

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

Camila Aguilar Delgado

INVESTIGAÇÃO DOS BIOMARCADORES DE INFLAMAÇÃO E ESTRESSE
OXIDATIVO EM PACIENTES COM MUCOPOLISSACARIDOSES TIPO II E IVA
E EM MODELO CELULAR DE MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO II POR
EDIÇÃO GÊNICA

Porto Alegre

2023

Camila Aguilar Delgado

INVESTIGAÇÃO DOS BIOMARCADORES DE INFLAMAÇÃO E ESTRESSE
OXIDATIVO EM PACIENTES PORTADORES DE MUCOPOLISSACARIDOSES
TIPO II E IVA E EM MODELO CELULAR DE MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO II
POR EDIÇÃO GÊNICA

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação
em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de
Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal
do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a
obtenção do título de doutora em Bioquímica.

Orientador: Profa. Dra. Carmen Regla Vargas
Coorientador: Prof. Dr. Guilherme Baldo

Porto Alegre

2023

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

Delgado, Camila Aguilar
INVESTIGAÇÃO DOS BIOMARCADORES DE INFLAMAÇÃO E
ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM
MUCOPOLISSACARIDOSES TIPO II E IVA E EM MODELO CELULAR
DE MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO II POR EDIÇÃO GÊNICA /
Camila Aguilar Delgado. -- 2023.
147 f.
Orientadora: Carmen Regla Vargas.

Coorientador: Guilherme Baldo.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Mucopolissacaridose tipo II. 2.
Mucopolissacaridose tipo IV A. 3. estresse oxidativo.
4. inflamação. 5. modelo celular. I. Vargas, Carmen
Regla, orient. II. Baldo, Guilherme, coorient. III.
Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Prof^a Carmen Vargas, por todo o aprendizado e crescimento que me proporcionou nesses anos de pesquisa. Ao meu coorientador, Prof Guilherme Baldo, pelos apoios e ensinamentos que me proveu.

Aos meus pais, Francisco e Susana, pelo apoio e amor incondicional que sempre me deram. Aos meus irmãos, Natalia e Federico, pelo amor, pelos conselhos e pelos mimos de uma vida inteira. Aos meus sobrinhos, Leo, Gael e Liam, por me motivarem a ser sempre uma pessoa melhor. Ao meu namorado, Anderson, por me incentivar e apoiar em todos os momentos.

As minhas queridas colegas de laboratório, Jéssica, Franciele, Tatiane, Graziela e Desirée, pela ajuda, pelas discussões e pela troca de conhecimento. Vocês foram essenciais nessa caminhada.

A todos que, de alguma forma, fizeram parte dessa trajetória, obrigada.

SUMÁRIO

PARTE 1

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
LISTA DE ABREVIATURAS.....	3

INTRODUÇÃO

1.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO	5
1.2 DOENÇAS LISOSSÔMICAS DE DEPÓSITO.....	6
1.3 MUCOPOLISSACARIDOSES.....	7
1.4 ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS PARA MUCOPOLISSACARIDOSES.....	15
1.5 ESTRESSE OXIDATIVO, INFLAMAÇÃO E DOENÇAS LISOSSÔMICAS DE DEPÓSITO.....	19
1.6 DISFUNÇÕES MITOCONDRIAIS E ESTRESSE OXIDATIVO.....	21

OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25

PARTE II

Capítulo 1- ARTIGO 1: <i>Inflammatory process and oxidative/nitrative stress: in vivo study in mucopolysaccharidosis type IV A patients under long-term enzyme replacement therapy</i>	31
--	----

Capítulo 2- ARTIGO 2: <i>Inflammation and lipoperoxidation in MPS II patients at diagnosis and post-hematopoietic stem cell transplantation</i>	38
Capítulo 3- ARTIGO 3: <i>Effect of genistein and coenzyme Q10 in oxidative damage and mitochondrial function in a knockout heterozygous type II mucopolysaccharidosis cellular model</i>	64

PARTE III

DISCUSSÃO	96
CONCLUSÕES.....	117
PERSPECTIVAS.....	120
REFERÊNCIAS.....	121
ANEXO I- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – indivíduos controle.....	131
ANEXO II-TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO- responsáveis, pacientes com mucopolissacaridoses.....	133
ANEXO III-CARTA DE APROVAÇÃO CEP	135

RESUMO

As mucopolissacaridoses são doenças lisossômicas de depósito, na qual os glicosaminoglicanos, ao invés de serem clivados dentro do lisossomo, são acumulados dentro dessa organela celular, devido a uma falha nessa rota enzimática. A Mucopolissacaridose IV é caracterizada pela deficiência da enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatase, acumulando queratan sulfato. Já a Mucopolissacaridose tipo II é caracterizada pela deficiência da enzima iduronato-2-sulfatase e acúmulo de heparan sulfato e dermatan sulfato. Esse acúmulo de glicosaminoglicanos leva a problemas secundários, como a ativação da cascata inflamatória, a produção de espécies reativas e disfunção mitocondrial. O objetivo geral deste projeto de pesquisa foi investigar os mecanismos de estresse oxidativo e inflamação em pacientes portadores de Mucopolissacaridose tipo II no momento do diagnóstico e após o transplante de células-tronco hematopoiéticas, em pacientes portadores de Mucopolissacaridose tipo IVA durante tratamento com terapia de reposição enzimática, bem como avaliar o efeito *in vitro* de antioxidantes (genisteína e coenzima Q 10) sobre parâmetros de estresse oxidativo e disfunção mitocondrial em modelo celular para Mucopolissacaridose tipo II. Os dados apresentados sobre pacientes com Mucopolissacaridose tipo II sugerem que os mesmos se encontram em estado de desequilíbrio redox e pró-inflamatório, com aumento dos níveis de isoprostanos urinários, das interleucinas IL-1 β e IL-17a e a tendência de aumento da IL-6. Além disso, os pacientes com Mucopolissacaridose tipo II pós- transplante de células-tronco hematopoiéticas demonstraram uma melhora nos parâmetros analisados, trazendo evidências de como esse tratamento pode ser benéfico para esses pacientes. Vale ressaltar que até o momento não havia sido descrito na literatura o aumento de IL-17a em pacientes com Mucopolissacaridose tipo II. Esse dado é pioneiro e extremamente relevante, visto que essa interleucina é considerada osteoclastogênica e esses pacientes apresentam deformações ósseas importantes. Relatamos pela primeira vez que não há aumento significativo da resposta inflamatória e estresse oxidativo/nitrosativo em pacientes com Mucopolissacaridose tipo IVA em tratamento prolongado com terapia de reposição enzimática. Isso demonstra um possível efeito protetor do tratamento em relação aos parâmetros estudados e a importância de iniciar o tratamento nos estágios iniciais da doença. Já em relação ao nosso estudo de modelo celular por edição gênica, foi demonstrado que o modelo celular heterozigoto composto nocaute para Mucopolissacaridose tipo II apresenta menos alterações nos parâmetros estudados, em comparação com o modelo celular homozigoto nocaute para Mucopolissacaridose tipo II. Isso evidencia que os modelos celulares podem caracterizar diferentes fenótipos, e que a genisteína demonstrou efeito protetor contra o aumento de espécies reativas de oxigênio. Este modelo celular pode ajudar a elucidar a fisiopatologia da Mucopolissacaridose tipo II, bem como demonstrar os benefícios da genisteína nesta doença.

Palavras-chave: estresse oxidativo, inflamação, mucopolissacaridose tipo II, mucopolissacaridose tipo IVA, modelo celular.

ABSTRACT

Mucopolysaccharidoses are lysosomal storage diseases, as glycosaminoglycans, instead of being cleaved inside the lysosome, are accumulated within this cellular organelle, due to a failure in this enzymatic route. Mucopolysaccharidoses type IV is characterized by the deficiency of the enzyme N-acetylgalactosamine 6-sulfatase, accumulating keratan sulfate. Mucopolysaccharidoses type II is described by the deficiency of the enzyme iduronate-2-sulfatase and accumulation of heparan sulfate and dermatan sulfate. This accumulation of GAG leads to secondary problems, such as the activation of the inflammatory cascade, the production of reactive species and mitochondrial dysfunction. The aim of this research project was to investigate the mechanisms of oxidative stress and inflammation in patients with Mucopolysaccharidoses type II at the time of diagnosis and post-hematopoietic stem cell transplantation, in patients with Mucopolysaccharidoses type IVA during treatment with enzyme replacement therapy, as well as to evaluate the *in vitro* effect of different antioxidants (genistein, coenzyme q10) on parameters of oxidative stress and mitochondrial dysfunction in cellular models for Mucopolysaccharidoses type II. The data presented about Mucopolysaccharidoses type II patients showed that they are in redox imbalance and pro-inflammatory state, with an increase in the urinary isoprostane levels, increase interleukins IL-1 β and IL-17a and a tendency towards an increase in IL-6. The Mucopolysaccharidoses type II patients post- hematopoietic stem cell transplantation showed an improvement in the analyzed parameters, bringing evidences on how this treatment can be beneficial to these patients. It is worth noting that until now, an increase in IL-17a in Mucopolysaccharidoses type II patients has not been described in the literature. This data is pioneering and extremely relevant, since this interleukin is considered osteoclastogenic and these patients present significant bone deformations. We reported for the first time that there is no significant increase in the inflammatory response and oxidative/nitrosative stress in patients with Mucopolysaccharidoses type IVA on prolonged treatment with enzyme replacement therapy. This shows the protective effect of treatment in relation to the parameters studied and the importance of initiating treatment in the early stages of the disease. In relation to our study of the cellular model by gene editing, it was demonstrated that the heterozygous Mucopolysaccharidoses type II knockout cellular model presents less alterations in the parameters studied, in comparison with the homozygous Mucopolysaccharidoses type II knockout cellular model. This indicate that the cellular models can characterize different phenotypes and that genistein showed a protective effect against increased reactive oxygen species. This cellular model may help to elucidate the pathophysiology of Mucopolysaccharidoses type II, as well as demonstrate the benefits of genistein in this disease.

Keywords: oxidative stress, inflammation, mucopolysaccharidoses type II, mucopolysaccharidoses type IVA, cellular model.

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP- adenosina trifosfato

C6S- Condroitin-6-sulfato

CTE- Cadeia transportadora de elétrons

DLD- Doenças lisossômicas de depósito

EIM- Erros inatos do metabolismo

ERN- Espécie reativa de nitrogênio

ERO- Espécie reativa de oxigênio

GAG- Glicosaaminoglicano

GALNS- N-acetilgalactosamina-6-sulfato-sulfatase

HO-1- Heme oxigenase-1

HS- Heparan sulfato

DS- Dermatan sulfato

KS- Queratan sulfato

IDS- Iduronato-2-sulfatase

MPS II- Mucopolissacaridose tipo II

MPS IV A- Mucopolissacaridose tipo IVA

MPS- Mucopolissacaridose

NF- κ B- Fator nuclear-kappa B

Nrf-2- Fator nuclear eritroide 2

RL- Radical livre

TCTH- Transplante de células-tronco hematopoiéticas

TRE- Terapia de reposição enzimática

INTRODUÇÃO

1.1 Erros inatos do metabolismo

Os erros inatos do metabolismo (EIM) são defeitos hereditários de caráter autossômico recessivo, autossômico dominante ou ligado ao cromossomo X, causados devido a deficiência parcial ou total de uma proteína, a qual, geralmente, exerce uma atividade enzimática (Regateiro, 2003). O bloqueio resultante do defeito metabólico leva ao acúmulo dos substratos da enzima, bem como deficiência na síntese do produto da reação. Além disso, pode ocorrer que vias metabólicas alternativas sejam ativadas visando a diminuição das concentrações dos substratos. De forma geral, esses mecanismos acabam levando ao aparecimento de sintomatologia grave, muitas vezes letal, nos pacientes portadores desses defeitos (Scriver *et al.*, 2001).

Se analisados de forma individual, os EIM possuem uma frequência baixa, porém, em conjunto, correspondem a 10% do total de doenças genéticas (Jimenez-Sanchez *et al.* 2001; Scriver *et al.* 2001).

Na classificação proposta por Saudubray e Charpentier (2001), os EIM são agrupados em três grandes classes, conforme descrito abaixo:

Grupo I) Distúrbios no catabolismo de moléculas complexas: como por exemplo, as doenças lisossômicas de depósito e as doenças peroxissomais;

Grupo II) Distúrbios com déficit energético: como nas doenças da cadeia transportadora de elétrons, defeitos na oxidação de ácidos graxos e defeitos na gliconeogênese;

Grupo III) Erros inatos do metabolismo intermediário: distúrbios que levam à intoxicação aguda ou crônica em função do acúmulo de substratos tóxicos. Enquadram-se nesta classificação as aminoacidopatias e as acidemias orgânicas, por exemplo.

1.2 Doenças lisossômicas de depósito

As doenças lisossômicas de depósito (DLDs) são EIM em que há uma diminuição parcial ou total da atividade de enzimas lisossomais específicas, ocasionando um acúmulo de moléculas complexas não metabolizadas nos lisossomos.

O lisossomo é uma organela citoplasmática proveniente do complexo de Golgi, que apresenta como função degradar e reciclar resíduos celulares. Os materiais extracelulares atingem o lisossomo principalmente através de endocitose e fagocitose, enquanto um processo completamente diferente, a autofagia, medeia a entrega de materiais intracelulares (Saftig e Klumperman, 2009).

A autofagia é ativada por uma ampla gama de condições indutoras de estresse celular e medeia a degradação de agregados proteicos, lipídios oxidados, organelas danificadas e patógenos intracelulares. Os materiais que chegam ao lisossomo são degradados pelas hidrolases lisossômicas, e os produtos de degradação resultantes são usados para gerar novos componentes celulares e energia em resposta às necessidades nutricionais da célula. Os lisossomos também estão envolvidos em uma via secretora “não convencional” conhecida como exocitose lisossomal, que desempenha um papel importante em vários processos fisiológicos, como reparo da membrana plasmática, resposta imune e reabsorção óssea (Ballabio, 2016).

O lúmen lisossomal tem pH ácido próximo a 4,5 e contém mais de 60 diferentes enzimas hidrolíticas solúveis, que estão diretamente envolvidas na degradação de metabólitos. A membrana lisossomal contém proteínas como transportadores, canais iônicos e pequenas proteínas que estão envolvidas nos eventos de fusão de membrana,

tráfego de proteínas intracelulares e processos secretórios (Heese, 2008; Ballabio, 2016).

No Brasil, as DLDs representam 58,1% dos pacientes com EIM, sendo que 54,5% dos casos de DLDs correspondem às mucopolissacaridoses (MPS) (Coelho et al., 1997). O acúmulo de macromoléculas, na maioria das DLDs, inicia-se na vida fetal e torna-se evidente clinicamente nos dois primeiros anos de vida (Mabe *et al.*, 2003).

1.3. Mucopolissacaridoses

As MPS, enquadradas nas DLDs, são causadas pela ausência de qualquer uma das 11 enzimas envolvidas na degradação dos glicosaminoglicanos (GAGs), também conhecidos como mucopolissacarídeos. Os GAGs, no tecido conectivo, encontram-se ligados a proteínas, formando os proteoglicanos, os quais possuem como função fornecer elasticidade aos tecidos e os manter na sua conformação característica, devido a sua estrutura química ser altamente polar e eletricamente carregada, já que possuem grande capacidade de absorver água, formando matrizes hidratadas nos espaços intercelulares e intersticiais (Esko *et al.* 2009). Por essa razão, os GAGs eram anteriormente conhecidos como mucopolissacarídios. O alto caráter hidrofílico dos GAGs faz com que sua presença na constituição dos proteoglicanos seja crucial para a manutenção da conformação característica dos tecidos, assim como de sua elasticidade. Os principais tipos de GAGs são: heparan sulfato (HS), dermatan sulfato (DS), condroitin 6-sulfato (C6S), queratan sulfato (KS), heparina e ácido hialurônico, conforme representados na Figura 1. As MPS são classificadas em 13 fenótipos clínicos, relacionados com a enzima ausente, como observado na tabela 1.

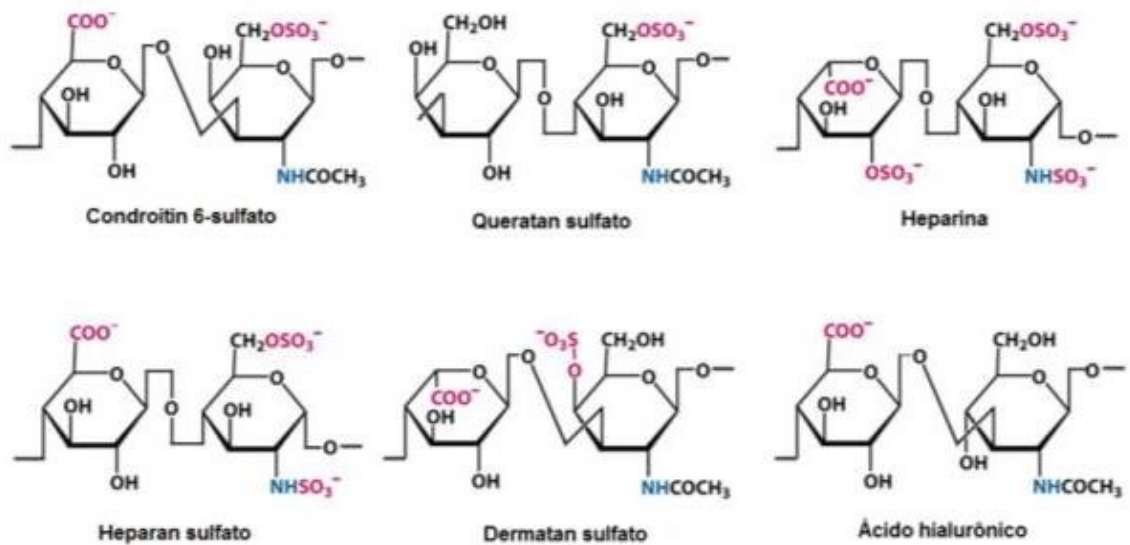


Figura 1. Estrutura química dos GAGs (adaptado de Berg et al. 2006).

O acúmulo de GAGs não degradados no lisossomo leva a uma disfunção celular, tecidual e orgânica. O curso das MPS 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 triagem em caso de suspeita de MPS é baseada na análise de glicosaminoglicanos urinários. O ensaio enzimático deficiente e a análise genética confirmam o diagnóstico (Michaud *et al.*, 2020).

Tabela 1. Classificação das MPS, com indicação dos GAG majoritariamente excretados na urina e a respectiva enzima deficiente

Tipo	Epônimo	GAGs em excesso na urina	Deficiência enzimática
MPS I H	Síndrome de Hurler	Dermatan sulfato e Heparan sulfato	α -L-iduronidase
MPS I H-S	Síndrome de Hurler-Scheie	Dermatan sulfato e Heparan sulfato	α -L-iduronidase
MPS I S	Síndrome de Scheie	Dermatan sulfato e Heparan sulfato	α -L-iduronidase
MPS II	Síndrome de Hunter	Dermatan sulfato e Heparan sulfato	Iduronato-2-sulfatase
MPS III A	Síndrome de Sanfilippo A	Heparan sulfato	Heparan N-sulfatase
MPS III B	Síndrome de Sanfilippo B	Heparan sulfato	α -N-acetil-glicosaminidase
MPS III C	Síndrome de Sanfilippo C	Heparan sulfato	Acetil-coa- α -glicosamina acetiltransferase
MPS III D	Síndrome de Sanfilippo D	Heparan sulfato	N-acetilglicosamina-6-sulfatase
MPS IV A	Síndrome de Morquio A	Queratan sulfato	Galactose-6-sulfatase
MPS IV B	Síndrome de Morquio B	Queratan sulfato	β -galactosidase
MPS VI	Síndrome de Maroteaux-Lamy	Dermatan sulfato	N-acetil-galactosamina 4-sulfatase (Ariisulfatase B)
MPS VII	Síndrome de Sly	Dermatan sulfato e Heparan sulfato	β -glucuronidase
MPS IX	Síndrome de Natowicz	Ácido hialurônico	Hialuronidase

Adaptado de Neufeld e Muenzer 2001.

A Mucopolissacaridose do tipo II (MPS II), ou Síndrome de Hunter, é bioquimicamente caracterizada pela deficiência da enzima iduronato-2-sulfatase (IDS), que catalisa a remoção do sulfato presente na posição 2 do ácido idurônico das moléculas de HS e DS. A rota metabólica de degradação destes GAG está representada na Figura 2. O gene IDS está localizado no braço longo do cromossomo X (Xq28), e mais de 600 alterações mutacionais distintas foram detectadas neste gene, o que, em parte,

explica a grande heterogeneidade clínica apresentada por esses pacientes (D'Avanzo *et al.*, 2020; Gomes *et al.*, 2020).

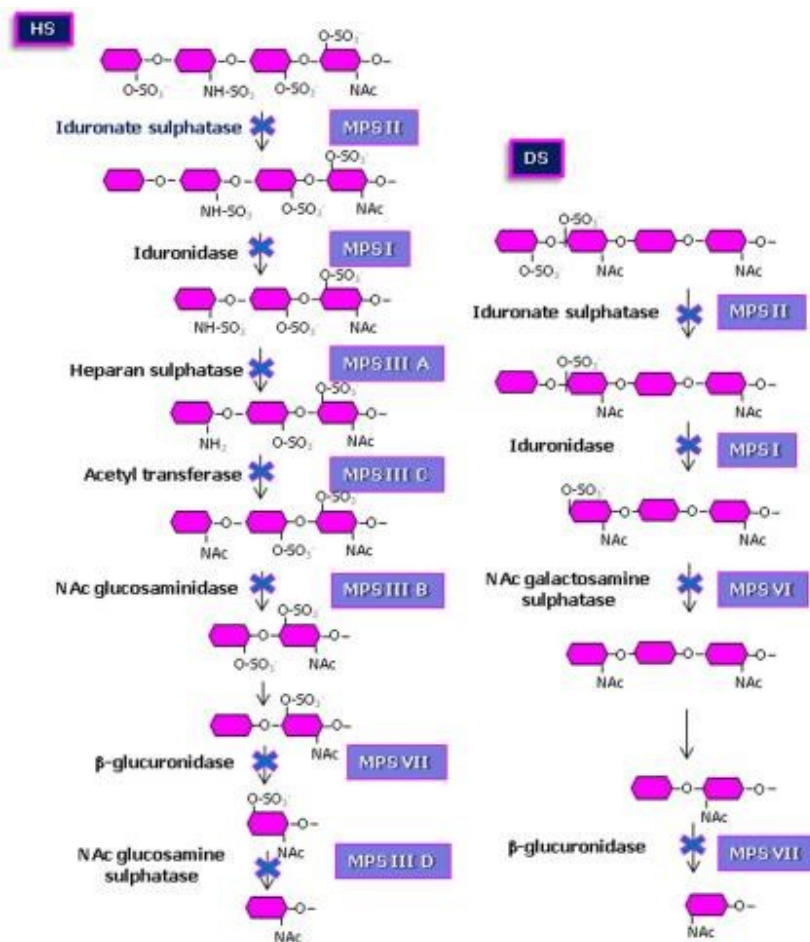


Figura 2. Via de degradação do HS e DS (adaptado de Filocamo *et al.* 2018). HS: heparan sulfato. DS: dermatan sulfato. MPS II: mucopolissacaridose tipo II. MPS I: mucopolissacaridose tipo I. MPS III A: mucopolissacaridose tipo III A. MPS III C: mucopolissacaridose tipo III C. MPS III B: mucopolissacaridose tipo III B. MPS VII: mucopolissacaridose tipo VII. MPS III D: mucopolissacaridose tipo III D. MPS VI: mucopolissacaridose tipo VI.

A MPS II – cuja frequência estimada chega a 1:140.000 homens –, diferentemente de todos os outros tipos de MPS, é de herança recessiva ligada ao cromossomo X,

afetando quase que exclusivamente homens, sendo as mulheres portadoras do gene alterado. (Poorthius *et al.*, 1999; Nelson *et al.*, 2003; Pinto *et al.*, 2004; Piña-Aguilar *et al.*, 2013; McBride e Flanigan, 2021).

A sintomatologia da MPS II inclui alterações esqueléticas, baixa estatura, mãos em garra, contraturas articulares, infecções recorrentes, surdez, hepatoesplenomegalia e cardiopatias. Os sintomas iniciam por volta dos 2-3 anos de idade, e a sobrevida média dos pacientes é de 20-30 anos. (Chinawa *et al.*, 2012; Young *et al.*, 1982; Muenzer *et al.* 2011). A forma grave da MPS II geralmente progride com retardo mental grave e afeta aproximadamente 75% de todos os pacientes (Wraith *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2009; Quaio *et al.*, 2009; Quaio *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2009; Quaio *et al.*, 2012; Roberts *et al.*, 2016; D'Avanzo *et al.*, 2020). A forma atenuada é caracterizada por retardo mental leve ou ausente, e por um início mais tardio, apresentando maior sobrevida dos pacientes (Hamano *et al.* 2008; D'Avanzo *et al.*, 2020)



Figura 3. Paciente com Síndrome de Hunter (adaptado de Muenzer *et al.*, 2011).

A Mucopolissacaridose tipo IV (MPS IV), ou síndrome de Morquio, é caracterizada pela degradação deficiente do GAG KS e é dividida em IVA e IVB, ou Morquio A e Morquio B. A via de degradação do KS está representada na figura 4. Na MPS IVA há deficiência da enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatase (GALNS) ou galactose 6-sulfatase e a degradação deficiente também do C6S. Já, na segunda, a enzima deficiente é β -galactosidase. Não é possível diferenciar as duas deficiências pelo fenótipo dos pacientes. Inicialmente, a MPS tipo IVB foi considerada como a forma mais branda da MPS IVA. (Neufeld e Muenzer, 2001; Sawamoto *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2021). O enfoque do presente trabalho serão pacientes com MPS tipo IVA. Na população em geral, a incidência estimada dessa doença fica em 1:76.000 a 1:640.000 nascidos vivos (Khan *et al.*, 2017; Sawamoto *et al.*, 2020).

O acúmulo de GAGs leva a complicações ósseas bastante variáveis e dependentes da quantidade de substrato acumulado. Mas, diferentemente da maioria dos EIM, os pacientes portadores de MPS IVA não apresentam nenhum retardo mental (Carakushansky, 2001; Chaves *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2021). O tecido conjuntivo, que é rico em KS, é o principal afetado nestes pacientes, e os sistemas, que são por consequência lesados, são a cartilagem, córnea e válvulas cardíacas (Dvorak-Ewell *et al.*, 2010; Sawamoto *et al.*, 2020).

Algumas das características dos pacientes com MPS IVA são: 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 e comprometimento valvular do coração (Montaño *et al.* 2007; Martell *et al.* 2011; Tomatsu *et al.* 2011, Khan *et al.*, 2017, Zhou *et al.*, 2021).

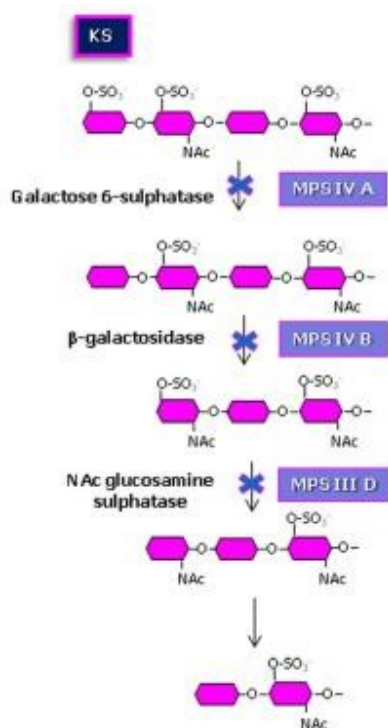


Figura 4. Via de degradação do KS (adaptado de Filocamo *et al.* 2018). KS: queratano sulfato. MPS IV A: mucopolissacaridose tipo IV A. MPS IV B: mucopolissacaridose tipo IV B. MPS III D: mucopolissacaridose tipo III D.

Os pacientes com MPS IVA apresentam significativa heterogeneidade clínica, já estão descritos na literatura mais de 400 mutações no gene responsável pela codificação da enzima envolvida nesta síndrome. 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 (Zanetti *et al.*, 2021).

Os sinais e sintomas característicos desta doença aparecem por volta dos três 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 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 (Montaño *et al.*, 2007; Martell *et al.*, 2011; Tomatsu *et al.*, 2011; Lankaster *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2021).

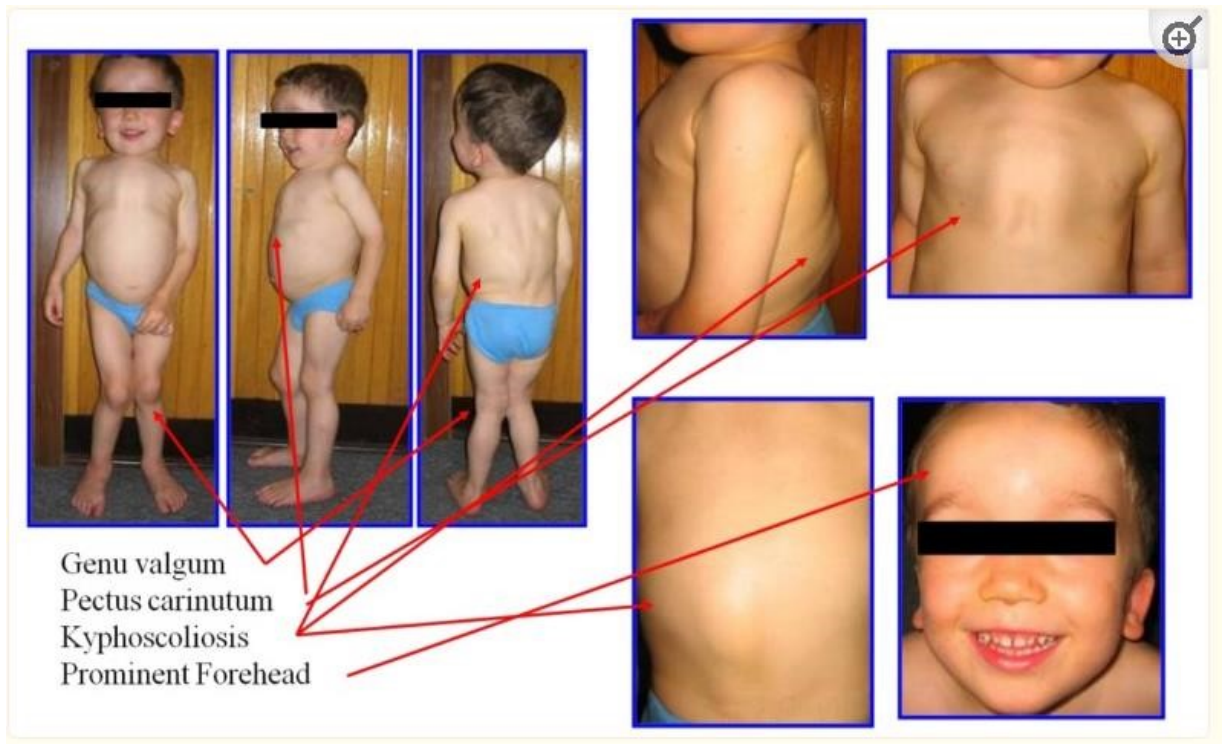


Figura 5. Paciente com síndrome de Morquio A (Adaptado de Sawamoto *et al.*, 2020).

Entre 1982 e 2019, foram identificados 1.652 pacientes com MPS no país. Os dados foram coletados no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas Porto

Alegre. Um total de 74.215.086 nascidos vivos foram registrados no Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos do Banco de Dados do Sistema de Saúde Brasileiro. A incidência de MPS nesse período foi de 1,57 por 100.000 nascidos vivos. O tipo mais comum entre todas as MPS foi a MPS II, com 29,84% dos casos, e em quarto lugar, a MPS IV, com 12,41% dos casos. Os subtipos de MPS IV foram analisados em 96,09% dos pacientes e a MPS IVA foi o tipo mais frequente com 96,45% dos casos (Celik *et al.*, 2020).

1.4. Estratégias terapêuticas para Mucopolissacaridoses

A terapia de reposição enzimática (TRE) vem sendo utilizada, de forma promissora em pacientes com MPS tipo I, II, IV e VI. Esta terapia consiste na reposição, por via intravenosa, de uma forma ativa e recombinante da enzima deficiente. Após sua infusão, a enzima atravessa as membranas celulares e lisossomais e, dentro desta organela, realiza a degradação dos GAGs acumulados, ocasionando, por conseguinte, uma provável melhora clínica (Bagewadi *et al.*, 2008; Coman *et al.*, 2008; Wraith, 2006).

Durante os anos 2000, a TRE para MPS II foi desenvolvida e aprovada para uso clínico. Aprovadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, a enzima recombinante elaprased (Idursulfase® - Shire) é o tratamento de escolha para a MPS II. A TRE se mostrou eficaz em pacientes com MPS tipo 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; Okuyama *et al.*, 2010; White *et al.*, 2010; Wraith *et al.*, 2008).

Já para a MPS IVA o tratamento utilizado é a administração de elosulfase alfa, uma versão sintética da enzima GALNS que foi aprovada pelo FDA em 2014. A elosulfase alfa foi desenvolvida pela BioMarin Pharmaceutical Inc. e é comercializada sob a marca Vimizim TM. A dose recomendada é de 2 mg por kg administrada por via intravenosa durante 3,5-4,5 horas, com base no volume de perfusão, uma vez por semana. Em ensaios clínicos em crianças e adultos com MPS IVA, a elosulfase alfa intravenosa proporcionou melhorias significativas de forma contínua nos níveis urinários de KS (Lyseng-Williamson, 2014).

A TRE tem sido eficaz para minimizar várias características clínicas das MPS, incluindo a redução de doenças das vias aéreas, doença pulmonar restritiva, hepatomegalia e rigidez articular. Porém, a TRE não consegue penetrar em tecidos conectivos densos, ou ossos, portanto, houve impacto mínimo na doença valvar cardíaca ou manifestações esqueléticas. Além disso, a TRE não atravessa a barreira hematoencefálica, não tendo impacto nas características neuronopáticas da doença. A TRE melhorou a qualidade de vida da maioria dos indivíduos com MPS, e dados demonstram que foi capaz de aumentar a expectativa de vida dos pacientes (McBride e Flanigan, 2021).

O transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) é realizado desde 1980 para diversas DLDs, totalizando mais de 2000 procedimentos relatados na literatura (Boelens e Hasselt, 2016). O TCTH consiste em fornecer células metabolicamente competentes, que podem corrigir as deficiências enzimáticas no paciente. Dentre os mecanismos que contribuem para o êxito do transplante, podemos citar: (1) a substituição de células deficientes em determinada enzima por células normais, (2) a

transferência da enzima a partir de células normais do doador para células deficientes através do contato direto célula-célula e (3) o gradiente de concentração de metabólito não degradado entre os tecidos e o compartimento plasmático, que poderia resultar da quebra de substrato circulante por enzimas lisossômicas em leucócitos e macrófagos teciduais do doador (Hoogerbrugge *et al.*, 1995).

Na literatura foi descrito que na MPS I tipo Scheie o TCTH estende a expectativa de vida desses pacientes, podendo chegar até a quarta ou quinta década de vida, sem comprometimento neurológico (Neufeld e Muenzer, 2001). Já na MPS II, Tanaka *et al.*, 2012, demonstraram que o transplante apresenta eficácia no envolvimento cerebral ou cardíaco, quando realizados antes do aparecimento de sinais de atrofia cerebral ou regurgitação valvar, demonstrando que o procedimento vale a pena nos estágios iniciais da doença para esses pacientes. As células-tronco hematopoiéticas são capazes de povoar o sistema nervoso central e interromper a progressão das características neuronopáticas das MPS. Já foi demonstrado que, após o TCTH, as células do doador estão presentes no cérebro, sendo capazes de se diferenciar em neurônios e células gliais, e que essas células podem corrigir a deficiência enzimática das células vizinhas (Cogle *et al.*, 2004; Schonberger *et al.*, 2007). Para a MPS IV, os benefícios relatados seriam a resolução da hepatoesplenomegalia, estabilização da função cardiopulmonar, melhora na acuidade visual e na mobilidade articular. (Peters e Steward, 2003; Prasad e Kurtzberg, 2010). Diversos estudos de longo prazo mostram que TCTH é eficaz quando administrado antes dos atrasos no desenvolvimento começarem (geralmente cerca de 18 meses de idade) (Boelens *et al.*, 2013; Aldenhoven *et al.*, 2015).

Outra estratégia relevante no tratamento de EIM é a terapia de redução de substrato, que visa diminuir a concentração do substrato da enzima deficiente. Esta redução acontece, normalmente, através de uma inibição direta em algum ponto da rota biossintética deste substrato. No caso das MPSs, a genisteína, uma isoflavona extraída da soja e com estrutura molecular apresentada na figura 6, é uma molécula que atua na inibição da síntese de GAGs (Friso *et al.* 2010; Marucha *et al.* 2011). Em camundongos MPS II KO, a administração de genisteína por 10 semanas foi capaz de diminuir a excreção urinária de GAGs e, em alguns animais, também reduziu o depósito lisossômico de GAGs em células do SNC (Friso *et al.* 2010). Em pacientes MPS III, o tratamento por 12 meses com genisteína (5 mg/kg de peso corporal) foi capaz de melhorar a função cognitiva e de reduzir a excreção de GAGs em 80% e 70% dos pacientes do estudo, respectivamente (de Ruijter *et al.* 2012). Considerando que a genisteína é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e atingir o SNC, infere-se que tais efeitos são possíveis em função da inibição direta da síntese de GAGs em neurônios (Tsai 2005).

A coenzima Q10 (com sua estrutura molecular representada na figura 7) é um lipídio que atua na cadeia transportadora de elétrons (CTE) mitocondrial como um transportador de elétrons essencial para a síntese de ATP e atua como um antioxidante lipofílico, entre outras funções. Montero *et al.* (2019) demonstraram que os valores plasmáticos de coenzima Q10 foram significativamente menores nos grupos fenilcetonúria e MPS do que nos controles e pacientes neurológicos. Estes autores concluíram que o monitoramento plasmático de coenzima Q10 em grupos selecionados de pacientes com diferente EIM (especialmente em pacientes com fenilcetonúria e MPS,

mas também em EIM sob dietas com restrição de proteína) parece aconselhável para prevenir a possibilidade de um estado subótimo crônico de coenzima Q10 no sangue em tais grupos de pacientes. Assim, pode-se supor que a suplementação de coenzima Q10 pode ser importante para pacientes portadores de MPS.

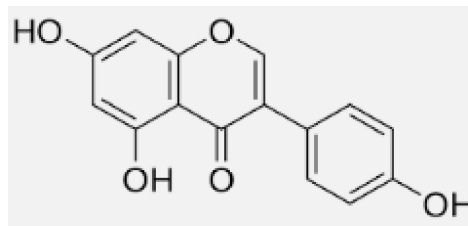


Figura 6: Estrutura molecular da genisteína

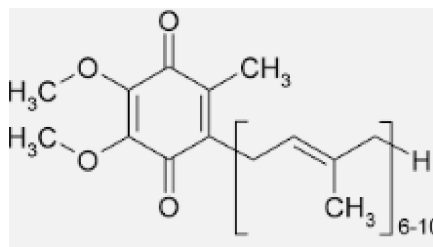


Figura 7: Estrutura molecular da coenzima Q10

1.5. Estresse oxidativo, inflamação e doenças lisossômicas de depósito

O estresse oxidativo decorre de um desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante, como representado na figura 8, que pode acabar resultando em danos a diversas biomoléculas do organismo (Halliwell e Guttridge, 2001). A geração de radicais livres (RL) desencadeia eventos patológicos

que, por sua vez, estão envolvidos em doenças cardiovasculares, carcinogênicas e neurodegenerativas (Ferrari, 2004). Muitos estudos demonstram o envolvimento do estresse oxidativo na patogênese dos EIM e, mesmo que esta relação não esteja bem elucidada, o acúmulo de metabólitos tóxicos é apontado como o principal responsável pelo aumento de RL (Deon *et al.*, 2007; Sitta *et al.*, 2009; Wajner *et al.*, 2004; Barshack *et al.*, 2007; Ribas *et al.*, 2010; dos Santos *et al.*, 2015; Jacques *et al.*, 2016; Delgado *et al.* 2019). No que concerne às DLDs, já foi descrito o aumento de peroxidação lipídica em pacientes com MPS I e alteração na atividade de enzimas antioxidantes pós TRE (Pereira *et al.*, 2008). Foi relatado também, o aumento da oxidação de proteínas e lipídios em cérebro e cerebelo de camundongos com MPS IIIB (Villani *et al.*, 2009). Em pacientes com doença de Gaucher, sugeriu-se um desequilíbrio nas defesas antioxidantes enzimáticas devido a um aumento da atividade da enzima catalase (CAT) e diminuição da enzima superóxido dismutase (SOD), quando comparados ao grupo controle (Roversi *et al.*, 2006). Já em pacientes com MPS tipo II foi verificado um aumento na peroxidação lipídica, no dano a proteínas e ao DNA, sendo que os parâmetros foram revertidos pós TRE (Filippon *et al.*, 2011a; Filippon *et al.*, 2011b).

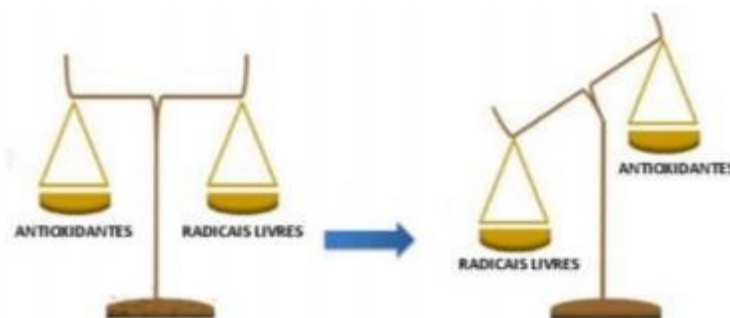


Figura 8: Estresse oxidativo: desequilíbrio do sistema antioxidante\pro-oxidante.

O processo inflamatório caracteriza-se como uma resposta de defesa do organismo contra um agente agressivo, cujo objetivo é promover a cura/reparação. Este processo é regulado por fatores pró e anti-inflamatórios, como as citocinas. Estas moléculas são responsáveis por coordenar, amplificar e regular a magnitude e duração dos eventos inflamatórios e, conseqüentemente, seus efeitos (da Silva *et al.*, 2011; Morán *et al.*, 2013; Abdulkhaleq *et al.*, 2018).

Sabe-se que a resposta inflamatória se encontra intimamente relacionada com as defesas antioxidantes e com o estresse oxidativo. Em uma “via de mão dupla”, espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (ERO/ERN) são capazes de alterar diferentes vias de sinalização, estimulando a liberação de citocinas e outros mediadores pró-inflamatórios. Da mesma maneira, a sustentação de estados inflamatórios pode promover um aumento do estresse oxidativo (Okun *et al.*, 2011; Marinho *et al.*, 2014; Olsen *et al.*, 2015; Higdon *et al.*, 2014). Dentre os principais mediadores da inflamação e ERO/ERN, encontram-se o fator nuclear-kappa B (NF-κB), a enzima heme oxigenase-1 (HO-1) e o fator nuclear eritroide 2 (Nrf-2).

Alguns dados na literatura já demonstram prejuízo de defesas antioxidantes enzimáticas, dano oxidativo a lipídios (isoprostanos) e proteínas (sulfidrilas e di-tirosina) e dano ao DNA de origem oxidativa em leucócitos de pacientes com MPS IVA, além de um aumento da citocina pró-inflamatória IL-6 (Donida *et al.*, 2017). Já na MPS II, temos poucos relatos de inflamação e estado oxidativo em pacientes (Fillipon *et al.*, 2011; Jacques *et al.*, 2017 e Fujitsuka *et al.*, 2019)

1.6 Disfunções mitocondriais e estresse oxidativo

As mitocôndrias são organelas celulares que estão envolvidas na sinalização intracelular e apoptose, metabolismo intermediário e no metabolismo de aminoácidos, lipídios, colesterol, esteróides e nucleotídeos. Ainda, as mitocôndrias têm um papel fundamental no metabolismo energético celular (Chinnery e Schon, 2003).

Na célula, a produção de espécies reativas se dá por diversas vias, incluindo enzimas da família das NAD(P)H oxidases e pela xantina-oxidase. Entretanto, cerca de 90% das ERO são oriundas da mitocôndria. Na forma de ânion superóxido, as ERO são produzidas pela redução incompleta do oxigênio molecular ou pelo vazamento de elétrons da CTE, principalmente pelo complexo I e III (Olsen *et al.*, 2015). A intensa produção de ERO na mitocôndria, somada ao fato desta organela possuir poucas enzimas de reparo, torna o DNA mitocondrial (mtDNA) extremamente sensível a mutações de origem oxidativa (Wu *et al.*, 2010). Considerando que o mtDNA é responsável pela expressão de diversas subunidades proteicas da CTE, desestabilizações em sua estrutura em função de um ataque oxidativo podem levar a um maior dano proteico na CTE. Como consequência, pode haver um aumento da produção de ERO, formando, assim, um ciclo de amplificação de estresse oxidativo.

Além disso, a CTE – acoplada a fosforilação do ADP – é responsável pela síntese da maior parte do ATP gerado pela célula. Nesta via, o fluxo de elétrons é contínuo e ordenado, sendo fornecido pelo NADH ou FADH₂ com o objetivo final de reduzir o O₂ à H₂O. Caso o trânsito eletrônico esteja bloqueado em qualquer ponto da CTE, não ocorre o bombeamento de prótons, a formação do potencial eletroquímico e, conseqüentemente, não há formação de ATP. O bloqueio da transferência de elétrons em qualquer um dos complexos pode apresentar conseqüências patológicas, pois

compromete a formação de ATP. A redução nos níveis de ATP intracelular pode desencadear eventos que levam a disfunções celulares irreversíveis e até mesmo a morte celular (Nelson e Cox, 2008; Lieberman e Marks, 2008).

Em EIM caracterizados por mutações no mtDNA ou em genes do DNA genômico que afetam diretamente a integridade da CTE pode haver aumento da produção de ERO pelo vazamento direto de elétrons ao longo da via, conforme descrito em diferentes estudos (Schapira, 2006; Patsi et al., 2008; Huang e Lemire, 2009). Por outro lado, os mecanismos produtores de ERO em doenças não mitocondriais, como as MPS, não estão completamente elucidados. Alguns autores supõem que proteínas danificadas e os metabólitos tóxicos acumulados em função da doença podem interagir e danificar estruturas e funções da CTE, e, desta forma, iniciar um processo de superprodução de ERO (Wajner e Goodman, 2011; Olsen *et al.*, 2013).

OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi investigar os mecanismos de estresse oxidativo e inflamação em pacientes portadores de MPS II no momento do diagnóstico e após o TCTH, em pacientes portadores de MPS IVA durante tratamento de longa duração com TRE, bem como avaliar o efeito *in vitro* de diferentes antioxidantes (genisteína e coenzima Q10) sobre parâmetros de estresse oxidativo e disfunção mitocondrial em modelo celular em heterozigose composta por edição gênica para MPS II.

2.2 Objetivos específicos

Capítulo 1- o objetivo deste estudo foi investigar os bioamarcadores de estresse oxidativo/nitrosativo e inflamação em pacientes com MPS IVA durante a TRE a longo prazo através da:

- a) avaliação dos níveis de citocinas pró- e anti-inflamatórias, especificamente interleucinas (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) em plasma de pacientes em tratamento;

- b) avaliação da regulação do estresse oxidativo e da inflamação, através da análise da expressão gênica do Nrf-2, do NF- κ B e da HO-1 a partir de amostras de sangue heparinizadas de pacientes em tratamento;

c) avaliação de parâmetros de estresse oxidativo e nitrosativo: dosagem de di-tirosina e espécies de guanina oxidadas em amostras de urina dos pacientes em tratamento, e dosagem de nitrito e nitrato, grupamentos sulfidrilas e status antioxidante total em amostras de plasma de pacientes em tratamento.

Capítulo 2- Avaliação de biomarcadores de inflamação em pacientes com MPS II no momento do seu diagnóstico e após o TCTH, bem como lipoperoxidação, através de:

a) avaliação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, especificamente interleucinas (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17), interferon-gama (IFN-g), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e anti-inflamatórias, interleucinas (IL-IL-4 e IL-10) em plasma de pacientes.

b) avaliação do estresse oxidativo em lipídios: dosagem dos níveis de isoprostanos urinários.

Capítulo 3- O objetivo deste estudo foi desenvolver um modelo celular heterozigoto composto por edição gênica para MPS II e analisar parâmetros de estresse oxidativo, dano ao DNA e disfunção mitocondrial e investigar o efeito *in vitro* da genisteína e da coenzima Q10 sobre esses parâmetros para um melhor entendimento da fisiopatologia desta doença através de:

a) geração e cultivo de células *knock-outs* para o gene IDS e caracterização do modelo celular;

b) avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio nas células *knock-outs*, através da análise da oxidação do diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCF);

c) avaliação das defesas antioxidantes enzimáticas nas células *knock-outs*, através da determinação da atividade das enzimas CAT e SOD;

d) avaliação do potencial da membrana mitocondrial em células *knock-outs* através da análise com o corante MitoStaus;

e) avaliação do volume do lisossomo das células *knock-outs* através do corante LysoTracker;

f) avaliação do dano ao DNA através do ensaio cometa.

PARTE II

RESULTADOS

Os resultados deste capítulo serão apresentados na forma de artigo científico publicado no periódico Archives of Biochemistry and Biophysics (4,114)

3.1. CAPÍTULO 1 – ARTIGO 1: *Inflammatory process and oxidative/nitrative stress: in vivo study in mucopolysaccharidosis type IV A patients under long-term enzyme replacement therapy*

Os resultados deste capítulo serão apresentados na forma de artigo científico submetido ao periódico *Molecular and Cellular Biochemistry* (3.9)

3.2. CAPÍTULO 2 – ARTIGO 2: *Inflammation and lipoperoxidation in Mucopolysaccharidoses type II patients at diagnosis and post-hematopoietic stem cell transplantation.*

Os resultados deste capítulo serão apresentados na forma de artigo científico submetido ao periódico Cell Biochemistry and Function (3.9)

3.3. CAPÍTULO 3 – ARTIGO 3: *Effect of genistein and coenzyme Q10 in oxidative damage and mitochondrial function in an attenuated type II mucopolysaccharidoses cellular model*

PARTE III

DISCUSSÃO

As MPSs são DLDs, na qual os GAGs, ao invés de serem clivados dentro do lisossomo, são acumulados dentro dessa organela celular, devido a uma falha nessa rota enzimática. Esse acúmulo de GAGs leva a problemas secundários, como a ativação da cascata inflamatória e a produção de espécies reativas.

No presente estudo, foi avaliado o perfil inflamatório e oxidativo de pacientes MPS IVA sob TRE a longo prazo (capítulo 1) e dos pacientes MPS II no momento do diagnóstico e pós-TCTH (capítulo 2). Além disso, foi estudado em modelo celular nocaute heterozigoto composto para MPS II o dano oxidativo, função mitocondrial, volume lisossomal, dano ao DNA, bem como o efeito da genisteína e coenzima Q10 nesses parâmetros bioquímicos (capítulo 3).

O acúmulo de metabólitos tóxicos nos EIM é apontado como o principal responsável pelo aumento de RL (Deon *et al.* 2007, Sitta *et al.* 2009, Jacques *et al.* 2016, Donida *et al.* 2017). Vários estudos descreveram os RL como mediadores de danos teciduais em doenças humanas, causando peroxidação das membranas celulares, oxidação de proteínas, danos ao DNA e ao RNA (Jacques *et al.* 2016, Donida *et al.* 2017, Wajner *et al.* 2004, Deon *et al.* 2007, Barshack *et al.* 2007, Ribas *et al.* 2010, Mescka *et al.* 2014, dos Santos *et al.* 2015, Delgado *et al.* 2019). No caso das MPSs, os GAGs acumulados, além de aumentarem a produção de espécies reativas, interagem com uma ampla gama de proteínas envolvidas em processos fisiológicos e patológicos, incluindo quimiocinas, citocinas, fatores de crescimento, entre outros, como demonstrado na figura 9 (Opoka-Winiarska *et al.*, 2013).

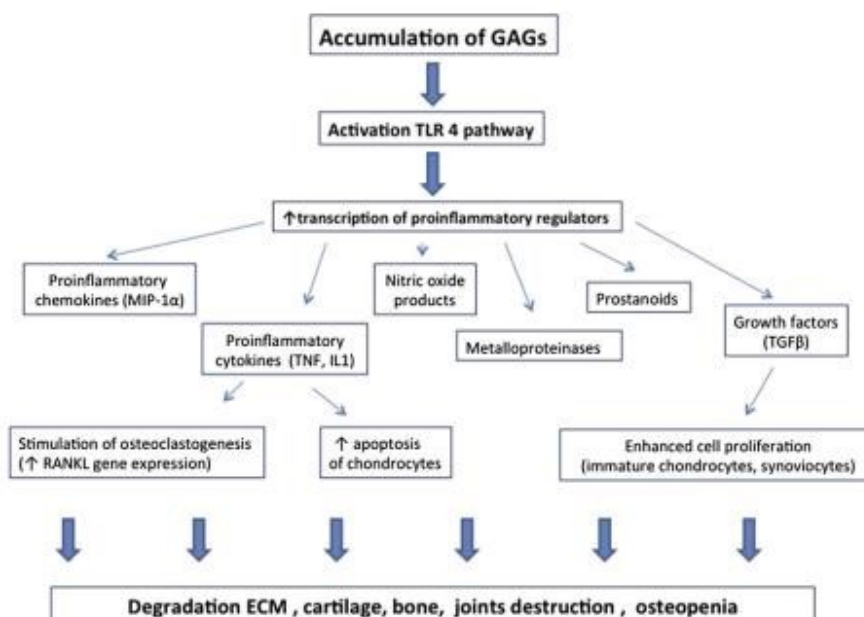


Figura 9. Inflamação metabólica nas MPSs, adaptado de Opoka-Winiarska et al. (2013).

As citocinas são moléculas proteicas originalmente caracterizadas como moduladores imunes, que enviam diversos sinais estimulatórios ou inibitórios para as diferentes células do sistema imunológico. As citocinas possuem características pleiotrópicas, ou seja, desempenham diferentes respostas dependendo do tecido e do ambiente em que se encontram. Têm função autócrina agindo na própria célula produtora, parácrina atuando em células próximas e endócrina quando sua ação é à distância, atuando geralmente após a estimulação de um antígeno (Pedro *et al.* 2001, da Silva *et al.* 2019).

Diferentes tipos celulares são capazes de produzir citocinas. Dentre eles os macrófagos, monócitos e linfócitos. No sistema nervoso, células como a microglia além de células gliais e neuronais são capazes de produzir estas moléculas (da Silva *et al.* 2019).

As citocinas pró-inflamatórias dos pacientes com MPS IVA submetidos a TRE de longa duração (4,8 anos) neste estudo estavam em níveis semelhantes aos controles, sem significância estatística entre os dois grupos, conforme observado nas figuras 6-10 do capítulo 1. Quanto às citocinas anti-inflamatórias, não foi observada diferença na concentração plasmática de IL-4 entre os grupos, mas foram encontrados níveis mais elevados de IL-10, mostrando que pode ocorrer uma regulação do processo inflamatório nesses pacientes (figuras 11-12 do capítulo 1).

Já no capítulo 2, as interleucinas IL-1 β e IL-17a (figuras 1 e 2 do capítulo 2), estão elevadas no grupo MPS II diagnóstico em relação ao grupo controle, e a IL-6 (figura 3 do capítulo 2) demonstrou tendência de aumento também no grupo MPS II diagnóstico. As demais interleucinas pró-inflamatórias IL-2, IL-12 e as citocinas IFN-gama e TNF- α (figuras 4-7 do capítulo 2), não demonstraram alteração significativa em sua concentração, quando o grupo MPS II diagnóstico é comparado ao grupo controle. Na tabela 1 do capítulo 2, é possível observar que os pacientes pós-TCTH apresentam concentrações plasmáticas das interleucinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, e IL-17a) semelhantes ao grupo controle.

A família IL-1 possui ação pleiotrópica, capaz de atuar no sistema imune mediando à inflamação local, através do recrutamento e ativação de células imune. Essa citocina é essencial para a resposta do hospedeiro e para a resistência aos agentes patogênicos, também agrava os danos durante doenças crônicas e lesões teciduais agudas. Monócitos e macrófagos são a principal fonte de IL-1, produzindo principalmente IL-1 β (Arend, 1991; Varela *et al.* 2001; Lopez-Castejon e Brough, 2011).

A IL-6, produzida de forma imediata e transitória em resposta a infecções e lesões teciduais, contribui para a defesa do hospedeiro através da estimulação de respostas de fase aguda, hematopoiese e reações imunológicas. Embora a sua expressão seja estritamente controlada por mecanismos transcricionais e pós-transcricionais, a síntese contínua desregulada de IL-6 desempenha um efeito patológico na inflamação crônica e na autoimunidade (Tanaka *et al.*, 2014).

Nosso estudo demonstrou aumento de IL-17a em pacientes com MPS II, dado ainda não demonstrado na literatura. Essa citocina é conhecida como citocina osteoclastogênica, que entrelaça os sistemas esquelético e imunológico. Seus receptores são expressos uniformemente e através da superfície celular dos sinoviócitos, condrócitos, fibroblastos e monócitos/macrófagos, mastócitos (Nagasse, 2003; Zrioual *et al.* 2008; Tang *et al.*, 2021). As células ósseas, incluindo os osteoclastos, também expressam IL-17Ra, que são receptores de IL-17a (Shen *et al.*, 2008).

O esqueleto mantém a função fisiológica através de um desequilíbrio dinâmico entre a formação e a reabsorção óssea. Os osteoclastos derivam da linhagem monócitos/macrófagos e são cruciais na reabsorção óssea, através da desmineralização e degradação da matriz óssea. A IL-17a atua diretamente nos precursores dos osteoclastos (Tang *et al.*, 2021). Vários estudos na literatura demonstram que esta citocina está envolvida na fisiopatologia da osteoporose pós-menopausa, artrite reumatóide, artrite psoriática e espondiloartrite axial (Adamopoulos *et al.*, 2010; Tyagi *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2015; Ranganathan *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2017; Adamopoulos *et al.*, 2018; Manucci *et al.*, 2019; Taams *et al.*, 2019; Xue *et al.*, 2019).

Conforme mencionado anteriormente, nosso estudo é pioneiro ao demonstrar aumento de IL-17a em pacientes com MPS II e mostra evidências de sua redução em pacientes MPS II pós-TCTH (tabela 1 do capítulo 2), levantando a hipótese de um possível efeito protetor do tratamento em questão sobre o parâmetro analisado. Esses achados são extremamente relevantes, uma vez que o envolvimento musculoesquelético representa uma característica comum e proeminente das MPSs. Anormalidades articulares e ósseas podem ser a principal pista para o diagnóstico das MPSs, principalmente nos fenótipos atenuados. Nas MPSs, a inflamação e a apoptose direta dos condrócitos levam à disfunção dos osteoclastos e dos osteoblastos, resultando na deposição anormal da matriz óssea e na falha da ossificação endocondral. Os danos ósseos mais comuns são anormalidades vertebrais, deformidade e encurtamento de ossos longos, macrocefalia, displasia de quadril, mãos em garra, envolvimento torácico, dismorfismo facial, hipoplasia odontoide e osteopenia (Cimaz *et al.* 2014, Nakamura-Utsunomiya, 2021, Costi *et al.*, 2022). Algumas anormalidades ósseas estão demonstradas na figura 10.

Em relação as citocinas do tipo anti-inflamatórias, a IL-4 (figura 8 do capítulo 2) está com sua produção diminuída no grupo MPS II diagnóstico em relação ao grupo controle, corroborando com os demais resultados que demonstram que os pacientes estão em um estado pró-inflamatório. Já na produção da IL-10 (figura 9 do capítulo 2), não houve diferença estatística entre os grupos. As citocinas anti-inflamatórias tem o importante papel de fazer a manutenção do equilíbrio do sistema imunológico, por regular a secreção de citocinas pró-inflamatórias.

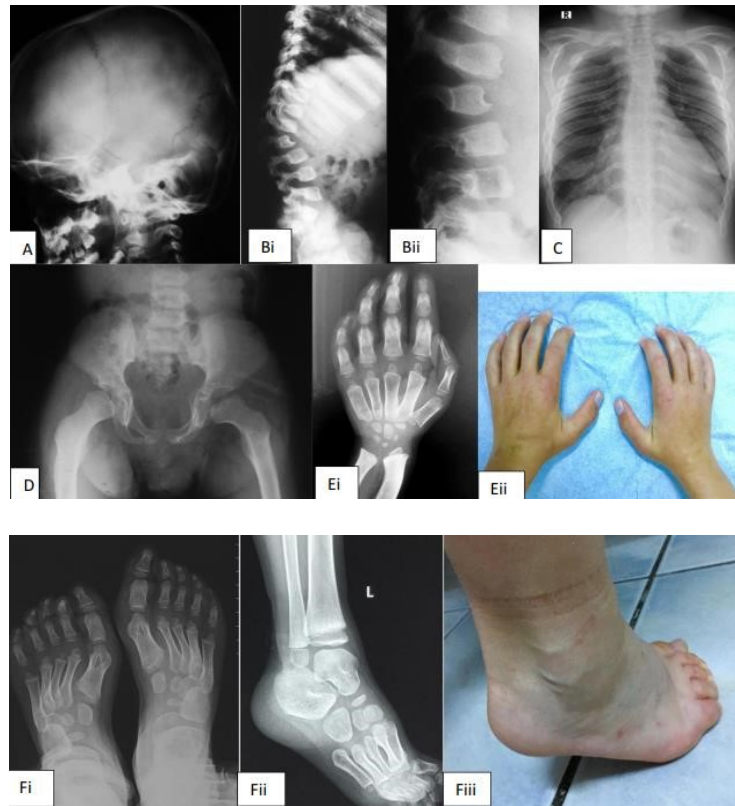


Figura 10. Alterações ósseas apresentadas em pacientes MPS II. A-macrocefalia, Bii- cifose dorsolombar, Bii- vértebras hipoplásicas, C- Clavículas curtas e grossas, costelas em forma de remo, escoliose, D- dysplasia de quadril, Ei, Eii-mãos em garra, Fi-Fii- Ossos tarsais pequenos e hipoplásicos, Fiii- deformidade calcaneovalgo. (adaptado de Alkhzouz *et al.*, 2021)

Ainda são poucos os dados na literatura que falam sobre processo inflamatório e MPSs. Como mostrado na literatura, o armazenamento de GAGs em MPSs leva à elevação de citocinas nas células afetadas (Simonaro *et al.* 2005). A degradação dos componentes da matriz extracelular é resultado da secreção aumentada de várias metaloproteinases degradantes da matriz, produto da estimulação de citocinas inflamatórias nas células do tecido conjuntivo em pacientes com MPSs. Isso aumenta a apoptose das células do tecido conjuntivo e a destruição da cartilagem (Simonaro *et al.* 2005, Simonaro *et al.* 2018, Nagase *et al.* 2003).

Outro estudo demonstrou que os GAGs se ligam aos receptores *Toll-like 4* (TLR4), ativando essa via e levando à liberação de citocinas como TNF- α e IL-1 β , como ilustrado na figura 4. A inativação desta via em camundongos MPS VII sem TLR4 corrigiu muitas características clínicas e patológicas da doença. O uso de uma droga anti-TNF α em ratos MPS VI reduziu os níveis de citocinas e melhorou a patologia articular (Simonaro *et al.* 2010)

Fujitsuka *et al.* (2019) demonstraram elevação de IL-6 e TNF- α em pacientes com MPS IV A sob TRE e níveis elevados de IL-1 β e IL-6 em pacientes MPS II sem tratamento e sob tratamento com TRE. Além disso, Fujitsuka *et al.* (2019) também demonstraram níveis elevados em pacientes pós-TCTH de fator de crescimento epidermal, regulador pró-inflamatório, mas o nível foi reduzido, em comparação com pacientes com MPS II não tratados. Donida *et al.* (2015) demonstraram que o estado pró-inflamatório ocorre em pacientes com MPS IVA, mesmo sob TRE, mostrando aumento de IL-6. Jacques *et al.* (2016), demonstraram que as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α estavam aumentadas nos pacientes MPS II (média de idade 15,5 anos) sob TRE há 4,6 anos.

Polgreen *et al.* (2016) concluíram que níveis mais elevados de TNF- α estão implicados na dor e diminuição da função física presentes em indivíduos com MPS I, II e IV, apesar do tratamento com TRE e/ou transplante de células-tronco, sugerindo que a inibição do TNF- α poderia ser uma terapia adjuvante útil.

Os dados de Di Rosário *et al.* (2009) do estudo de cérebro de camundongos MPS IIIB demonstraram regulação positiva significativa de numerosos genes relacionados ao sistema imunológico de células e moléculas imunes inatas e adaptativas, incluindo células T, células B, complemento, imunoglobulina, receptores TLR, e moléculas

essenciais para a apresentação de antígenos. Killedar *et al.* (2010) mostraram que linfócitos de camundongos MPS IIIB transferidos para camundongos causam neuroinflamação com aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias e infiltração de linfócitos.

Com relação aos resultados encontrados nos pacientes MPS IVA sobre o processo inflamatório, nossos dados diferem dos encontrados na literatura. Porém, ao observarmos a média do tempo de tratamento e a idade dos pacientes, vemos que os pacientes do nosso estudo eram mais jovens (média de idade 7,8 anos), começaram a fazer o tratamento mais cedo e já estavam sob tratamento por mais tempo (4,8 anos) se comparados aos demais estudos apresentados. No estudo de Fujitsuka *et al.* (2019) a média de idade dos pacientes foi de 16,8 anos e o tempo médio de tratamento foi de 8,8 meses. Já no estudo de Donida *et al.* (2015) a média de idade dos pacientes foi de 15,3 anos e o tempo médio de tratamento foi de 32 semanas. As consequências em longo prazo da inflamação prolongada muitas vezes não são benéficas e, em muitos distúrbios, a resposta imune normal é transformada em um processo que leva a danos. Nosso estudo levanta a hipótese que o tratamento TRE de longa duração pode ter um papel protetor em relação ao processo inflamatório, especialmente se instituído precocemente. Já com relação aos dados referentes ao estado pró-inflamatório no momento do diagnóstico dos pacientes MPS II, os mesmos corroboram com o encontrado na literatura atual, e ainda demonstram um aumento na IL-17a, até então não demonstrado na literatura, que pode estar intimamente correlacionado com as deformações osteoarticulares que esses pacientes apresentam. Além disso, conforme pode ser observado na tabela 1 do capítulo 2, os pacientes pós-TCTH apresentam valores

semelhantes aos controles, demonstrando evidências de um possível efeito protetor do tratamento em questão. No que se refere ao estado anti-inflamatório, encontramos diminuição de IL-4 nos pacientes MPSII no momento do diagnóstico, provavelmente numa tentativa de regulação. Cabe salientar que a idade média de nossos pacientes MPS II era de 5,6 anos, menor que a idade de 10 anos do estudo de Fujitsuka *et al.* (2019).

No que se refere aos resultados de estresse oxidativo, o aumento da peroxidação lipídica em pacientes com MPS I e alterações na atividade de enzimas antioxidantes após a TRE já foram descritos (Pereira *et al.* 2008). Em pacientes com MPS II, observou-se aumento da peroxidação lipídica, dano proteico e dano ao DNA, e os parâmetros foram revertidos após a TRE (Filippon *et al.* 2011a, Filippon *et al.* 2011b).

Tessitore *et al.* (2008) demonstraram que a perda de degradação e reciclagem de GAGs resulta em um desequilíbrio de homeostase celular, reduz a funcionalidade dos lisossomos trazendo prejuízo para a autofagia, acúmulo de proteínas e função mitocondrial em fibroblastos humanos MPS VI levando a superprodução de ERO.

Donida *et al.* (2015) demonstraram uma redução dos níveis de defesa antioxidante, avaliada pela diminuição do teor de glutathiona e pelo aumento da atividade da SOD nos eritrócitos. Além disso, foi verificado aumento dos níveis urinários de isoprostanos e di-tirosina e diminuição dos grupos sulfidril plasmáticos em pacientes com MPS IVA sob tratamento de 32 semanas com TRE em relação aos controles, comprovando danos lipídicos e proteicos.

Os RL são estruturas químicas com um elétron desemparelhado no seu último orbital. Isso confere uma instabilidade energética a molécula, conferindo uma alta

reatividade a ela. Em nosso organismo são produzidos RL de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio (Halliwell e Guttridge, 2001). Conforme demonstrado na figura 1 do capítulo 1, não há diferença significativa entre o grupo controle e o grupo MPS IVA referente a produção de ERN.

Ainda, na análise dos parâmetros de estresse oxidativo em amostras de urina de pacientes MPS IVA sob TRE de longa duração, não encontramos diferença significativa no ensaio de di-tirosina e de grupamento sulfidrilas, como visto na Figura 2 e 3 do capítulo 1, não evidenciando dano oxidativo às proteínas em ambos os grupos. Quando há produção excessiva de RL, pode ocorrer a oxidação de proteínas, o que leva à alteração da atividade enzimática e mesmo à desnaturação (Halliwell e Gutteridge, 2007). Por fim, a medida do status antioxidante total, que representa a quantidade de antioxidantes teciduais, foi semelhante nos dois grupos, não apresentando diferença significativa entre eles (figura 5 do capítulo 1).

No que diz respeito ao dano oxidativo do DNA/RNA, os níveis de espécies de guanina oxidada urinária foram semelhantes em ambos os grupos, não mostrando em nosso estudo diferença significativa entre o grupo controle e o grupo MPS IVA (figura 3 do capítulo 1). O DNA é constantemente atacado por fontes endógenas e exógenas, que podem afetar sua integridade, provocando lesões e alterando sua estrutura e, conseqüentemente, a sua funcionalidade. Sabe-se que as espécies reativas podem modificar as bases do DNA (especialmente a guanina), induzir ligações cruzadas entre as cadeias e intra-cadeias, promover ligações cruzadas entre DNA e proteínas e criar quebra de cadeia simples ou dupla nas fitas de DNA. Isso pode levar a necrose ou apoptose, erros de transcrição e replicação, indução de vias de sinalização celular,

dentre outros, se não reparadas. Essas alterações estruturais estão envolvidas em mutações, câncer e citotoxicidade (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Novamente, é levantada a hipótese do efeito protetor do tratamento TRE de longa duração contra o estresse oxidativo, já que no estudo de Donida *et al.* (2015) a média de idade dos pacientes é mais alta e o tempo médio de tratamento é muito inferior ao apresentado neste trabalho. Para corroborar com os dados até então apresentados em nosso trabalho, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e MPS IVA sob tratamento com TRE de longa duração na expressão dos genes HO-1, Nrf2 e Nf- κ B, os quais tem sua expressão desencadeada em decorrência de diversos estímulos de estresse, como estresse oxidativo/nitrativo e citocinas. A indução da expressão da enzima HO-1 é uma estratégia reconhecida usada pelas células para neutralizar as condições de estresse (Waza *et al.* 2018, Kapturczak *et al.* 2004). O Nrf2 parece ser um dos principais atores na transcrição de genes que codificam enzimas antioxidantes, além de atuar na modulação de respostas inflamatórias e imunes (Taguchi *et al.* 2011). O Nf- κ B está envolvido na transcrição de vários genes ligados à resposta inflamatória, entre outros genes envolvidos na apoptose e transformação neoplásica celular. A expressão das citocinas IL 1, 2, 6, 8 e TNF- α é regulada por este fator, por exemplo. Além disso, os pacientes do nosso estudo apresentam valores de GAGs dentro da faixa de normalidade ou então muito próximos, como pode ser observado na tabela 1 do capítulo 1. Isso reforça o fato de que os pacientes estudados com MPS IVA não estão em estado inflamatório ou em desequilíbrio oxidativo/nitrosativo. Não há dados até o momento na literatura que demonstrem a expressão desses genes em pacientes com mucopolissacaridose tipo IVA, e este estudo é o primeiro a relatar.

Neste estudo também avaliamos nos pacientes MPS II no momento do diagnóstico e pós-TCTH os níveis urinários de 15Ft²-isoprostano, que é um biomarcador de lipoperoxidação formado pela reação de espécies reativas com porções araquidonil, a maioria delas presentes em ésteres araquidônicos de fosfolipídios de membrana (Morrow et al., 1990). Os efeitos da peroxidação lipídica nas membranas biológicas levam a alterações no microambiente lipídico, alterações na permeabilidade e fluidez e inativação irreversível de proteínas e lipídios pela formação de ligações cruzadas. Isso pode levar ao extravasamento do conteúdo de organelas, formação de produtos citotóxicos e até morte celular (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Fillipon *et al.* (2011) mostraram níveis significativamente aumentados de grupos malondialdeído e carbonila no plasma, bem como atividade da catalase eritrocitária em pacientes com MPS II no momento do diagnóstico em comparação com o grupo controle. Jaques *et al.* (2016) demonstraram que pacientes com MPS II sob tratamento de TRE de longo prazo apresentaram dano oxidativo aos lipídios, com níveis aumentados de TBARs no plasma e 15Ft²-isoprostanos na urina. Os níveis urinários de 15Ft²-isoprostanos estavam aumentados no grupo com diagnóstico de MPS II em comparação ao grupo controle em nosso estudo, corroborando dados prévios da literatura, e foram semelhantes entre o grupo controle e o grupo de pacientes com MPS II pós-TCTH, como pode ser observado na tabela 2 do capítulo 2. Esses dados mostram evidências de que o tratamento com TCTH pode melhorar o parâmetro bioquímico analisado, evitando danos aos lipídios. Mesmo assim, uma investigação mais aprofundada com outros parâmetros de estresse oxidativo às biomoléculas e um grande número de pacientes com MPS II submetidos ao TCTH deve ser realizada para confirmar esta hipótese.

Modelos celulares já foram utilizados para estudos em diferentes doenças e mais recentemente várias publicações na literatura científica têm sido descritas para Doença de Parkinson e a Doença de Alzheimer (Johannes *et al.* 2013), assim como na Doença de Huntington (Dabrowska *et al.* 2020) utilizando a linhagem celular HEK-293 (rim embrionário humano 293). Os modelos celulares são úteis na investigação bioquímica para investigar a etiologia e fisiopatologia de doenças de uma forma nova e promissora, e permitem focar num aspecto da doença (Doss e Sachinidis, 2019; Chia *et al.*, 2020). Além disso, podem ser usados para descoberta de medicamentos, testes de potência de medicamentos e segurança preditiva de farmacologia/toxicologia de novos medicamentos (Doss e Sachinidis, 2019). Ainda, quando se trata de doenças genéticas raras, o pequeno número de pacientes com a doença em estudo pode ser um fator limitante para o desenvolvimento de novas pesquisas que ajudem a elucidar sua fisiopatologia e melhorar a qualidade de vida desses pacientes. Portanto, o desenvolvimento de modelos celulares torna-se importante nesta área de estudo.

Neste trabalho foi desenvolvido um modelo celular heterozigoto composto para MPS II e analisados parâmetros de estresse oxidativo e disfunção mitocondrial e o efeito *in vitro* da genisteína e da coenzima Q10, duas moléculas antioxidantes, sobre esses parâmetros.

Como já mencionado, muitos estudos demonstram o envolvimento do estresse oxidativo na patogênese dos EIM e a disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo podem estar relacionados, uma vez que a maioria das ERO vem das mitocôndrias. Essa relação poderia ajudar a elucidar a fisiopatologia das MPSs (Olsen *et al.* 2015; Fecarotta *et al.* 2020).

Nas tabelas 1 e 2 do capítulo 3 podemos observar a caracterização do modelo celular heterozigoto composto para MPS II. É importante ressaltar que as duas substâncias antioxidantes estudadas não alteraram a viabilidade celular, conforme mostram as figuras 1 e 2 do capítulo 3. Conforme observado nas Figuras 3 e 4 do capítulo 3, as células HEK-293 KO HP 18 demonstraram um aumento na produção de espécies reativas através do aumento de DCF em comparação com células WT. DCF é frequentemente usado como um indicador fluorescente da formação de ERO em ensaios antioxidantes baseados em cultura de células. Ao rastrear materiais de teste com este ensaio, se os materiais tiverem propriedades antioxidantes, eles reduzirão a quantidade de fluorescência do DCF em resposta ao insulto das ERO (Holtz 2009).

A genisteína demonstrou efeito protetor em ambas as concentrações de 25µm e 50µm, demonstrando seu poder antioxidante. A genisteína (figura 9) é uma isoflavona extraída da soja e sabe-se que esta molécula inibe a síntese de GAGs (Friso *et al.* 2010; Marucha *et al.* 2011). Considerando que a genisteína é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e atingir o sistema nervoso central, já foi demonstrado que essa molécula é capaz de melhorar a função cognitiva devido à inibição direta da síntese de GAGs nos neurônios (Tsai 2005, de Ruijter *et al.* 2012). Estudos identificaram genes específicos que codificam enzimas necessárias para a síntese de GAG que foram inibidas pela genisteína, enquanto a maioria dos genes para hidrolases lisossômicas de GAG foram estimuladas por esta isoflavona (Moskot *et al.*, 2014; Moskot *et al.*, 2015). Outro estudo mostrou que a genisteína pode corrigir parcialmente as alterações do ciclo celular observadas nas células MPS II (Moskot *et al.*, 2016). Investigações clínicas indicaram que a genisteína promoveu algumas melhoras bioquímicas em amostras de

sangue e urina de pacientes com MPS, bem como uma melhoria na elasticidade do tecido conjuntivo e na amplitude de movimento articular (Marucha et al. 2011; Malinova et al., 2012; de Ruijter et al., 2012).

Por outro lado, a coenzima Q10 em ambas as concentrações de 5µm e 10µm não demonstrou efeito sobre o nível de DCF em relação às células HEK-293 KO HP 18 do grupo não tratado. A coenzima Q10 (figura 10) é um lipídio que atua na CTE mitocondrial como carreador de elétrons essencial para a síntese de ATP e atua como antioxidante lipofílico, entre outras funções. Dados da literatura mostraram que pacientes com mucopolissacaridose apresentam níveis mais baixos de coenzima Q10 no plasma do que em controles e pacientes neurológicos (Montero *et al.* 2019).

Conforme mostrado nas figuras 5 a 8 do capítulo 3, não houve diferença significativa entre o grupo controle e as células HEK-293 KO HP 18 para a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT. Tanto a genisteína quanto a coenzima Q10 não mostraram efeitos nas células HEK-293 KO HP 18 na atividade dessas enzimas.

SOD e CAT são duas enzimas que fazem parte do sistema de defesa antioxidante, convertendo as espécies reativas em derivados inativos. Dentro das células, a SOD é a primeira linha de defesa contra as ERO. A SOD é uma metaloenzima antioxidante que catalisa a dismutação do $O_2^{\cdot -}$ em H_2O_2 , que é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas, como a CAT. A CAT é uma ferrihemoenzima, localizada em peroxissomos, cuja principal função é converter H_2O_2 em água e oxigênio. Porém, em situações patológicas, pode haver aumento na produção de espécies reativas e/ou diminuição da capacidade do sistema antioxidante, gerando estresse oxidativo que pode causar danos às biomoléculas (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Estudos prévios demonstraram alteração dos parâmetros de estresse oxidativo e nitrosativo em pacientes com MPS II. Jaques *et al.* (2016) mostraram aumento da di-tirosina urinária em pacientes, assim como aumento dos níveis urinários de nitrato + nitrito e óxido nítrico plasmático. Outro estudo avalia parâmetros de estresse oxidativo sanguíneo em pacientes com MPS II, antes e durante 6 meses de TRE. Observou-se aumento dos níveis de malondialdeído (parâmetro de lipoperoxidação) e de grupos carbonila (indicador de dano proteico) no plasma, bem como da atividade da catalase eritrocitária em pacientes homozigotos do sexo masculino antes do tratamento em comparação ao grupo controle. Nenhuma alteração significativa foi demonstrada após o tratamento (Filippon *et al.* 2011a).

Um modelo celular knockout com HEK 293 HP 10, que apresenta caráter homozigoto, apresentou aumento na produção de espécies reativas de oxigênio através da medição de DCF. Quando co-incubados com genisteína, 25 μm e 50 μm , houve diminuição na dosagem de DCF. No entanto, a coenzima Q10 não teve o mesmo efeito neste parâmetro bioquímico. No mesmo estudo, também foi avaliada a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT. As enzimas antioxidantes SOD e CAT foram significativamente aumentadas nas células HEK 293 HP 10 quando comparadas ao controle WT. A genisteína e a coenzima Q10 induziram *in vitro* uma diminuição significativa na atividade da enzima SOD em todas as concentrações testadas. Em contraste, genisteína e coenzima Q10 não mostraram nenhum efeito na atividade da enzima antioxidante CAT (Jacques *et al.* 2022). Como pode ser observado, nosso modelo celular apresentou menor estresse oxidativo, demonstrando que nosso modelo celular representa um fenótipo mais brando da doença.

As mitocôndrias são as organelas intracelulares que desempenham um papel significativo nas células, metabolizando nutrientes e produzindo a “moeda energética” ATP e é responsável por diversos processos como metabolismo energético, geração de RL e homeostase do cálcio, sobrevivência e morte celular. Atualmente, estima-se que alterações fisiopatológicas nas mitocôndrias no envelhecimento e muitos outros distúrbios metabólicos estão ligados ao comprometimento da função mitocondrial, ocorrendo diminuição da capacidade antioxidante por aumento da geração de ERO e redução da síntese de ATP via fosforilação oxidativa (Batthi *et al.* 2016).

Já está descrito na literatura que mutações no DNA mitocondrial e estresse oxidativo contribuem para o envelhecimento, que é um importante fator de risco para doenças neurodegenerativas. Em todos os principais exemplos dessas doenças, há fortes evidências de que a disfunção mitocondrial ocorre precocemente e atua causalmente na patogênese da doença (Lin e Beal 2006). Estudos em humanos e vários modelos animais de doença de Parkinson revelam que a disfunção mitocondrial pode ser um defeito que ocorre no início da patogênese da doença de Parkinson. As anormalidades mitocondriais gerais ligadas à doença incluem comprometimento da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, alterações na morfologia e dinâmica mitocondrial, mutações no DNA mitocondrial e anomalia na homeostase do cálcio (Subramaniam e Chesselet 2013).

No que diz respeito à função mitocondrial, não houve aumento significativo na medição do MitoStatus nas células HEK-293 KO HP 18 em comparação com as células WT, nem quando tratadas com coenzima Q10. Porém, foi observado um aumento significativo na medição do MitoStatus induzido *in vitro* pela genisteína. Dados da

literatura mostram que a genisteína pode mediar a apoptose mitocondrial, ativando mecanismos específicos que levam à disfunção mitocondrial, como por exemplo, a ruptura do potencial de membrana mitocondrial (de Oliveira, 2016). O mesmo resultado foi encontrado em outro modelo celular descrito na literatura (Jacques *et al.*, 2022). Houve uma tendência a um aumento no volume lisossômico nas células HEK-293 KO HP 18 em comparação com as células WT.

A autofagia, que é realizada pelos lisossomos, tem como objetivo mediar a renovação mitocondrial, processo conhecido como mitofagia (Wang e Wang, 2019). Portanto, nas DLDs, onde há comprometimento lisossomal, também haverá disfunção mitocondrial, como podemos observar na figura 11 (Fecarotta *et al.*, 2020). Além disso, perturbações na função mitocondrial estão sendo correlacionadas com o processo de neurodegeneração, que ocorre em algumas MPS, como na MPS II (Martins *et al.*, 2015; Saffari *et al.*, 2017; Plotegher e Duchon, 2017; Annunziata *et al.*, 2018).

Supõe-se que nosso modelo celular poderia ser comparado com um fenótipo mais brando de MPS II, visto que o acúmulo de GAGs nos lisossomos não é tão expressivo quanto outro modelo celular para MPS II apresentado na literatura (Jacques *et al.*, 2022). Portanto, é razoável esperar que não haja disfunção mitocondrial, uma vez que há menos comprometimento lisossomal, bem como menos desequilíbrio redox.

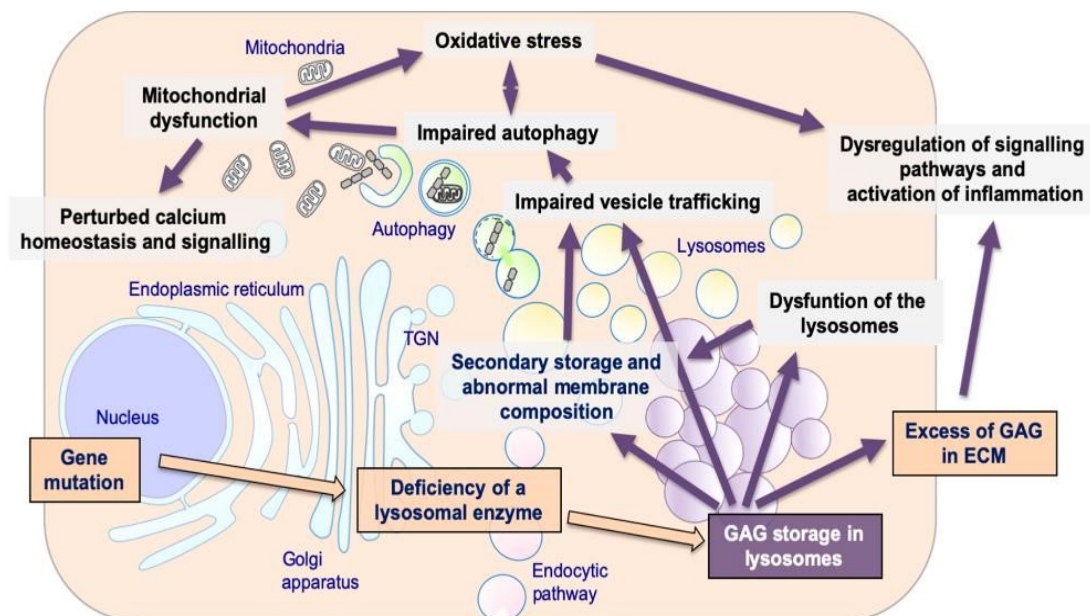


Figura 11: A cascata patogénica das MPSs (adaptado de Fecarotta *et al.*, 2020)

No presente estudo, não identificamos danos ao DNA em células HEK-293 KO HP 18 quando comparadas às células do grupo controle. O ensaio cometa alcalino é um teste rápido, simples e sensível para detectar quebras de fitas de DNA e sítios alcalinos-lábeis em células individuais (Liao *et al.* 2009). Alterações no DNA podem induzir mutações, câncer e citotoxicidade, entre outros (Minko *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2008; Jena *et al.*, 2012). Filippon *et al.* (2011b), analisaram danos no DNA pelo ensaio do cometa alcalino em pacientes homocigotos do sexo masculino com MPS II antes do tratamento e durante os primeiros seis meses de TRE. O estudo indicou que pacientes homocigotos do sexo masculino com MPS II apresentaram danos no DNA e que a TRE de curta duração é capaz de proteger contra esse processo. O dano ao DNA é amplamente descrito em vários erros inatos do metabolismo, como fenilcetonúria, acidúria glutárica, tirosinemia tipo II, mucopolissacaridose tipo IVA, entre outros (Deon *et al.*, 2015; Delgado *et al.*, 2019; Donida *et al.*, 2015; Streck *et al.*, 2017).

Um estudo anterior demonstrou danos ao DNA significativamente maiores em células HEK293 KO HP 10 MPS II quando comparadas com células de controle do tipo selvagem. Por sua vez, a coenzima Q10 na concentração de 10 μ m diminuiu *in vitro* o dano ao DNA dessas células, levantando a hipótese de que o dano ao DNA desse modelo de célula homocigótica seja de origem oxidativa (Jacques *et al.* 2022). Como as células HEK293 KO HP 18 MPS II apresentaram menor estresse oxidativo e menor alteração mitocondrial, é de se esperar que não se encontrem danos ao DNA, devido ao seu caráter heterocigoto.

Concluindo, nosso estudo demonstrou que este modelo celular pode estar relacionado a um fenótipo mais leve de MPS II, uma vez que não foram observados danos ao DNA, aumento da produção de enzimas antioxidantes e disfunção mitocondrial. Há um aumento na produção de ERO, o que sugere que seja secundário ao acúmulo de GAGs neste modelo celular, mesmo que em nível inferior. Neste contexto, a genisteína pode ser uma opção de tratamento terapêutico adjuvante, pois, ao diminuir os níveis de GAGs, diminui a produção de ERO. Como mencionado anteriormente, a MPS II é uma doença que apresenta grande heterogeneidade clínica, devido a diferentes mutações que podem ocorrer no gene IDS. Assim, estes pacientes podem apresentar diferentes fenótipos, desde os mais brandos aos mais agressivos, sendo importante dispor de meios que nos permitam estudar estas diferenças, não só para melhor elucidar os mecanismos fisiopatológicos desta doença, mas também para podermos analisar qual será a melhor forma de ajudar esses pacientes e melhorar sua qualidade de vida.

5. CONCLUSÕES

Em relação aos dados apresentados sobre os pacientes MPS IVA foi relatado pela primeira vez que não há aumento significativo da resposta inflamatória e estresse oxidativo/nitrosativo em pacientes com MPS IVA sob tratamento prolongado com TRE, demonstrando o efeito protetor do tratamento em relação aos parâmetros estudados e a importância de iniciar o tratamento nos estágios iniciais da doença. Já os dados referentes aos pacientes MPS II corroboram os dados encontrados na literatura, demonstrando que os mesmos se encontram em estado pró-inflamatório e oxidativo. Nosso estudo também mostra evidências sugerindo que o TCTH pode corrigir esses parâmetros bioquímicos, devendo ser melhor investigado. Ainda, nosso estudo é pioneiro em demonstrar aumento na produção de IL-17a plasmática, citocina amplamente estudada em doenças com dano osteoarticular, mostrando que ela pode estar envolvida na fisiopatologia da MPS II. Além disso, demonstra um novo potencial alvo terapêutico para estudos sobre o tratamento da MPS II, visando melhorar a qualidade de vida desses pacientes.

Em conclusão ao nosso estudo de modelo celular por edição gênica, foi demonstrado que o modelo celular heterozigoto composto nocaute MPS II apresenta menos alterações nos parâmetros estudados, em comparação com o modelo de celular homozigoto nocaute MPS II, demonstrando que esse modelo celular pode ser correlacionado com um fenótipo mais brando da doença. Além disso, concluímos que a genisteína pode ser uma opção terapêutica coadjuvante, pois, ao diminuir os níveis de GAGs, diminui a produção de espécies reativas de oxigênio. Este modelo celular pode ajudar a caracterizar melhor os diferentes fenótipos apresentados na MPS II e elucidar

sua fisiopatologia, bem como demonstrar os benefícios da genisteína nesta doença, o que deverá ser melhor avaliado em um futuro ensaio clínico.

PERSPECTIVAS

Como perspectiva, gostaríamos de dar continuidade a este trabalho através do desenvolvimento e caracterização de modelo celular por edição gênica de MPS IVA, avaliando dano oxidativo, através da avaliação da produção de ERO/ERN nas células *knock-outs*, através da análise de DCF; avaliação das defesas antioxidantes enzimáticas nas células *knock-outs*, através da determinação da atividade das enzimas CAT e SOD; avaliação do potencial da membrana mitocondrial em células *knock-outs* através da análise com o corante MitoStaus; avaliação do volume do lisossomo das células *knock-outs* através do corante LysoTracker e avaliação do dano ao DNA através do ensaio cometa. Ainda, gostaríamos de avaliar a concentração de citocinas pró e anti-inflamatórias nesse mesmo modelo celular. Além disso, gostaríamos de estudar os mesmos biomarcadores analisados neste trabalho de inflamação e dano oxidativo em um maior número de pacientes MPS II pós-TCTH.

REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol.** v. 105, p.121-126, 1983

ABDULKHALEQ, L.A., *et al.* The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. **Vet World.** v.11, n. 5, p. 627-635, 2018.

ADAMOPOULOS, I.E., *et al.* IL-17A gene transfer induces bone loss and epidermal hyperplasia associated with psoriatic arthritis. **Ann Rheum Dis.** v. 74, n. 6, p. 1284-92, 2015.

ADAMOPOULOS, I.E., *et al.* Interleukin-17A upregulates receptor activator of NF-kappaB on osteoclast precursors. **Arthritis Res Ther.** v. 12, n. 1, R29, 2010.

AKSENOV, M.Y.; MARKESBERY, W.R.. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neurosci Lett.** v. 302, p.141-145, 2001.

AREND, W.P. Interleukin 1 receptor antagonist. A new member of the interleukin 1 family. **J Clin Invest.** v. 88, p. 1445-1451, 1991.

ARFI, A., *et al.* Neuroinflammatory and Oxidative Stress Phenomena in MPS IIIA Mouse Model: The Positive Effect of Long-Term Aspirin Treatment. **Mol. Genet. Metab.** v. 103, p.18–25, 2011.

BAEHNER, F., *et al.* Cumulative incidence rates of the mucopolysaccharidoses in Germany. **J Inherit Metab.** v. 28, n. 6, p. 1011-7, 2005.

BAGEWADI, S., *et al.* Home treatment with elaprase and Naglazyme is safe in patient with mucopolysaccharidoses types II and VI, respectively. **J. Inherit Metab Dis.** v. 31, p. 733-73, 2008.

BARSHAK, A.G., *et al.* Erythrocyte glutathione peroxidase activity and plasma selenium concentration are reduced in maple syrup urine disease patients during treatment. **Int J Dev Neurosci.** v.25, n. 5, p. 335-338, 2005.

BHATTI, J.S.; BHATTI, G.K.; REDDY, P.H.. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders - A step towards mitochondria based therapeutic strategies. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.** V.1863, n. 5, p.1066-1077, 2017.

BLANCO, M.L.; NETO, A.C. A. Nuclear factor kappa B: a new perspective for the study of anti-inflammatory drugs. **Rev ciênc. méd.** v.12,n. 4, p. 341-349, 2003.

BOELEN, J.J.; van HASSELT, P.M. Neurodevelopmental Outcome after Hematopoietic Cell Transplantation in Inborn Errors of Metabolism: Current Considerations and Future Perspectives. **Neuropediatrics.** V.47, n.5, p. 285-92, 2016.

BRADLEY, L.A.; HADDOW, H.R.M.; PALOMAKI, G.E.. Treatment of mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): results from a systematic evidence review. **Genet Med.** V. 19, n. 9, p. 1187-1201, 2017.

CHAVES, A. G., *et al.* Síndrome de Morquio: relato de caso e revisão da literatura. **Rev Bras Otorrinolaringol.** V. 69, n. 2, p. 267-271, 2003.

CIMAZ, R.; LA TORRE, F. Mucopolysaccharidoses. **Curr Rheumatol Rep.** v.16,n. 1, p. 389, 2014.

COELHO, J.C., *et al.* Selective screening of 10.000 high risk Brazilian patients for the detection of inborn errors of metabolism. **Eur J Pediatr.** v. 156, p. 650-654, 1997.

COMAN, D.J., *et al.* Enzyme replacement therapy for Mucopolysaccharidoses: Opinions of Patients and Families. **J. Pediatr.** V.152, n. 5, p. 723-727, 2008.

COPPLE, I. M. The Keap1-Nrf2 cell defense pathway – a promising therapeutic target. **Adv Pharmacol.** V. 63, p. 43-79, 2012.

COSTI. S.; CAPORALI, R.F.; MARINO, A. Mucopolysaccharidosis: What Pediatric Rheumatologists and Orthopedics Need to Know. **Diagnostics (Basel).** V. 27, n. 13, p. 1-17, 2022.

DA SILVA, M.S., *et al.* ACTAMSM. Rio de Janeiro.v.6, n.4, 2019

DE RUIJTER J, *et al.* Genistein in Sanfilippo disease: a randomized controlled crossover trial. **Ann Neurol.** V. 71, n. 1, p. 110-20, 2012.

DOS SANTOS M.M., *et al.* Increased oxidative stress in patients with 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria. **Mol CellBiochem.** V.402, p.149-155, 2015.

DABROWSKA, M. *et al.* Generation of New Isogenic Models of Huntington's Disease Using CRISPR-Cas9 Technology. **Int J Mol Sci,** v. 21, n. 5, p. 1854, 2020.

DELGADO, C.A. *et al.* Prevention by L-carnitine of DNA damage induced by 3-hydroxy-3-methylglutaric and 3-methylglutaric acids and experimental evidence of lipid and DNA damage in patients with 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria. **Arch Biochem Biophys.** v.15, n. 668, p. 16-22, 2019.

DEON, M. *et al.* Protective effect of L-carnitine on Phenylalanine-induced DNA damage. **Metab Brain Dis.** v. 30, p.925–93, 2015.

DONIDA, B. *et al.* Oxidative stress and inflammation in mucopolysaccharidosis type IVA patients treated with enzyme replacement therapy. **Biochim Biophys Acta.** v. 1852, n. 5, p. 1012-9, 2015.

DONIDA, B. *et al.* Oxidative profile exhibited by Mucopolysaccharidosis type IVA patients at diagnosis: Increased keratan urinary levels. **Mol Genet Metab Rep.** v. 25, n. 11, p. 46-53, 2017.

DONIDA, B.; Marchetti, D.P.; Jacques, C.E. D. Oxidative profile exhibited by Mucopolysaccharidosis type IVA patients at diagnosis: Increased keratan urinary levels. **Mol Genet Metab Rep.** v. 25, n.11, p. 46-53, 2017.

DVORAK-EWELL, M. *et al.* Enzyme Replacement in a Human Model of Mucopolysaccharidosis IVA In Vitro and Its Biodistribution in the Cartilage of Wild Type Mice. **PLoS ONE.** V. 5, n. 8, p. 1-11, 2011.

FILIPPON, L. *et al.* Oxidative stress in patients with mucopolysaccharidosis type II before and during enzyme replacement therapy. **Mol Genet Metab** v.103, p.121-127a, 2011a.

FILIPPON, L. *et al.* DNA damage in leukocytes from pretreatment mucopolysaccharidosis type II patients; protective effect of enzyme replacement therapy. **Mutation Research**. V. 721, p. 206-210b, 2011b.

FRISO. A. *et al.* Genistein reduces glycosaminoglycan levels in a mouse model of mucopolysaccharidosis type II. **Br J Pharmacol** v. 159, n. 5, p. 1082-91, 2010.

FUJITSUKA, H. *et al.* Biomarkers in patients with mucopolysaccharidosis type II and IV. *Mol Genet Metab Rep*. v. 5, n. 19, p. 100455, 2019.

HAMANO, K. *et al.* Mechanisms of neurodegeneration in mucopolysaccharidoses II and IIIB: analysis of human brain tissue. **Acta Neuropathol**. V.115, n. 5, p. 547-59, 2008.

HEINRICH, P.C.; CASTELL, J.V.; ANDUS, T. Interleukin-6 and the acute phase response. **Biochem J**. v. 265, n.3, p. 621-636, 1990.

HENDRIKSZ, C.J. *et al.* 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**. V.37, p. 979-990, 2014.

HIGDON, A. *et al.* Cell signalling by reactive lipid species: new concepts and molecular mechanisms. **Biochem J**. v. 442, p. 453-464, 2012.

HOLTZ, W.R., in *Skin Aging Handbook*, 2009

HOOGERBRUGGE, P.M. *et al.* Allogeneic bone marrow transplantation for lysosomal storage diseases. The European Group for Bone Marrow Transplantation. **Lancet**. v. 345, n. 8962, p.1398-402, 1995.

JACQUES, C.E. *et al.* Oxidative and nitrative stress and pro-inflammatory cytokines in Mucopolysaccharidosis type II patients: effect of long-term enzyme replacement therapy and relation with glycosaminoglycan accumulation. **Biochim Biophys Acta** v. 1862, n.9, p.1608-16, 2016.

JACQUES, C.E.D. *et al.* Evaluation of oxidative stress and mitochondrial function in a type II mucopolysaccharidosis cellular model: in vitro effects of genistein and coenzyme Q10. **Metab Brain Dis**, 2022.

JENA, N.R.; MISHRA, P.C. Formation of ring-opened and rearranged products of guanine: mechanisms and biological significance. **Free Radical Biol. Med**. v. 53, p. 81-94, 2012.

Kapturczak M.H., Wasserfall C., Brusko T., Campbell-Thompson M., Ellis T.M. *et al.* Heme oxygenase-1 modulates early inflammatory responses: evidence from the heme oxygenase-1-deficient mouse. *Am J Pathol*. 165 (2004) 1045-53.

Kirschbaum B. Correlative studies of urine fluorescence and free radical indicator. ¹²³.....
Nephrol. 58 (2002) 344-349.

Kennedy J. Mouse IL-17: a cytokine preferential-ly expressed by alpha beta TCR+CD4+ CD8-T cells. *J Interferon Cytokine Res*. 1996; 16(8):611-617.

Lankaster B.J.A., Whitehouse M., Gargan M.F. Morquio syndrome. *Curr Orthop*. 20 (2006) 128–131.

Lewis K.N., Mele J., Hayes J.D., Buffenstein R., R. Nrf2, a guardian of healthspan and gatekeeper of species longevity. *Integr comp Biol*. 50 (5) (2010) 829-843.

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

Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*. 2006 Oct 19;443(7113):787-95. doi: 10.1038/nature05292. PMID: 17051205.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1):265-75.

Lyseng-Williamson K.A.. Elosulfase Alfa: A Review of Its Use in Patients with Mucopolysaccharidosis Type IVA (Morquio A Syndrome). *BioDrugs*.28 (2014) 465-475.

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

124

Marinho H.S., Real C., Cyrne L., Soares H., Antunes F.. Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. *Redox Biol*. 2 (2014) 535–562.

Magesh S., Y. Chein, L. HU. Small molecule modulators of Keap1-Nrf2-ARE pathway as a potencial preventive and therapeutic agents. *Med Res Rev*. 32 (4)(2012) 687-726, 2012.

Marucha, J. *et al*. Improvement in the range of joint motion in seven patients with mucopolysaccharidosis type II during experimental gene expression-targeted isoflavone therapy (GET IT). *Am J Med Genet A*, v. 155A, n. 9, p. 2257-2262. 2011.

Mackay F, Loester H, Stueber D, Gehr G, Les-slaur W. Tumor necrosis factor alpha (TNF- α)-induced cell adhesion to human endothelial cells is under dominant control of one TNF receptor type, TNF-R55. *J Exp Med*. 1993;177:1277-1286.

Mannucci C, Calapai G, Gangemi S. Commentary: Circulatory pattern of cytokines, adipokines and bone markers in postmenopausal women with low BMD. *Front Immunol* (2019) 10:2666.

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

McBride KL, Flanigan KM. Update in the Mucopolysaccharidoses. *Semin Pediatr Neurol*. 2021 Apr;37:100874. doi: 10.1016/j.spen.2021.100874. Epub 2021 Feb 10. PMID: 33892850.

Mescka C.P., C.A.Y Wayhs, G. Guerreiro, V. Manfredini, C.S. Dutra-Filho, C.R. [Vargas](#) .Prevention of DNA damage by l-carnitine induced by metabolites accumulated in maple syrup urine disease in human peripheral leukocytes in vitro. *Gene*. 548 (2014) 294-298.

Michaud M, Belmatoug N, Catros F, Ancellin S, Touati G, Levade T, Gaches F. Mucopolysaccharidoses : quand y penser ? [Mucopolysaccharidosis: A review]. *Rev Med Interne*. 2020 Mar;41(3):180-188. French.

Montaño A.M. , Tomatsu S. , Brusius A., Smith M., Orii T.. Growth charts for patients affected with Morquio A disease. *Am. J. Med. Genet.* 146A (2008) 1286-1295

Muenzer J., Wraith J.E. , [Beck M.](#), [Giugliani R.](#), [Harmatz](#), P. [C.M. Eng](#), [A. Vellodi](#) *et al.* A phase II/III clinical study of enzyme replacement therapy with idursulfase in mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome). *Genet Med.* 8 (2006) 465–473.

Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF (1999). Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA*. 20;281(3):249-54. doi: 10.1001/jama.281.3.249.

Minko IG, Harbut MB, Kozekov ID, Kozekova A, [Jakobs PM](#), [Olso SB](#) *et al* (2008). Role for DNA polymerase in the processing of N2-N2-guanine interstrand cross-links. *J. Biol. Chem* 283:17075–17082.

Misra HP, Fridovich I (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 247(10):3170-5. 125

Montaño A. M., [Tomatsu S.](#), [Gottesman G.S.](#), [Smith M.](#), [Orii T.](#). International Morquio A Registry: Clinical manifestation and natural course of Morquio A disease. *J Inherit Metab Dis.* 30 (2007) 165– 174.

Montero R, Yubero D, Salgado MC, González MJ, Campistol J, O'Callaghan MDM, Pineda M, Delgadillo V, Maynou J, Fernandez G, Montoya J, Ruiz-Pesini E, Meavilla S, Neergheen V, García-Cazorla A, Navas P, Hargreaves I, Artuch R (2019). Plasma coenzyme Q₁₀ status is impaired in selected genetic conditions. *Sci Rep.* 28;9(1):793. doi: 10.1038/s41598-018-37542-2.

Morán GAG, Parra-Medina R, Cardona AG, Quintero-Ronderos P, Rodríguez EG. Autoimmunity: From Bench to Bedside. Chapter 9: Cytokines, chemokines and growth factors. Bogota (Colombia): El Rosario University Press; 2013 Jul 18.

Nagase H. Visse. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ. Res.*, 92 (2003) 827-839.

Nakamura-Utsunomiya A. Bone Biomarkers in Mucopolysaccharidoses. *Int J Mol Sci.* 2021 Nov 23;22(23):12651.

Nelson J, Crowhurst J, Carey B et al (2003) Incidence of the mucopolysaccharidoses in Western Australia. *Am J Med Genet A.* 15;123A(3):310-3.

Neufeld EF, Muenzer J (2001). The mucopolysaccharidoses. In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.s., Valle, D. (Eds.) *The metabolic basis of inherited disease.* 8a edição. New York: McGraw Hill 3421-3452.

de Oliveira MR. Evidence for genistein as a mitochondriotropic molecule. *Mitochondrion.* 2016 Jul;29:35-44.

Olsen RK, Cornelius N, Gregersen N (2013) Genetic and cellular modifiers of oxidative stress: what can we learn from fatty acid oxidation defects? *Mol Genet Metab.* 110 Suppl:S31-9.

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

Opal S.M., V.A. DePalo. Anti-Inflammatory Cytokines, *Chest*, Volume 117, Issue 4,2000,Pages 1162-1172,ISSN 0012-3692,

Opoka-Winiarska V, Jurecka A, Emeryk A, Tylki-Szymańska A. Osteoimmunology in mucopolysaccharidoses type I, II, VI and VII. Immunological regulation of the osteoarticular system in the course of metabolic inflammation. *Osteoarthritis Cartilage.* 2013 Dec;21(12):1813-23.

Okun E., K.J. Griffioen, M.P. Mattson. Toll-like receptor signaling in neural plasticity and disease. *Trends Neurosci.* 34 (2011) 269–281.

Pereira V.G., A.M. Martin, C. Michelett, 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.

126

Piña-Aguilar RE, Zaragoza-Arévalo GR, Rau I et al (2013). Mucopolysaccharidosis type II in a female carrying a heterozygous stop mutation of the iduronate-2-sulfatase gene and showing a skewed X chromosome inactivation. *Eur J Med Genet.* 5;3:159-62.

Pinto R, Caseiro C, Lemos M, Lopes L, Fontes A, Ribeiro H, Pinto E, Silva E, Rocha S, Marcão A, Ribeiro I, Lacerda L, Ribeiro G, Amaral O, Sá Miranda MC (2004). Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal. *Eur J Hum Genet* 12(2):87-92. doi: 10.1038/sj.ejhg.5201044.

Polgreen LE, Vehe RK, Rudser K, Kunin-Batson A, Utz JJ, Dickson P, Shapiro E, Whitley CB. Elevated TNF- α is associated with pain and physical disability in mucopolysaccharidosis types I, II, and VI. *Mol Genet Metab.* 2016 Apr;117(4):427-30. doi: 10.1016/j.ymgme.2016.01.012. Epub 2016 Jan 28

Poorthuis BJ, Wevers RA, Kleijer WJ et al (1999). The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. *Hum Genet.* 105;1-2:151-6.

Poupětová H, Ledvinová J, Berná L, Dvořáková L, Kožich V, Elleder M, (2010)The birth prevalence of lysosomal storage disorders in the Czech Republic: comparison with data in different populations, *J. Inherit. Metab* 33(4): 387–396./doi: 10.1007/s10545-010-9093-7.

Ranganathan V, Gracey E, Brown MA, Inman RD, Haroon N. Pathogenesis of ankylosing spondylitis - recent advances and future directions. *Nat Rev Rheumatol* (2017) 13(6):359–67. 10.1038/nrrheum.2017.56

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

Ribas G.S., Manfredini V., de Mari J.F., [Wayhs](#) C.Y., [Vanzin](#) C.S., Bianciniet G.B. *et al.* 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.

Roversi F.M., Galdieri L.C., Grego B.H.C., Souza F.G., Michelett C., Martins A.M., *et al.* Blood oxidative stress markers in Gaucher disease patients. *Clin Chim Acta.* 364 (2006) 316-320.

Sawamoto K, Álvarez González JV, Piechnik M, Otero FJ, Couce ML, Suzuki Y, Tomatsu S. Mucopolysaccharidosis IVA: Diagnosis, Treatment, and Management. *Int J Mol Sci.* 2020 Feb 23;21(4):1517. doi: 10.3390/ijms21041517. PMID: 32102177; PMCID: PMC7073202

Scriver C.R., Beaudt A.L., Sly W.L., Valle d. *The metabolic and molecular bases of inherited disease.* 8 ed. New york, mcgraw-hill inc., 2001.

Shen F, Gaffen SL. Structure-function relationships in the IL-17 receptor: implications for signal transduction and therapy. *Cytokine* (2008) 41(2):92–104.

da Silva, F. O. C., and Macedo, D. V. Physical exercise, inflammatory process and adaptive condition: an overview. *Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum* 2011, 13(4):320–3

Simonaro C.M. Chapter 6, Inflammation and Its Role in the Lysosomal Storage Disorders, *Mucopolysaccharidoses Update* vol.1, Nova Science Publishers, New York (2018) 75-8 R. 127

Simonaro C.M., M. D'Angelo, M.E. Haskins, E.H. Schuchman. Joint and bone disease in mucopolysaccharidoses VI and VII: identification of new therapeutic targets and biomarkers using animal models. *Pediatr Res.* 57 (2005) 701-707,

Simonaro C.M., Y. Ge, E. Eliyahu, X. He, K.J. Jepsen, E.H. Schuchman Involvement of the Toll-like receptor 4 pathway and use of TNF- antagonists for treatment of the mucopolysaccharidoses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107 (2010) 222-227,

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175: 184–191.

Sitta A., Barschak A.G., Deon M., de Mari J.F., Barden A.T, Vanzinet C.S. *et al.* L-Carnitine Blood Levels and Oxidative Stress in Treated Phenylketonuric Patients, *Cell. Mol. Neurobiol.* 29 (2009) 211-218.

Stepanenko AA, Dmitrenko VV (2015). HEK293 in cell biology and cancer research: phenotype, karyotype, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution. *Gene.* 15;569(2):182-90. doi: 10.1016/j.gene.2015.05.065.

Streck EL, De Prá SDT, Ferro PR, Carvalho-Silva M, Gomes LM, Agostini JF *et al* (2017). Role of antioxidant treatment on DNA and lipid damage in the brain of rats subjected to a chemically induced chronic model of tyrosinemia type II. *Mol Cell Biochem.* 435:207-214.

Subramaniam SR, Chesselet MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 2013 Jul-Aug;106-107:17-32. doi: 10.1016/j.pneurobio.2013.04.004. Epub 2013 Apr 30. PMID: 23643800; PMCID: PMC3742021.

Taguchi K., Motohashi H., Yamamoto M.. Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells*. 16 (2) (2011) 123-140.

Taams LS, Steel KJA, Srenathan U, Burns LA, Kirkham BW. IL-17 in the immunopathogenesis of spondyloarthritis. *Nat Rev Rheumatol* (2018) 14(8):453–66.

Tang M, Lu L, Yu X. Interleukin-17A Interweaves the Skeletal and Immune Systems. *Front Immunol*. 2021 Feb 4;11:625034.

Tessitore A, Faella A, O'Malley T, Cotugno G, Doria M, Kunieda T, Matarese G, Haskins M, Auricchio A. Biochemical, pathological, and skeletal improvement of mucopolysaccharidosis VI after gene transfer to liver but not to muscle. *Mol Ther*. 2008 Jan;16(1):30-7. doi: 10.1038/sj.mt.6300325. Epub 2007 Oct 23. PMID: 17955027.

Tsai, T. H. Concurrent measurement of unbound genistein in the blood, brain and bile of anesthetized rats using microdialysis and its pharmacokinetic application. *J Chromatogr A*, v. 1073, n. 1-2, p. 317-322, 2005.

Tomatsu S, A.M. Montaña, H. Oikawa, M. Smith, L. Barrera, Y. Chinen *et al.* Mucopolysaccharidosis Type IVA (Morquio A Disease): Clinical Review and Current Treatment: A Special Review. *Curr Pharm Biotechnol*. 12 (2011) 931-945.

128

Tyagi AM, Srivastava K, Mansoori MN, Trivedi R, Chattopadhyay N, Singh D. Estrogen deficiency induces the differentiation of IL-17 secreting Th17 cells: a new candidate in the pathogenesis of osteoporosis. *PloSone* (2012) 7(9):e44552.

Varella P. V., Neves F Wi C.. Citokines: a review. *Rev. bras. alerg. imunopatol*. 2001; 24(4):146-154

Wajner M, Goodman S (2011)l. Disruption of mitochondrial homeostasis in organic acidurias: insights from human and animal studies. *J Bioenerg Biomembr* 43:31-38.

Wajner M., A. Latini, A.T.S. Wyse. The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidurias: insights from animal studies. *J InherMetab Dis*. 27 (2004) 427-448.

Waza A.A., Hamid Z., Ali S., Bhat S.A, Bhat M.A.. A review on heme oxygenase-1 induction: is it a necessary evil. *Inflamm Res*. 67 (7) (2018) 579-588.

Wiesinger AM, Bigger B, Giugliani R, Scarpa M, Moser T, Lampe C, Kampmann C, Lagler FB. The Inflammation in the Cytopathology of Patients With Mucopolysaccharidoses-Immunomodulatory Drugs as an Approach to Therapy. *Front Pharmacol*. 2022 May 13;13:863667.

Wiśniewska K, Wolski J, Gaffke L, Cyske Z, Pierzynowska K, Węgrzyn G. Misdiagnosis in mucopolysaccharidoses. *J Appl Genet*. 2022 Sep;63(3):475-495. doi: 10.1007/s13353-022-00703-1. Epub 2022 May 13. PMID: 35562626.

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

Xu X, Muller JG, Ye Y and Burrows CJ (2008). DNA-protein crosslinks between guanine and lysine depend on the mechanism of oxidation for formation of C5 Vs C8 guanosine adducts. *J. Am Chem Soc* 130:703–709.

Xue Y, Liang Z, Fu X, Wang T, Xie Q, Ke D. IL-17A modulates osteoclast precursors' apoptosis through autophagy-TRAF3 signaling during osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* (2019) 508(4):1088–92.

Young ID, Harper PS, Archer IM, Newcombe RG (1982). A clinical and genetic study of Hunter's syndrome. 1. Heterogeneity. *J Med Genet.* 19(6):401-7. doi:0.1136/jmg.19.6.401.

Zanetti A, D'Avanzo F, AlSayed M, Brusius-Facchin AC, Chien YH, Giugliani R, Izzo E, Kasper DC, Lin HY, Lin SP, Pollard L, Singh A, Tonin R, Wood T, Morrone A, Tomanin R. Molecular basis of mucopolysaccharidosis IVA (Morquio A syndrome): A review and classification of GALNS gene variants and reporting of 68 novel variants. *Hum Mutat.* 2021 Nov;42(11):1384-1398. doi: 10.1002/humu.24270. Epub 2021 Aug 23. PMID: 34387910; PMCID: PMC9291100.

Zhao R, Wang X, Feng F. Upregulated Cellular Expression of IL-17 by CD4+ T-Cells in Osteoporotic Postmenopausal Women. *Ann Nutr Metab* (2016) 68(2):113–8. 129

Zhou J, Lin J, Leung WT, Wang L. A basic understanding of mucopolysaccharidosis: Incidence, clinical features, diagnosis, and management. *Intractable Rare Dis Res.* 2020 Feb;9(1):1-9. doi: 10.5582/irdr.2020.01011. PMID: 32201668; PMCID: PMC7062595.

Zrioual S, Toh ML, Tournadre A, Zhou Y, Cazalis MA, Pachot A, et al. IL-17RA and IL-17RC receptors are essential for IL-17A-induced ELR+ CXC chemokine expression in synoviocytes and are overexpressed in rheumatoid blood. *J Immunol (Baltimore Md 1950)* (2008) 180(1):655–63. 10.4049/jimmunol.180.1.655

ANEXOS

Anexo 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – (Indivíduos controles)

Título do Projeto: Investigação dos biomarcadores de inflamação e estresse oxidativo em pacientes portadores de mucopolissacaridoses: efeito *in vivo* da terapia de reposição enzimática e *in vitro* de antioxidantes.

Vimos através deste convidar você ou a pessoa pela qual você é responsável a participar de uma pesquisa cujo objetivo é verificar os efeitos da ação dos radicais livres (por exemplo radiação solar) e de substâncias antioxidantes (por exemplo, vitaminas) em pacientes com mucopolissacaridose tipo I, II e IV A. Também será avaliado o efeito do tratamento utilizado rotineiramente nesta doença sobre a ação destas substâncias antioxidantes e dos radicais livres. Você está sendo convidado a participar deste estudo como controle, ou seja, por não ser portador dessa doença. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Se você concordar com a participação na pesquisa, os procedimentos envolvidos são os seguintes: exames de sangue, urina, e coleta de biópsia de pele (fibroblastos), coleta de dados através de entrevistas realizadas com pacientes e/ou responsáveis.

Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação na pesquisa podem ocorrer no momento da coleta de sangue, onde poderá haver alguma dor em decorrência da punção da pele. Complicações de coleta de sangue são raras e geralmente simples. Se houver vazamento de sangue da veia no local da punção poderá se formar uma mancha roxa (hematoma) e um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias. Para a coleta de fibroblastos, você receberá uma anestesia tópica (cremes anestésicos) e o procedimento se dará através da retirada de um pequeníssimo fragmento (3 mm, equivalente ao tamanho de uma cabeça de fósforo) de pele através de uma biópsia. As coletas de sangue e fibroblastos serão realizadas por profissionais especialmente treinados para este fim, o que diminui as chances de complicações. As coletas de urina serão feitas pelo próprio indivíduo ou com o auxílio de profissionais treinados.

Os possíveis benefícios decorrentes da participação na pesquisa são o melhor entendimento sobre essa patologia e para o estabelecimento de novos tratamentos para essa doença, melhorando a qualidade de vida dos pacientes portadores da mucopolissacaridose tipo I, II e IV A .

A participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não autorizar a participação, ou ainda, retirar a autorização após a assinatura desse Termo, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que o participante da pesquisa recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação na pesquisa e não haverá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos, porém, poderá haver ressarcimento por despesas decorrentes da participação, como despesas de transporte e alimentação, cujos custos serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Rubrica do responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

Página 139 de 147

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, os nomes não aparecerão na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Profa. Dra. Carmen Regla Vargas, pelo telefone 3359.8011, com a pesquisadora Camila Aguilar Delgado, pelo mesmo telefone ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, no 2º andar do HCPA, sala 2229, de segunda à sexta, das 8h às 17h, ou por e-mail cep@hcpa.edu.br.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e seu responsável e outra para os pesquisadores.

Nome do participante da pesquisa:

Assinatura (*se aplicável*)

Nome do responsável

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

Local e Data: _____

Rubrica do responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

Página 2 de 147

Anexo 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – pacientes ou responsáveis

(pacientes com mucopolissacaridose tipo I, II e IV A)

Título do Projeto: Investigação dos biomarcadores de inflamação e estresse oxidativo em pacientes portadores de mucopolissacaridoses: efeito *in vivo* da terapia de reposição enzimática e *in vitro* de antioxidantes.

Você ou o paciente pelo qual você é responsável está sendo convidado a participar de uma pesquisa cujo objetivo é verificar os efeitos da ação dos radicais livres (por exemplo radiação solar) e de substâncias antioxidantes (por exemplo, vitaminas) em pacientes com mucopolissacaridose tipo I, II e IVA. Também será avaliado o efeito do tratamento utilizado rotineiramente nesta doença sobre a ação destas substâncias antioxidantes e dos radicais livres. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Se você aceitar participar da pesquisa, os procedimentos envolvidos em sua participação são os seguintes:

- Coleta de alíquota adicional de sangue quando da realização do exame de rotina;
- Coleta de urina ocasional;
- Coleta de biópsia de pele (fibroblastos);
- Autorizar consulta de prontuário de dados (sociodemográficos, clínicos e resultados de exames).

Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação na pesquisa são os mesmos da coleta de sangue para os exames assistenciais, ou seja, será coletado um pouco de sangue a mais durante a realização do exame que você já iria fazer. No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor em decorrência da punção da pele. Complicações de coleta de sangue são raras e geralmente simples. Se houver vazamento de sangue da veia no local da punção poderá se formar uma mancha roxa (hematoma) e um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias. Para a coleta de fibroblastos, você receberá uma anestesia tópica (cremes anestésicos) e o procedimento se dará através da retirada de um pequeníssimo fragmento (3 mm, equivalente ao tamanho de uma cabeça de fósforo) de pele através de uma biópsia. As coletas de sangue e fibroblastos serão realizadas por profissionais especialmente treinados para este fim, o que diminui as chances de complicações. As coletas de urina serão feitas pelo próprio paciente ou com o auxílio de profissionais treinados.

Os possíveis benefícios decorrentes da participação na pesquisa são o melhor entendimento sobre essa patologia, a verificação se o tratamento preconizado está surtindo o efeito esperado e com isso poder investigar melhores formas de tratar a doença, melhorando a qualidade de vida do paciente.

A participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não autorizar a participação, ou ainda, retirar a autorização após a assinatura desse

Rubrica do responsável _____
CEP Hospital de Clínicas de Porto Alegre (MR 05/11/2015)

Rubrica do pesquisador _____

Página 141 de 2

termo, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que o participante da pesquisa recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação na pesquisa e não haverá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, os nomes não aparecerão na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Profa. Dra. Carmen Regla Vargas, pelo telefone 3359.8011, com a pesquisadora Camila Aguilar Delgado, pelo mesmo telefone ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, no 2º andar do HCPA, sala 2229, de segunda à sexta, das 8h às 17h, ou por e-mail cep@hcpa.edu.br.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e seu responsável e outra para os pesquisadores.

Nome do participante da pesquisa:

Assinatura *(se aplicável)*

Nome do responsável

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

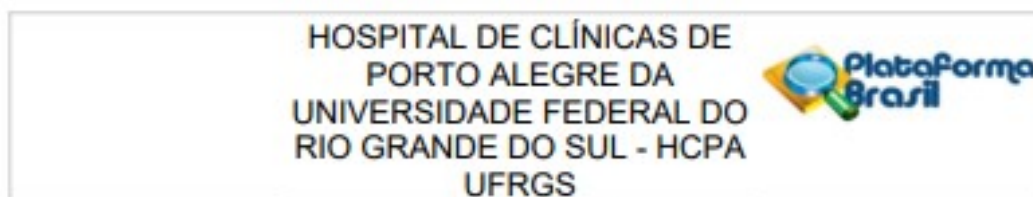
Local e Data: _____

Rubrica do responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

Página 2 de 2

Anexo 3 Carta de aprovação CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação dos biomarcadores de inflamação e estresse oxidativo em pacientes portadores de mucopolissacaridoses: efeito in vivo da terapia de reposição enzimática e in vitro de antioxidantes.

Pesquisador: CARMEN REGLA VARGAS

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 32957119.2.0000.5327

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.281.685

Apresentação do Projeto:

As mucopolissacaridoses tipo I, II e IVA (MPS I, MPS II, MPS IVA) são doenças lisossômicas de depósito caracterizadas pelo acúmulo intralisossomal de glicosaminoglicanos. Embora se tenha indícios de que o estresse oxidativo e o mecanismo de inflamação estejam envolvidos na fisiopatologia dessas doenças, existem poucos estudos que comprovam esse envolvimento em pacientes, bem como que investigam como funcionam esses mecanismos deletérios. Além disso, pouco se sabe sobre o efeito do tratamento com terapia de reposição enzimática (TRE) sob o estresse oxidativo e inflamação. O objetivo deste trabalho é, portanto, analisar e relacionar diferentes marcadores de dano oxidativo, inflamatórios e de disfunções mitocondriais em pacientes com MPS I, MPS II e MPS IVA antes e durante o TRE. Serão analisados parâmetros de dano ao DNA, de genotoxicidade, do metabolismo da glutatona, da produção de citocinas, da expressão de fatores de transcrição e enzimas diretamente relacionadas com inflamação e estresse oxidativo, assim como será medida a atividade dos complexos da cadeia respiratória. Além disso, serão investigados os efeitos in vitro dos antioxidantes N-acetil-L-cisteína, resveratrol e Cenzima Q10 sobre o dano oxidativo a produção de citocinas.

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3350-7640 **Fax:** (51)3350-7640 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO SUL - HCPA
UFRGS



Continuação do Parecer: 4.281.685

Objetivo da Pesquisa:

Riscos:

Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação na pesquisa são semelhantes aos envolvidos na coleta de sangue, urina e fibroblastos para exames laboratoriais de rotina.

Benefícios:

Os possíveis benefícios decorrentes da participação na pesquisa são o melhor entendimento sobre essa patologia, a verificação se o tratamento preconizado está surtindo o efeito esperado e com isso poder investigar melhores formas de tratar a doença, melhorando a qualidade de vida dos pacientes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação na pesquisa são semelhantes aos envolvidos na coleta de sangue, urina e fibroblastos para exames laboratoriais de rotina.

Benefícios:

Os possíveis benefícios decorrentes da participação na pesquisa são o melhor entendimento sobre essa patologia, a verificação se o tratamento preconizado está surtindo o efeito esperado e com isso poder investigar melhores formas de tratar a doença, melhorando a qualidade de vida dos pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Serão incluídos no estudo pacientes portadores de Mucopolissacaridose tipo I, II e IVA, com idade entre 5 e 45 anos. O tamanho da amostra será de 70 indivíduos, sendo divididos em 6 grupos de 10 indivíduos por tipo de MPS (tratados e não tratados) além do grupo controle. Como desfechos, será verificada a correlação entre os processos de inflamação e estresse oxidativo e se o tratamento com antioxidantes pode potencializar o tratamento já preconizado para pacientes portadores da mucopolissacaridose tipo I, II e IVA, a terapia de reposição enzimática.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta TCLE para pacientes e para controles.

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília CEP: 91.035-903
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 Fax: (51)3359-7640 E-mail: csp@hcpa.edu.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO SUL - HCPA
UFRGS



Continuação do Parecer: 4.281.685

Recomendações:

Lembramos que em razão da recente pandemia de COVID-19 as atividades de recrutamento, triagem e novas inclusões de participantes na instituição, estão temporariamente suspensas. Em caso de dúvidas, consultar o Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) para mais informações (gppgcontingencia@hcpa.edu.br).

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências emitidas para o projeto no parecer 4.247.924 foram respondidas pelos pesquisadores, conforme carta de respostas adicionada em 05/09/2020. Não apresenta novas pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Lembramos que a presente aprovação (projeto versão de 05/09/2020, TCLE versão de 05/09/2020 e demais documentos que atendem às solicitações do CEP) refere-se apenas aos aspectos éticos e metodológicos do projeto.

Os pesquisadores devem atentar ao cumprimento dos seguintes itens:

- a) Este projeto está aprovado para inclusão de 70 participantes no Centro HCPA, de acordo com as informações do projeto ou do Plano de Recrutamento apresentado. Qualquer alteração deste número deverá ser comunicada ao CEP e ao Serviço de Gestão em Pesquisa para autorizações e atualizações cabíveis.
- b) O projeto está cadastrado no sistema AGHUse Pesquisa (2020-0271) para fins de avaliação logística e financeira e somente poderá ser iniciado após aprovação final do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação.
- c) Qualquer alteração nestes documentos deverá ser encaminhada para avaliação do CEP. Informamos que obrigatoriamente a versão do TCLE a ser utilizada deverá corresponder na íntegra à versão vigente aprovada.
- d) Deverão ser adicionados relatórios semestrais e um relatório final do projeto no cadastro do mesmo, no Sistema AGHUse Pesquisa.
- e) Eventos adversos deverão ser comunicados de acordo com as orientações da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep (Carta Circular nº 13/2020-CONEP/SECNS/MS). Os desvios de protocolo também deverão ser comunicados em relatórios consolidados, por meio de Notificação.

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília CEP: 91.035-903
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3350-7640 Fax: (51)3350-7640 E-mail: cep@hcpa.edu.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO SUL - HCPA
UFRGS



Continuação do Parecer: 4.231.655

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1373739.pdf	05/09/2020 13:43:40		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetodocfinal.docx	05/09/2020 13:43:00	Camila Aguiar Delgado	Aceito
Outros	CartaCEP2.doc	05/09/2020 13:42:42	Camila Aguiar Delgado	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEpacientes.docx	05/09/2020 13:42:30	Camila Aguiar Delgado	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEindivíduos.docx	05/09/2020 13:42:12	Camila Aguiar Delgado	Aceito
Outros	CartaCEP1.doc	28/08/2020 09:13:31	Camila Aguiar Delgado	Aceito
Orçamento	orcamentocamila.xls	02/06/2020 19:18:50	Camila Aguiar Delgado	Aceito
Outros	CartaCEP.doc	02/06/2020 19:17:13	Camila Aguiar Delgado	Aceito
Outros	usodados2.pdf	02/06/2020 19:08:43	Camila Aguiar Delgado	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	usodados.pdf	02/06/2020 18:59:36	Camila Aguiar Delgado	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	materialbiologico.pdf	02/06/2020 18:49:33	Camila Aguiar Delgado	Aceito
Outros	delegacaofuncao.pdf	02/06/2020 18:47:32	Camila Aguiar Delgado	Aceito
Folha de Rosto	folharosto.pdf	27/12/2019 21:44:44	Camila Aguiar Delgado	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
 Bairro: Santa Cecília CEP: 91.035-903
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE
 Telefone: (51)3359-7640 Fax: (51)3359-7640 E-mail: cep@hcpa.edu.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO SUL - HCPA
UFRGS



Continuação do Protocolo: 4.281.665

PORTO ALEGRE, 16 de Setembro de 2020

Assinado por:
Tênis Maria Félix
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cap@hcpa.edu.br