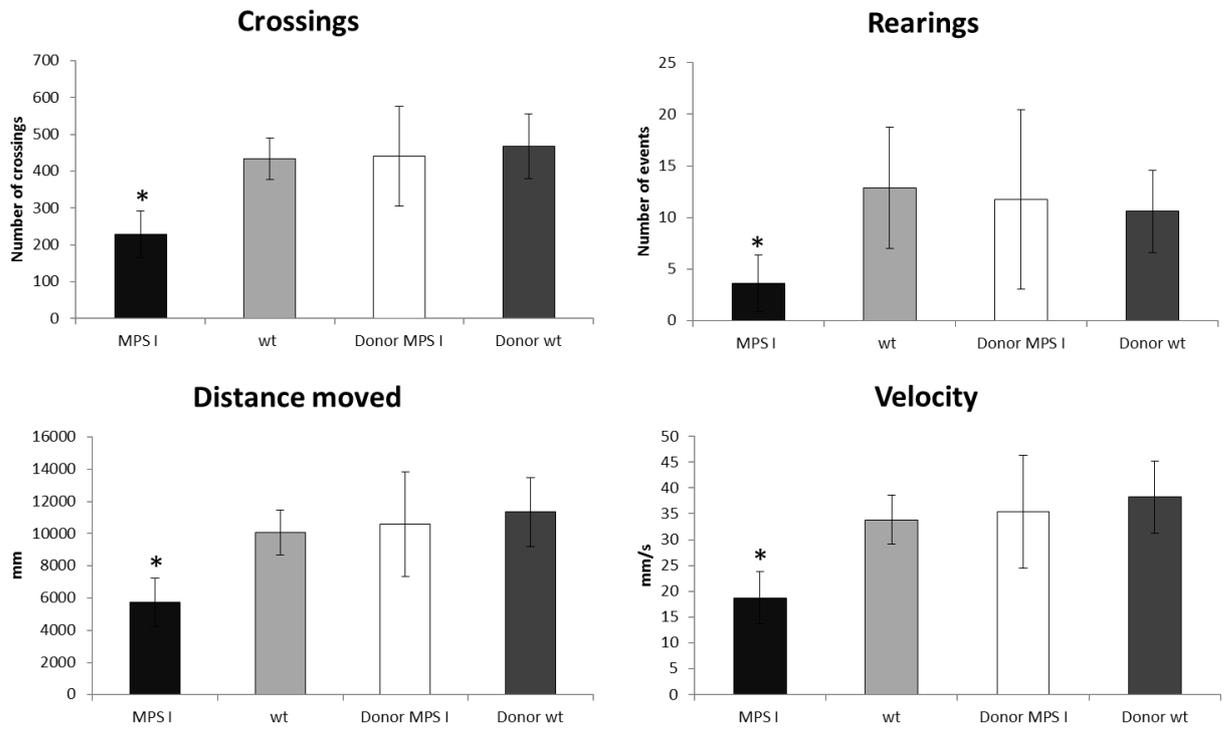


Figure 4

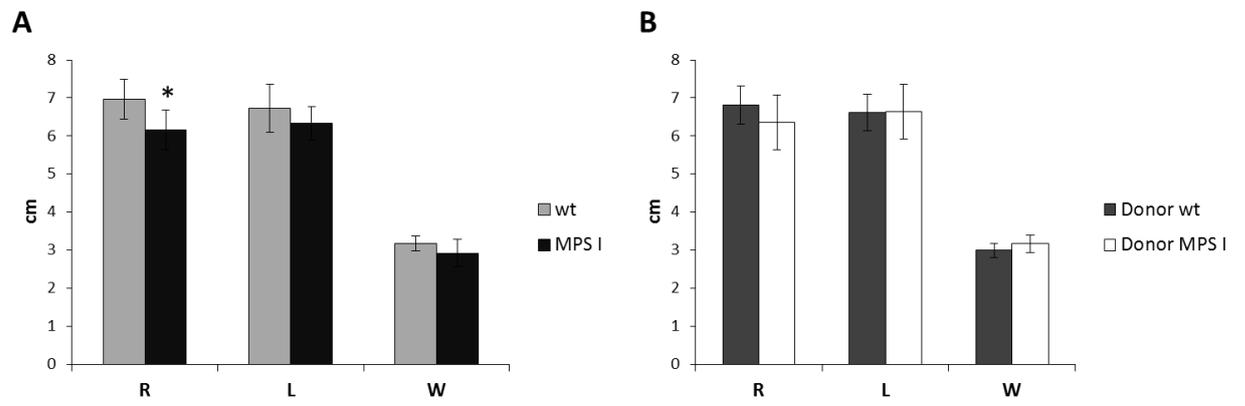
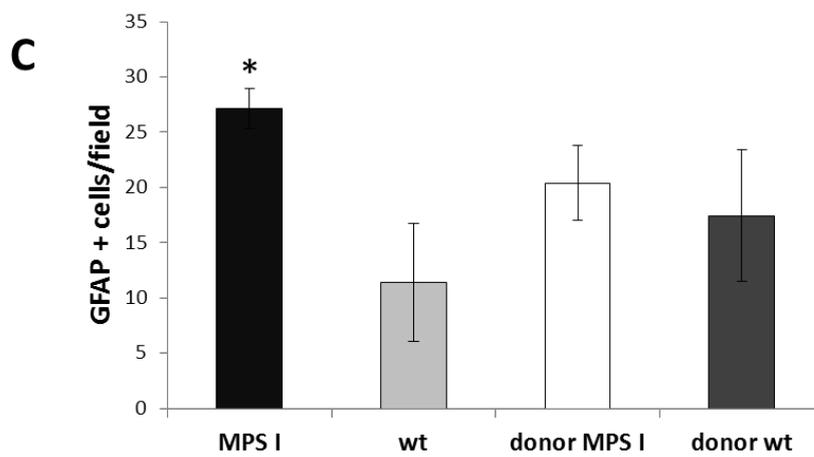
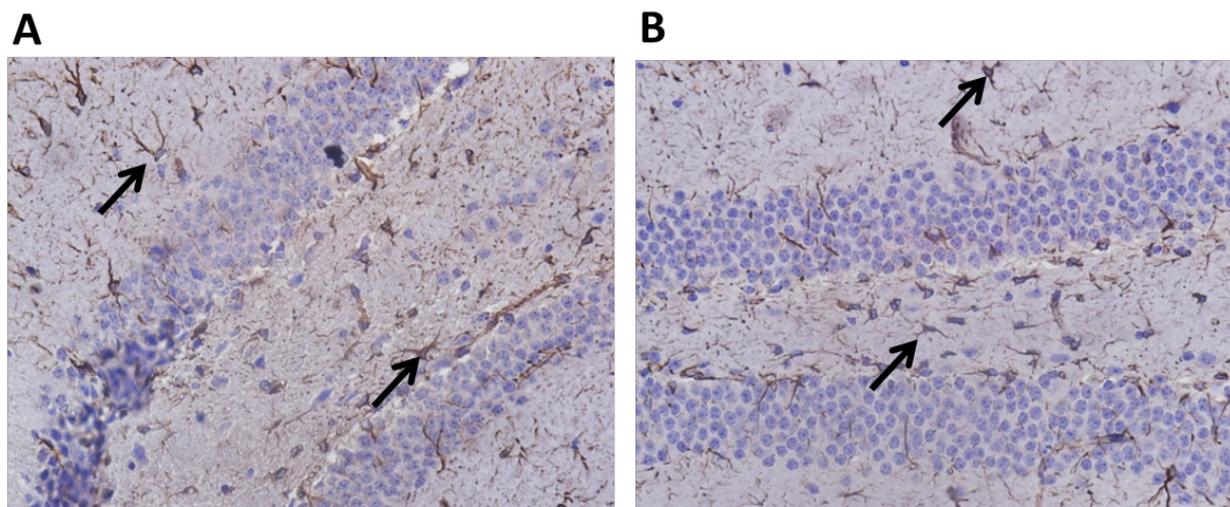


Figure 5



4. DISCUSSÃO

A MPS I é uma doença de curso progressivo, multissistêmica, que apresenta manifestações clínicas heterogêneas. É herdada de forma autossômica recessiva e acontece devido a mutações no gene que codifica a enzima lisossômica IDUA. A deficiência desta enzima leva ao acúmulo de seus substratos não degradados, HS e DS, nos tecidos. Apesar de este acúmulo ser a causa primária da doença, a grande variedade de sintomas indica que diversas rotas bioquímicas e celulares secundárias devem estar alteradas (Futerman e van Meer, 2004). Entretanto pouco se sabe sobre essas rotas e suas contribuições para a manifestação da doença.

Existem várias evidências da participação de alterações do sistema imune na patogênese das MPS e de doenças relacionadas. Entretanto os mecanismos pelos quais isso acontece ainda são, em sua maior parte, desconhecidos. A caracterização destas relações é de extrema importância, não só para a elucidação de como a doença ocorre, mas também porque permite a descoberta de novas alternativas terapêuticas. O objetivo deste trabalho foi verificar a ocorrência de autoimunidade e sua possível contribuição para o aparecimento dos sintomas neurológicos em camundongos com MPS I.

O modelo animal de MPS I foi criado pela interrupção do gene da IDUA e tem mostrado ser um bom modelo tanto para estudo de mecanismos básicos da doença (Ohmi et al., 2003; Ma et al., 2008) quanto para testar alternativas de tratamento (Baldo et al., 2011). Entretanto, os sintomas neurológicos da MPS I estão bem estabelecidos e são facilmente detectáveis em camundongos apenas a partir de 8 meses de idade. Nesse momento é possível detectar neuroinflamação e diferenças significativas em relação a camundongos normais em testes comportamentais (Baldo et al., submetido). Por isso, nesse estudo, optou-se por utilizar animais com 8 meses de idade para os experimentos de linfoproliferação, western blot, e como doadores dos linfócitos utilizados na transferência adotiva.

O western blot realizado para detecção de autoantígenos foi realizado no hipocampo e no fígado. A escolha do hipocampo deveu-se a experimentos prévios do nosso grupo, que demonstraram déficit de memória nos camundongos MPS I aos 8 meses de idade. A escolha do fígado, como outro órgão alvo, ocorreu para que se pudesse verificar se existe diferença neste aspecto entre um órgão do sistema nervoso central e uma víscera. Os resultados mostraram a existência de antígenos próprios no

fígado e no hipocampo tanto de animais normais quanto com MPS I, sem diferença na intensidade das bandas em uma mesma membrana. A presença de bandas se deve provavelmente a autoanticorpos polirreativos que são encontrados frequentemente em indivíduos saudáveis e são considerados não patogênicos (Pluchino et al., 2003).

Estes resultados são distintos dos encontrados por DiRosario e colaboradores (2008) que analisaram extratos proteicos de cérebros de camundongos MPS IIIB e detectaram a presença de autoantígenos em que reagiam com maior intensidade a IgG presente no soro de animais afetados. Em nosso estudo, a intensidade das bandas quando foi utilizado o soro (anticorpo primário) de camundongos MPS I ou normal também não apresentou diferenças. Porém, a comparação entre o soro de camundongos MPS I e normal fica prejudicada pelo fato de que ambos são analisados em membranas diferentes, sendo que fatores experimentais podem interferir nos resultados. Neste caso, o ideal seria a presença de um antígeno comum a ambos os grupos, que pudesse servir como normalizador. Foi feita uma tentativa nesse sentido utilizando um anticorpo primário que reconhece uma proteína não solúvel, produzido em camundongo. Este anticorpo, em concentração conhecida, foi reconhecido pelo anti-IgG de camundongo (anticorpo secundário) e serviu para normalizar os dados relativos às variações de revelação entre as duas membranas. Esse controle, entretanto, não é afetado por variações inerentes ao soro dos animais ou à sua preparação. Este controle não foi incluído nos experimentos relatados no artigo pois não foi possível chegar a uma concentração ideal do anticorpo primário para quantificação. Novos experimentos serão realizados antes da submissão definitiva para a revista.

DiRosário e colaboradores (2008) também demonstraram a ativação de linfócitos T através de ensaios de linfoproliferação. Os resultados de linfoproliferação do presente estudo mostraram que não há evidência de ativação anormal de células T nos camundongos MPS I, pois tanto linfócitos de animais MPS I quanto de animais normais estimulados por Concanavalina A apresentaram o mesmo índice de proliferação. Outra diferença em relação aos achados dos autores acima foi o tamanho dos linfonodos, que nos camundongos MPS I não apresentou diferença entre normais e afetados, enquanto os de MPS IIIB foram descritos como aumentados em relação ao normal.

A transferência adotiva tem por objetivo transferir a funcionalidade e características imunológicas de um indivíduo para um hospedeiro, por meio da

transferência de células do sistema imune. Neste trabalho, linfócitos T de camundongos MPS I foram ativados e transferidos para a circulação de camundongos isogênicos normais, a fim de verificar se essas células teriam potencial para causar nos receptores o dano observado no sistema nervoso central dos doadores. Como controle, linfócitos de camundongos normais foram ativados e transferidos para outros animais normais. Durante 15 dias após o transplante não foram observados sinais clínicos da doença. Além disso, todos os testes realizados nos receptores foram também realizados em camundongos MPS I e normais com 8 meses de idade, a fim de que se pudesse comparar os resultados obtidos não só entre os receptores, mas também com animais doentes e normais. Sabe-se que camundongos com MPS I apresentam dificuldade motoras em consequência da doença (Reolon et al., 2006; Wang et al., 2009; Baldo et al., submetido). Os testes de comportamento realizados confirmaram estes resultados. No teste de campo aberto, usado para avaliar a capacidade motora e exploratória, os camundongos MPS I tiveram pior desempenho que os normais em todos os parâmetros analisados. Os testes de caminhada também confirmaram os resultados previamente obtidos por Baldo e colaboradores, sugerindo prejuízo nas funções cerebelares dos animais doentes. Quando submetidos aos mesmos testes, os receptores da transferência adotiva demonstraram comportamento similar ao observado nos camundongos normais, independente do status do doador. A ausência de diferença entre os que receberam linfócitos MPS I ou normais indica que linfócitos não são os responsáveis pelas alterações existentes no sistema nervoso central de camundongos com MPS I.

Estes resultados também diferem dos obtidos pelo mesmo grupo para MPS IIIB (Killedar et al., 2010). Estes autores demonstraram que após a ativação e transferência de linfócitos isolados de camundongos com MPS IIIB para camundongos isogênicos normais, os receptores apresentaram características visíveis da doença. Estas incluíam enfraquecimento da cauda e da porção inferior do tronco e menor ganho de peso. Os sinais clínicos atingiram um pico 14 dias após a transferência. Por este motivo, no presente estudo, os animais foram observados por 15 dias. Uma vez que existem algumas diferenças importantes entre esses modelos, conforme discutido abaixo, um tempo maior de observação poderia ser necessário para detecção de anormalidades por transferência adotiva. Neste caso, seriam necessárias mais injeções de linfócitos ativados no mesmo animal, já que as células transferidas não são mais detectadas nos receptores 21 dias após a transferência (Roth e Mamula, 1997).

Para verificar se os linfócitos transferidos estavam causando algum dano cerebral não detectável por testes comportamentais, seções de hipocampo e córtex dos camundongos receptores foram analisadas para verificar se havia maior número de células da microglia em animais receptores de linfócitos MPS I. Microglia são as células da imunidade inata do cérebro. Além de defender o sistema nervoso central contra patógenos, elas também produzem substâncias neurotóxicas, estando relacionadas à patogênese de um grande número de condições neurodegenerativas. Os resultados de imunohistoquímica para GFAP, que é um marcador da presença dessas células, não mostraram diferença entre os grupos que receberam linfócitos de doadores normais ou MPS I, indicando ausência de influência dos linfócitos transferidos neste parâmetro.

Mais uma vez, os dados obtidos para camundongos MPS IIIB, que são os únicos semelhantes disponíveis na literatura para doenças lisossômicas, são distintos. Killedar e colaboradores (2010) observaram neuroinflamação no sistema nervoso central dos animais receptores, e pior desempenho nos testes comportamentais quando comparados ao grupo controle. Neste caso, a neuroinflamação foi medida pela presença de CD8 no SNC e aumento dos transcritos de IL2, IL4, IL5, IL17, TNF α e IFN α . Ainda que os marcadores usados em ambos os artigos sejam distintos, existem relatos de neuroinflamação verificada pela presença de GFAP em MPS I (Ohmi et al., 2003) e MPS IIIB (DiRosario et al., 2009). No presente estudo, incluímos a análise de animais normais e com MPS I aos 8 meses e observamos aumento de GFAP nestes últimos em córtex e hipocampo.

Os dados obtidos em camundongos MPS IIIB indicam uma forte participação de resposta autoimune na patogenia desses animais (DiRosario et al., 2008; Killedar et al., 2010). A MPS IIIB é causada pela deficiência da enzima alfa-N-acetilglicosaminidase, que ocasiona acúmulo de HS. Portanto, suas principais diferenças em relação a MPS I são o acúmulo de DS e HS na MPS I e o ponto de interrupção da degradação de HS em ambas (Figura 1).

A presença de DS não degradado na MPS I não deve ser um fator protetor, já que este GAG também foi relacionado a diversas funções do sistema imune. Em camundongos com MPS VI, doença causada pela deficiência da enzima arilsulfatase B com acúmulo exclusivo de DS, Simonaro e colaboradores (2001) sugeriram que a doença articular na possui um forte componente inflamatório, semelhante à artrite

reumatóide (Simonaro et al., 2001; Simonaro et al., 2007). Inclusive, propostas de tratamento envolvendo anti-TNF α tem sido testadas neste modelo animal (Eliyahu et al., 2011). Também foi demonstrada a ocorrência de inflamação em órgãos periféricos através de um marcador de monócitos/macrófagos. Tessitore e colaboradores (2009) observaram maior número de células CD68 positivas em seções de fígado, baço e rim de camundongos MPS VI com 6 meses de idade. No presente estudo, tentamos investigar a presença dessas células em camundongos MPS I e nos receptores da transferência adotiva. Isso indicaria se os linfócitos transferidos poderiam estar interferindo de alguma forma em aspectos não relacionados ao sistema nervoso central. Entretanto devido a problemas na padronização da técnica, não conseguimos concluir as análises a tempo para inclusão dos resultados neste trabalho.

É importante ressaltar que existem diferenças significativas entre os modelos animais utilizados. Os camundongos MPS IIIB apresentam alterações neurológicas desde os primeiros meses de vida, e elas parecem ser mais graves do que as observadas em camundongos MPS I. Quando submetidos a testes comportamentais aos 4 meses de idade, os animais com MPS IIIB já apresentam diferenças significativas em relação aos camundongos normais. O acúmulo de GAGs nos tecidos e o acúmulo secundário de gangliosídeos também se dá antes do que nos animais MPS I (Li et al., 1999). Como descrito acima, nestes últimos a doença só está completamente estabelecida a partir dos 7-8 meses de idade. Portanto, é possível que os linfócitos transferidos não sejam suficientes para causar algum dano ao sistema nervoso central dos receptores. Também é possível que, o método de transferência adotiva utilizado, ConA como estimulante policlonal, possa ter mascarado a existência de algum autoantígeno nos camundongos MPS I. Isso porque apenas uma fração dos linfócitos transferidos seria patogênica ou específica para este antígeno e grande parte das células transferidas teriam outras funções, possivelmente também anti-inflamatórias e regulatórias, como já foi descrito em modelos de doenças autoimunes (Hammarberg et al., 2000 e Muhallab et al. 2002). Caso este suposto autoantígeno fosse conhecido, seria possível uma estimulação específica para o mesmo.

Ao contrário do observado nos animais, os pacientes com a forma grave de MPS I apresentam déficit neurológico no início da vida e geralmente vão a óbito antes dos dez anos de idade. Já os sintomas neurocomportamentais dos pacientes com MPS IIIB iniciam ao redor dos cinco anos de idade com hiperatividade e progridem com regressão

neuroológica e óbito na segunda década de vida. Portanto, é possível que os resultados obtidos no modelo animal de MPS I não representem o que ocorre nos pacientes com a forma grave da doença. Maiores investigações nesta população seriam necessárias para determinar se há um componente autoimune na MPS I que possa ser alvo de terapia específica.

Com os resultados obtidos neste trabalho sugere-se que características autoimunes não apresentam uma contribuição significativa para a patogênese da MPS I. Isso, porém, não exclui a existência de alterações imunológicas nesta doença. Por isso, uma caracterização mais detalhada do perfil imunológico de camundongos e pacientes com MPS I é necessária.

5. CONCLUSÕES

A formação de reposta autoimune em camundongos com MPS I, se existir, é muito pequena e não parece contribuir significativamente para o aparecimento dos sintomas.

Não foi detectada diferença no reconhecimento de autoantígenos hipocampais ou hepáticos por IgGs presentes no soro de camundongos MPS I ou normais.

Linfócitos T de camundongos MPS I não apresentam maior ativação após estímulo com ConA do que os de camundongos normais.

Linfócitos de camundongos MPS I transferidos para camundongos normais não causaram ativação da resposta imune detectável por testes comportamentais e imunohistoquímica para GFAP após 15 dias.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amor S, Puentes F, Baker D, van der Valk P, 2010. Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology* 129(2):154-69.
- Baldo G, Mayer FQ, Burin M, Carrillo-farga J, Matte U, Giugliani R, 2011. Recombinant encapsulated cells overexpressing alpha-L-iduronidase correct enzyme deficiency in human MPS I cells. *Cells Tissues Organs*, in press.
- Barsoum SC, Milgram W, Mackay W, Coblenz C, Delaney KH, Kwiecien JM, Kruth SA, Chang PL, 2003. Delivery of recombinant gene product to canine brain with the use of microencapsulation. *J Lab Clin Med.* 42:399-413.
- Beiguelman B. A dinâmica dos genes nas famílias e nas populações. 2ª ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, p 286.
- Castaneda, J. a, Lim, M.J., Cooper, J.D., Pearce, D. a, 2008. Immune system irregularities in lysosomal storage disorders. *Acta neuropathologica* 115, 159-74.
- Clarke, L. a, 2011. Pathogenesis of skeletal and connective tissue involvement in the mucopolysaccharidoses: glycosaminoglycan storage is merely the instigator. *Rheumatology (Oxford, England)* 50 Suppl 5, v13-8.
- Cox T, Lachmann R, Hollak C, Aerts J, van Weely S, Hrebíček M, Platt F, Butters T, Dwek R, Moyses C, Gow I, Elstein D, Zimran A, 2000. Novel oral treatment of Gaucher's disease with N-butyldeoxyjirimycin (OGT 918) to decrease substrate biosynthesis. *Lancet.* 29;355:1481-5.
- Daly TM, Lorenz RG, Sands MS, 2000. Abnormal immune function in vivo in a murine model of lysosomal storage disease. *Pediatr Res.* 47:757-62.
- DiRosario, J., Divers, E., Wang, C., Etter, J., Charrier, A., Jukkola, P., Auer, H., Best, V., Newsom, D.L., McCarty, D.M., Fu, H., 2009. Innate and adaptive immune activation in the brain of MPS IIIB mouse model. *Journal of neuroscience research* 87, 978-90.
- Di Domenico C, Villani GR, Di Napoli D, Reyero EG, Lombardo A, Naldini L, Di Natale P, 2005. Gene therapy for a mucopolysaccharidosis type I murine model with lentiviral-IDUA vector. *Hum Gene Ther.*16:81-90.
- Dickson PI, Chen AH, 2011. Intrathecal enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis I: translating success in animal models to patients. *Curr Pharm Biotechnol.* 12:946-55.
- Dickson, P.I., Hanson, S., Mcentee, M.F., Vite, C.H., Carole, A., Mlikotic, A., Chen, A.H., Ponder, K.P., Haskins, M.E., Tippin, L., Le, S.Q., Passage, M.B., Guerra, C., Dierenfeld, A., 2011. NIH Public Access. *Enzyme* 101, 115-122.

- Dreyfuss, J.L., Regatieri, C.V., Jarrouge, T.R., Cavalheiro, R.P., Sampaio, L.O., Nader, H.B., 2009. Heparan sulfate proteoglycans: structure, protein interactions and cell signaling. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 81, 409-29.
- D'Aco, K., Underhill, L., Rangachari, L., Arn, P., Cox, G.F., Giugliani, R., Okuyama, T., Wijburg, F., Kaplan, P., 2012. Diagnosis and treatment trends in mucopolysaccharidosis I: findings from the MPS I Registry. *European journal of pediatrics*.
- Eliyahu E, Wolfson T, Ge Y, Jepsen KJ, Schuchman EH, Simonaro CM, 2011. Anti-TNF-alpha therapy enhances the effects of enzyme replacement therapy in rats with mucopolysaccharidosis type VI. *PLoS One* 6:e22447.
- Frustaci A, Chimenti C, Ricci R, Natale L, Russo MA, Pieroni M, Eng CM, Desnick RJ, 2001. Improvement in cardiac function in the cardiac variant of Fabry's disease with galactose-infusion therapy. *N Engl J Med.* 345:25-32.
- Futerman, A.H., van Meer, G., 2004. The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nature reviews. Molecular cell biology* 5, 554-65.
- Gandhi, N.S., Mancera, R.L., 2008. The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. *Chemical biology & drug design* 72, 455-82.
- German DC, Liang CL, Song T, Yazdani U, Xie C, Dietschy JM, 2002. Neurodegeneration in the Niemann-Pick C mouse: glial involvement. *Neuroscience* 109:437-50.
- Giugliani, R., 2012. Newborn screening for lysosomal diseases: current status and potential interface with population medical genetics in Latin America. *Journal of inherited metabolic disease*.
- Giugliani, R., Federhen, A., Rojas, M.V.M., Vieira, T., Artigalás, O., Pinto, L.L., Azevedo, A.C., Acosta, A., Bonfim, C., Lourenço, C.M., Kim, C.A., Horovitz, D., Bonfim, D., Norato, D., Marinho, D., Palhares, D., Santos, E.S., Ribeiro, E., Valadares, E., Guarany, F., de Lucca, G.R., Pimentel, H., de Souza, I.N., Correa, J., Fraga, J.C., Goes, J.E., Cabral, J.M., Simionato, J., Llerena, J., Jardim, L., Giuliani, L., da Silva, L.C.S., Santos, M.L., Moreira, M.A., Kerstenetzky, M., Ribeiro, M., Ruas, N., Barrios, P., Aranda, P., Honjo, R., Boy, R., Costa, R., Souza, C., Alcantara, F.F., Avilla, S.G. a, Fagondes, S., Martins, A.M., 2010. Mucopolysaccharidosis I, II, and VI: Brief review and guidelines for treatment. *Genetics and molecular biology* 33, 589-604.
- Hammarberg H, Piehl F, Risling M, Cullheim S, 2000. Differential regulation of trophic factor receptor mRNAs in spinal motoneurons after sciatic nerve transection and ventral root avulsion in the rat. *J Comp Neurol* 426:587-601.
- Hein LK, Bawden M, Muller VJ, Sillence D, Hopwood JJ, Brooks DA, 2004. Alpha-L-iduronidase premature stop codons and potential read-through in mucopolysaccharidosis type I patients. *J Mol Biol.* 338:453-62.

- Hobbs JR, Barret AJ, Chambers D, James D, Hugh-Jones K, Byrom N, Henry K, Lucas C, Benson B, Tansley L, Patrick A, Mossman J, Young E, 1981. Reversal of clinical features of Hurler's disease and biochemical improvement after treatment by bone-marrow transplantation. *Lancet* 2:709-712.
- Hopwood JJ, Morris CP, 1990. The mucopolysaccharidoses. Diagnosis, molecular genetics and treatment. *Mol Biol Med.* 7:381-404.
- Jun, J.-I., Lau, L.F., 2011. Taking aim at the extracellular matrix: CCN proteins as emerging therapeutic targets. *Nature reviews. Drug discovery* 10, 945-63.
- Keeling KM, Brooks DA, Hopwood JJ, Li P, Thompson JN, Bedwell DM, 2001. Gentamicin-mediated suppression of Hurler syndrome stop mutations restores a low level of alpha-L-iduronidase activity and reduces lysosomal glycosaminoglycan accumulation. *Hum Mol Genet.* 1;10:291-9.
- Killedar, S., Dirosario, J., Divers, E., Popovich, P.G., McCarty, D.M., Fu, H., 2010. Mucopolysaccharidosis IIIB, a lysosomal storage disease, triggers a pathogenic CNS autoimmune response. *Journal of neuroinflammation* 7, 39.
- Kim, S.-H., Turnbull, J., Guimond, S., 2011. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *The Journal of endocrinology* 209, 139-51.
- Lehman, T.J. a, Miller, N., Norquist, B., Underhill, L., Keutzer, J., 2011. Diagnosis of the mucopolysaccharidoses. *Rheumatology (Oxford, England)* 50 Suppl 5, v41-8.
- Li, H.H., Yu, W.H., Rozengurt, N., Zhao, H.Z., Lyons, K.M., Anagnostaras, S., Fanselow, M.S., Suzuki, K., Vanier, M.T., Neufeld, E.F., 1999. Mouse model of Sanfilippo syndrome type B produced by targeted disruption of the gene encoding alpha-N-acetylglucosaminidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 14505-10.
- Liu Y, Xu L, Hennig AK, Kovacs A, Fu A, Chung S, Lee D, Wang B, Herati RS, Mosinger Ogilvie J, Cai SR, Parker Ponder K, 2005. Liver-directed neonatal gene therapy prevents cardiac, bone, ear, and eye disease in mucopolysaccharidosis I mice. *Mol Ther.* 11:35-47.
- Ma X, Tittiger M, Knutsen RH, Kovacs A, Schaller L, Mecham RP, Ponder KP, 2008. Upregulation of elastase proteins results in aortic dilatation in mucopolysaccharidosis I mice. *Mol Genet Metab.* 94:298-304.
- Maeda, N., Ishii, M., Nishimura, K., Kamimura, K., 2011. Functions of chondroitin sulfate and heparan sulfate in the developing brain. *Neurochemical research* 36, 1228-40.
- Maegawa GH, Tropak M, Buttner J, Stockley T, Kok F, Clarke JT, Mahuran DJ, 2007. Pyrimethamine as a potential pharmacological chaperone for late-onset forms of GM2 gangliosidosis. *J Biol Chem.* 282:9150-61.

- Marshak-Rothstein A, 2006. Toll-like_receptors in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol.* 6:823-35.
- Martins, A.M., Dualibi, A.P., Norato, D., Takata, E.T., Santos, E.S., Valadares, E.R., Porta, G., de Luca, G., Moreira, G., Pimentel, H., Coelho, J., Brum, J.M., Semionato Filho, J., Kerstenetzky, M.S., Guimarães, M.R., Rojas, M.V.M., Aranda, P.C., Pires, R.F., Faria, R.G.C., Mota, R.M.V., Matte, U., Guedes, Z.C.F., 2009. Guidelines for the management of mucopolysaccharidosis type I. *The Journal of pediatrics* 155, S32-46.
- Matte U, Yogalingam G, Brooks D, Leistner S, Schwartz I, Lima L, Norato DY, Brum JM, Beesley C, Winchester B, Giugliani R, Hopwood JJ, 2003. Identification and characterization of 13 new mutations in mucopolysaccharidosis type I patients. *Mol Genet Metab.* 78:37-43.
- Matte U, Carvalho TG, Mayer FQ, Lagranha VL, Giugliani R. Cell Microencapsulation: a Potential Tool for the Treatment of Neuronopathic Lysosomal Storage Diseases. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, in press.
- Muenzer, J., 2011. Overview of the mucopolysaccharidoses. *Rheumatology (Oxford, England)* 50 Suppl 5, v4-12.
- Muenzer, J., Wraith, J.E., Clarke, L. a, 2009. Mucopolysaccharidosis I: management and treatment guidelines. *Pediatrics* 123, 19-29.
- Muhallab S, Lundberg C, Gielen AW, Lidman O, Svenningsson A, Piehl F, Olsson T, 2002. Differential expression of neurotrophic factors and inflammatory cytokines by myelin basic protein-specific and other recruited T cells infiltrating the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Scand J Immunol* 55:264-273.
- Munoz-Rojas M-V, Vieira T, Costa R, Fagondes S, John A, Jardim LB, Vedolin LM, Raymundo M, Dickson PI, Kakkis E, Giugliani R, 2008. Intrathecal enzyme replacement therapy in a patient with mucopolysaccharidosis type I and symptomatic spinal cord compression. *Am J Med Genet Part A* 146A:2538–2544.
- Muñoz-Rojas, M.V., Bay, L., Sanchez, L., van Kuijck, M., Ospina, S., Cabello, J.F., Martins, A.M., 2011. Clinical manifestations and treatment of mucopolysaccharidosis type I patients in Latin America as compared with the rest of the world. *Journal of inherited metabolic disease* 34, 1029-37.
- Neufeld EF, Muenzer J, 2001. The mucopolysaccharidosis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th Edition. New York: McGraw-Hill 3421-3452.
- Ohmi, K., Greenberg, D.S., Rajavel, K.S., Ryazantsev, S., Li, H.H., Neufeld, E.F., 2003. Activated microglia in cortex of mouse models of mucopolysaccharidoses I and IIIB. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 1902-7.

- Okumiya T, Kroos MA, Vliet LV, Takeuchi H, Van der Ploeg AT, Reuser AJ, 2007. Chemical chaperones improve transport and enhance stability of mutant alpha-glucosidases in glycogen storage disease type II. *Mol Genet Metab.* 90:49-57.
- Pastores, G.M., Arn, P., Beck, M., Clarke, J.T.R., Guffon, N., Kaplan, P., Muenzer, J., Norato, D.Y.J., Shapiro, E., Thomas, J., Viskochil, D., Wraith, J.E., 2007. The MPS I registry: design, methodology, and early findings of a global disease registry for monitoring patients with Mucopolysaccharidosis Type I. *Molecular genetics and metabolism* 91, 37-47.
- Piotrowska E, Jako'bkiewicz-Banecka J, Tylki-Szymanska A, Liberek, Maryniak A, Malinowska M, Czartoryska B, Puk E, Kloska A, Liberek T, Baranska S, Wegrzyn A, Wegrzyn G, 2008. Genistin-rich soy isoflavone extract in substrate reduction therapy for Sanfilippo syndrome: an open-label, pilot study in 10 pediatric patients. *Curr. Ther. Res.* 69:166–179.
- Pluchino S, Zanotti L, Martino G, 2003. Antibodies and myelination: facts and misacts. *Neurol Sci.* 24 Suppl 4:S231-3.
- Reolon, G.K., Braga, L.M., Camassola, M., Luft, T., Henriques, J.A.P., Nardi, N.B., Roesler, R., 2006. Long-term memory for aversive training is impaired in Idua(-/-) mice, a genetic model of mucopolysaccharidosis type I. *Brain research* 1076, 225-30.
- Roberts AL, Rees MH, Klebe S, Fletcher JM, Byers S, 2007. Improvement in behaviour after substrate deprivation therapy with rhodamine B in a mouse model of MPS IIIA. *Mol. Genet. Metab.* 92:115–121.
- Roth, R., Mamula, M.J., 1997. Trafficking of adoptively transferred B lymphocytes in B-lymphocyte-deficient mice. *The Journal of experimental biology* 200, 2057-62.
- Schultz, M.L., Tecedor, L., Chang, M., Davidson, B.L., 2011. Clarifying lysosomal storage diseases. *Trends in neurosciences* 34, 401-10.
- Simonaro CM, D'Angelo M, He X, Eliyahu E, Shtraizent N, Haskins ME, Schuchman EH, 2008. Mechanism of glycosaminoglycan-mediated bone and joint disease: implications for the mucopolysaccharidoses and other connective tissue diseases. *Am J Pathol.* 172:112-22.
- Simonaro CM, Haskins ME, Schuchman EH, 2001. Articular chondrocytes from animals with a dermatan sulfate storage disease undergo a high rate of apoptosis and release nitric oxide and inflammatory cytokines: a possible mechanism underlying degenerative joint disease in the mucopolysaccharidoses. *Lab Invest.* 81:1319-28.
- Souza MV, Krug BC, Picon P, Schwartz IVD, 2008. Medicamentos de alto custo para doenças raras no Brasil: o exemplo das doenças lisossômicas. *Ciência e Saúde Coletiva* 883:1-11.

- Sugawara K, Saito S, Ohno K, Okuyama T, Sakuraba H, 2008. Structural study on mutant alpha-L-iduronidases: insight into mucopolysaccharidosis type I. *J Hum Genet.* 53:467-74.
- Tessitore, A., Pirozzi, M., Auricchio, A., 2009. Abnormal autophagy, ubiquitination, inflammation and apoptosis are dependent upon lysosomal storage and are useful biomarkers of mucopolysaccharidosis VI. *PathoGenetics* 2, 4.
- Tomatsu S, Montañó AM, Oguma T, Dung VC, Oikawa H, de Carvalho TG, Gutiérrez ML, Yamaguchi S, Suzuki Y, Fukushi M, Sakura N, Barrera L, Kida K, Kubota M, Orii T, 2010. Dermatan sulfate and heparan sulfate as a biomarker for mucopolysaccharidosis I. *J Inherit Metab Dis.* 33:141-50.
- Valayannopoulos, V., Wijburg, F. a, 2011. Therapy for the mucopolysaccharidoses. *Rheumatology (Oxford, England)* 50 Suppl 5, v49-59.
- Wada R, Tiffit CJ, Proia RL, 2000. Microglial activation precedes acute neurodegeneration in Sandhoff disease and is suppressed by bone marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 26;97:10954-9.
- Wang, D., Zhang, W., Kalfa, T.A., Grabowski, G., Davies, S., Malik, P., 2009. Reprogramming erythroid cells for lysosomal enzyme production leads to visceral and CNS cross-correction. *PNAS* 106.
- Wang JY, Lee J, Yan M, Rho JH, Roehrl MH, 2011. Dermatan sulfate interacts with dead cells and regulates CD5(+) B-cell fate: implications for a key role in autoimmunity. *Am J Pathol.* 178:2168-76.
- Wilcox WR. Lysosomal storage disorders: the need for better pediatric recognition and comprehensive care. *J Pediatr.* 2004 May;144(5 Suppl):S3-14. Review.
- Winchester BG. Lysosomal metabolism of glycoconjugates, 1996. *Subcell Biochem.* 27:191-238.
- Wolf DA, Lenander AW, Nan Z, Belur LR, Whitley CB, Gupta P, Low WC, McIvor RS, 2011. Direct gene transfer to the CNS prevents emergence of neurologic disease in a murine model of mucopolysaccharidosis type I. *Neurobiol Dis.*43:123-33.
- Wu YP, Proia RL, 2004. Deletion of macrophage-inflammatory protein 1 alpha retards neurodegeneration in Sandhoff disease mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:8425–8430.