

Patrícia Santos Braghioli

Terapia de reposição da enzima alfa-L-iduronidase recombinante em pacientes portadores de mucopolissacaridose do tipo I: análise de glicosaminoglicanos urinários e correlações clínicas

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde

São Paulo
2009

Braghioli, Patrícia Santos

Terapia de reposição da enzima alfa-L-iduronidase recombinante em pacientes portadores de mucopolissacaridose do tipo I: análise de glicosaminoglicanos urinários e correlações clínicas.

Patrícia Santos Braghioli – São Paulo, 2009. 52 p.

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular.

Título em Inglês: Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis type I: biochemical changes and clinical correlations.

1. Mucopolissacaridose tipo I.
2. Glicosaminoglicanos
3. Alfa-L-iduronidase
4. Terapia de Reposição enzimática

Tese desenvolvida no Departamento de Bioquímica durante o curso de Pós-Graduação em Biologia Molecular e apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Leny Toma

Aos meus pais, Bernarda e Edson, às minhas irmãs, Karen e Cintia ("as gêmeas"), aos meus tios Laerte e Luci, José Melchor e Maria de Lourdes, e Orlando, à minha prima Lívia e minha avó Elena: o meu muito obrigada pelo apoio e compreensão. E ao amor da minha vida, Fábio, por estar sempre ao meu lado.

Agradecimentos

À professora Doutora Leny Toma pela oportunidade e confiança em mim depositados. Foi um longo caminho, porém realizado com sucesso.

À professora Doutora Helena Bonciani Nader e ao professor Doutor Carl Peter von Dietrich pela proficiência técnica e competência, além de mostrarem o verdadeiro caminho da ciência brasileira.

Às professoras Doutoras Yara Michelacci, Marimélia Porcionatto e Maria Aparecida Pinhal por estarem sempre prontas para ajudar.

À Doutora Ana Maria Martins e à Sandra Kyosen pela concretização do meu Mestrado.

À grande mulher Elsa Yoko Kobayashi que mostra todos os dias de sua vida o que é dedicação e determinação.

Aos professores da Faculdade de Medicina do ABC Fernando Luiz Affonso Fonseca, Aleksandra Vanessa Lambiasi Sant'Ana e Jorge Luiz Freire Pinto pelo apoio à realização da tese e pela amizade.

Às queridas Romine Bachmann Pigozzo, Thais Peretti, Carolina Córdula, Carolina Batista Ariza, Thaís Filippo, Emília Brenha, Gabriela Rodrigues e Carolina Vicente, onde demos muitas risadas para descontrair, além da companhia na hora do almoço.

Às amigas especiais Eloah Rabello Suarez, Ana Paula Bérghamo Araújo e Ritchelli Ricci, que continuam sempre comigo.

À "TAG": Cinthia Pinhal, Cláudio Luís Capelli, Beatriz Rubio Uttembergue, Marcel Uttembergue, Lucca Rubio Uttembergue, Henrique Eloi, Verônica Capócio, Carla Daniely Lopes Pombal Bianchini, Rodrigo Bianchini, Fabiana Grigorini, Fábio Grigorini, Vanessa Gargantini, Roberto Eloi, Mariana Eloi, Renata Valim, Luís Cláudio Scarpellini dos Santos, Juliana de Freitas Manzato, Bianca Salles, Renato Garcia Martins, Anderson de Oliveira Reis, Íris de Souza Reis, Gustavo Teixeira, Daniel Costa, Cecília Navas, Érica Martins Ferreira, Michel Cotrim, Murilo Ricci, Brian Pfaehler, Sarah Kipfer, Renata Tognetti, Saulo Garcia, por proporcionarem os melhores momentos da minha vida, cheios de alegria e amizade.

À Cláudia Dal Sasso, Sophia Meneghelli, Fabiano Meneghelli, Cleomines Araújo, Ana Elisa Prado Coradi, Débora Alves Reis, Daniela Nascimbem, Sueli Martins, Cristiane Couto, Rodolfo Pereira, Jaqueline Pereira dos Santos Barboza, Douglas Henrique Pereira dos Santos, Fernanda Crespilho, Tatiane Garrucho, Gabriela Versolato, Maria Amélia Carvalho, Regiane França e Mariana Sousa, que estão sempre em meu coração.

Enfim, a todos os amigos, colegas e funcionários da Disciplina de Biologia Molecular e Departamento de Bioquímica, pela convivência e aprendizado.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
ÍNDICE DE TABELAS.....	iv
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	v
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
INTRODUÇÃO	1
1.Glicosaminoglicanos.....	1
1.1.Ácido hialurônico.....	4
1.2. Condroitim sulfato.....	4
1.3. Dermatam sulfato.....	5
1.4. Heparan sulfato.....	6
1.5. Heparina.....	8
1.6. Queratam sulfato.....	8
2. Proteoglicanos	9
3.Degradação de proteoglicanos e glicosaminoglicanos	12
4. Mucopolissacaridoses.....	14
4.1. Mucopolissacaridose do tipo I.....	18
5. Terapia de Reposição Enzimática.....	20
5.1. Terapia de reposição enzimática em MPS tipo I.....	22
6.Outras terapias.....	23
OBJETIVOS	25
MATERIAIS	26
1. Urinas humanas.....	26
2. Considerações éticas.....	26
3. Dados clínicos dos pacientes	26
4. Infusões enzimáticas.....	27
5. Glicosaminoglicanos padrões.....	27
6. Dissacarídeos padrões.....	28
7. Enzimas.....	28
8. Outros materiais.....	28
9. Equipamentos.....	29
MÉTODOS	30
1. Extração de GAGs de urina.....	30
1.1. Cromatografia de gel filtração em Sephadex G-25/PD 10.....	30
1.2. Cromatografia de troca iônica em resina Q-Sepharose.....	30

2. Identificação de GAGs por eletroforese em gel de agarose.....	30
3. Caracterização enzimática de GAGs urinários.....	31
3.1. Degradação enzimática.....	31
3.2. Cromatografia analítica descendente em papel.....	31
4. Dosagem de creatinina urinária.....	32
RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
ANEXOS	52

ÍNDICE DE FIGURAS

<u>FIGURA 1:</u> Unidades estruturais dos glicosaminoglicanos.....	2
<u>FIGURA 2:</u> Região de ligação dos proteoglicanos.....	10
<u>FIGURA 3:</u> Especificidade das enzimas condroitinases AC e ABC.....	12
<u>FIGURA 4:</u> Esquema de formação e maturação de lisossomos na síntese de proteoglicanos.....	14
<u>FIGURA 5:</u> Sequência esquemática da degradação enzimática de proteoglicanos em eucariotos.....	15
<u>FIGURA 6:</u> Eletroforese em gel de agarose de pacientes com diferentes mucopolissacaridoses.....	17
<u>FIGURA 7:</u> Excreção urinária de GAGs do paciente M.M.H.S. durante terapia de reposição de alfa-L-iduronidase.....	34
<u>FIGURA 8:</u> Comparação de hepatomegalia e esplenomegalia antes e depois da terapia de reposição enzimática dos pacientes.....	35
<u>FIGURA 9:</u> Excreção urinária de GAGs do paciente G.C.A. durante terapia de reposição de alfa-L-iduronidase.....	36
<u>FIGURA 10:</u> Excreção urinária de GAGs do paciente A.G.M. durante terapia de reposição de alfa-L-iduronidase.....	37
<u>FIGURA 11:</u> Eletroforese em gel de agarose de GAGs urinários dos oito primeiros meses de infusão da paciente A.G.M., durante terapia de reposição enzimática.....	38
<u>FIGURA 12:</u> Cromatografia em papel dos produtos da condroitinase ABC sobre GAGs urinários da paciente 3, A.G.M. durante a terapia de reposição enzimática.....	38
<u>FIGURA 13:</u> Porcentagem de dissacarídeos 4 e 6-sulfatados presentes nas diversas amostras da paciente A.G.M. durante a terapia de reposição enzimática.....	39

ÍNDICE DE TABELAS

<u>TABELA 1:</u>	Características estruturais dos glicosaminoglicanos.....	3
<u>TABELA 2:</u>	Principais proteoglicanos e suas características.....	11
<u>TABELA 3:</u>	Mucopolissacaridoses, enzimas envolvidas e glicosaminoglicanos acumulados.....	16
<u>Tabela 4:</u>	Níveis basais de glicosaminoglicanos urinários e atividade de alfa-L-iduronidase de sangue dos pacientes.....	33

ABREVIATURAS

AH:	ácido hialurônico
AU:	ácido urônico
β:	beta
°C:	graus Celsius
cDNA:	DNA complementar
CTAB:	brometo de cetil trimetilamônio
C4S:	condroitim 4-sulfato
C6S:	condroitim 6-sulfato
cm:	centímetro
Da:	dáltons
DS:	dermatam sulfato
GAGs:	glicosaminoglicanos
Gal:	galactose
GalNAc:	<i>N</i> -acetilgalactosamina
GalNAc,6S:	<i>N</i> -acetilgalactosamina 6-sulfato
GlcNAc:	<i>N</i> -acetilglucosamina
GlcNS:	glucosamina <i>N</i> -sulfato
GlcNS,6S:	glucosamina <i>N</i> - e 6-sulfatos
GlcA:	ácido glucurônico
Hep:	heparina
Hex:	hexosamina
HL:	síndrome de Hurler
HT:	síndrome de Hunter
HPLC:	cromatografia líquida de alta pressão
HS:	heparam sulfato
IdoA:	ácido L-idurônico
kDa:	quilo Daltons
KS:	queratam sulfato
L:	litro
M:	molar
Man:	manose
ml:	mililitro
ML:	síndrome de Maroteaux-Lamy
MPS:	mucopolissacaridoses
MQ:	síndrome de Mórquio
NL:	indivíduo normal

OR:	origem de migração eletroforética ou cromatográfica
PDA:	tampão 1,3-diaminopropano acetato
PG:	proteoglicano
SC:	Síndrome de Scheie
U.V.:	ultra-violeta
U:	unidades enzimáticas
v/v:	volume/volume
vol:	volume
Xil:	xilose
µg:	micrograma
Δ:	presença de insaturação
ΔU-GalNAc,4S:	O-ácido-D-glucó (enopiranosilurônico)-(1-3)-2-desoxi-2-acetamido-D-galactopiranos-4-O-sulfato (dissacarídeo insaturado 4-sulfatado)
ΔU-GalNAc,6S:	O-ácido-D-glucó (enopiranosilurônico)-(1-3)-2-desoxi-2-acetamido-D-galactopiranos-4-O-sulfato (dissacarídeo insaturado 6-sulfatado)
ΔU-GalNAc:	O-ácido-D-glucó (enopiranosilurônico)-(1-3)-2-desoxi-2-acetamido-D-galactopiranos (dissacarídeo insaturado não sulfatado)

RESUMO

Mucopolissacaridose do tipo I (MPS I) é uma doença de acúmulo, devido a uma deficiência de alfa-L-iduronidase lisossomal, que hidrolisa os resíduos de ácido idurônico do terminal não redutor dos glicosaminoglicanos (GAGs), dermatam sulfato e heparam sulfato.

O comprometimento na degradação dos GAGs leva ao acúmulo desses compostos nos lisossomos dos tecidos, com consequente aumento de excreção na urina e um amplo espectro de sintomas clínicos severos. O objetivo deste trabalho é avaliar os efeitos da Terapia de Reposição Enzimática (ERT) periódica, com alfa-L-iduronidase recombinante em pacientes com MPS I. Três pacientes foram tratados semanalmente com Laronidase (Aldurazyme®) intravenosa na dose de 0.58 mg/Kg. A evolução clínica e análise de GAGs urinários foram realizados antes e depois das infusões. Dois pacientes clinicamente portadores de síndrome de Hurler e um paciente Hurler-Scheie foram investigados. Após 19 a 22 meses de infusão, os efeitos observados neste estudo estão de acordo com estudos previamente obtidos, mostrando eficácia da Terapia em reduzir a hepatoesplenomegalia, e melhoras clínicas, sem alterar o comprometimento mental dos pacientes com síndrome de Hurler.

Notáveis foram os resultados onde uma diminuição de dermatam sulfato foi detectado para todos os pacientes, sendo que os valores não mais retornaram aos valores basais. Uma exceção foi apresentada pela paciente Hurler-Scheie, que apresentou um aumento agudo após 11 meses de infusão após interrupção do tratamento, seguido de diminuição importante após retorno ao tratamento.

Significante foi também o caso desta mesma paciente, que apresentou em algumas amostras uma acentuada diminuição de dermatam sulfato, com concomitante aumento de condroitim sulfato. Embora condroitim sulfato não esteja presente na urina de pacientes portadores de MPS I, é o composto predominante em indivíduos normais.

A Terapia de Reposição Enzimática pode não representar a cura definitiva para estas doenças, porque os efeitos ainda não alcançam todos os tecidos e órgãos afetados. Contudo, ela representa hoje uma opção alternativa e segura, enquanto a terapia gênica não se encontra disponível aos seres humanos.

ABSTRACT

Mucopolysaccharidosis type I (MPS I) is a lysosomal storage disease caused by deficiency of α -L-iduronidase, which cleaves terminal iduronic acid residues of glycosaminoglycans (GAGs), heparan sulphate (HS) and dermatan sulphate (DS).

Impairment of degradation leads to its accumulation and increased urinary excretion, with a wide spectrum of clinical severity. The aim of this work was to evaluate the effects of periodic enzyme replacement therapy (ERT) with recombinant α -L-iduronidase in MPS I patients. Three patients were weekly treated with Laronidase (Aldurazyme®), 0,58 mg/kg intravenously. Clinical evaluation and analysis of urinary GAGs were done before and after ERT. Two clinically severe Hurler and one mild Hurler-Scheie patients were enrolled in this study. After 19 to 22 months of treatment, the effects observed herein are in accordance with previous data, showing efficacy of ERT on reducing hepatosplenomegaly and clinical improvements, without changing mental impairment of the Hurler patients.

Remarkably were the findings of decreasing DS excretion for all patients, the value not returning to the initial baseline. One exception was for the Hurler-Scheie patient who presented a peak of higher values after 11 months of infusion after interruption of treatment, followed by important decrease after return to ERT. Noteworthy was the case of this same patient, whose DS decreased, whereas a progressive increase of CS was observed. Although CS is not present in MPS I urine, it is the predominant GAG in normal individuals.

ERT may not be a cure for these diseases and improvement cannot reach all the tissues and affected organs, but represents a safe alternative choice of treatment while gene therapy is not available for humans.

INTRODUÇÃO

1. Glicosaminoglicanos

Os glicosaminoglicanos (GAGs) (Jeanloz, 1960), anteriormente denominados mucopolissacarídeos (Meyer, 1938) são polímeros lineares de heteropolissacarídeos constituídos por seqüências dissacarídicas repetitivas de uma hexosamina e um açúcar não nitrogenado, as quais são ligadas através de ligações glicosídicas. Cada um dos GAGs é constituído por um tipo de hexosamina (galactosamina ou glucosamina) e por um tipo de açúcar não nitrogenado, o ácido urônico (ácido beta-D-glucurônico ou ácido alfa-L-idurônico) ou um açúcar neutro, a galactose (Meyer, 1969). Estas moléculas podem ser sulfatadas em pontos específicos da molécula: no carbono 4 e/ou 6 da hexosamina e no carbono 2 do ácido urônico. Juntamente com os grupamentos carboxílicos dos ácidos urônicos, a sulfatação confere à molécula de GAG uma alta densidade de cargas negativas, com exceção do ácido hialurônico. Esta característica aniônica dos GAGs torna-os altamente hidrofílicos (Brimacombe & Webber, 1964; Hatae, Atsuta & Makita, 1997). Desta maneira, os GAGs diferem em suas estruturas quanto ao tipo de hexosamina e açúcar não nitrogenado, grau e posição da sulfatação na molécula e tipo de ligação intra e interglicosídica (Figura 1).

Os principais glicosaminoglicanos encontrados nos diversos tecidos animais são: Condroitim 4 e 6-Sulfato (CS4S e 6S), Dermatan Sulfato (DS), Heparan Sulfato (HS), Heparina (Hep), Queratan Sulfato (KS) e Ácido Hialurônico (HA) (Tabela 1). Seus pesos moleculares podem variar de 5 a 100kDa, com comprimentos variando entre 10 a 20 nm. Entretanto, o ácido hialurônico pode chegar a atingir pesos bem maiores, até a ordem de 10^4 kDa (Mathews, 1975).

Os glicosaminoglicanos não são encontrados em bactérias, fungos ou protozoários, mas sim, encontrados em todos os filos do Reino Animal com organização tissular, desde cnidários à mamíferos, vertebrados e invertebrados representando componentes celulares com funções fisiológicas muito importantes e tendo parte em diversas patologias, dentre elas a oncogênese. Existem diversos estudos a respeito da evolução do aparecimento de GAGs na escala filogenética, não havendo qualquer relação evolutiva entre os filos (Cássaro & Dietrich, 1977; Toledo & Dietrich, 1977; Gomes & Dietrich, 1982).

Estas macromoléculas estão presentes nos tecidos e fluidos animais (Toledo & Dietrich, 1977) e na superfície celular (Kraemer, 1971), apresentando diferenças estruturais dependendo do tecido ou organismo de origem. Normalmente, encontram-se ligados a proteínas, constituindo os proteoglicanos (PG). Os GAGs são fisiologicamente importantes, pois são compostos envolvidos em muitos processos. Muitas moléculas sinalizadoras, fatores de crescimento, quimiocinas e

citocinas, ligam-se aos GAGs presentes na superfície celular, agindo como co-receptores destas moléculas (Mulloy, 2006).

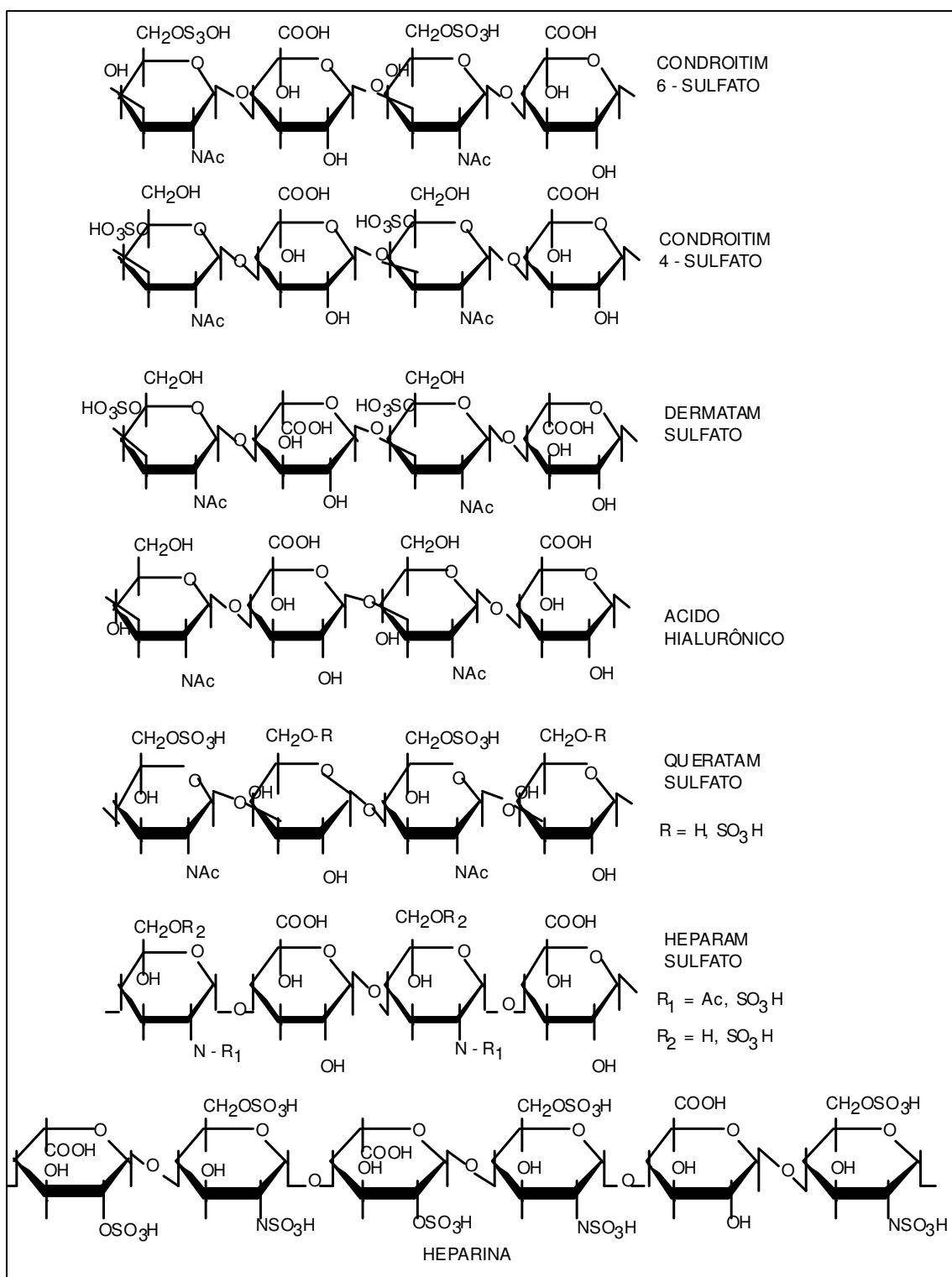


Figura 1: Unidades estruturais dos glicosaminoglicanos (Figura modificada de Prydz & Dalen, 2000).

Tabela 1: Características estruturais dos glicosaminoglicanos (Figura modificada de Prydz & Dalen, 2000).

Nomenclatura (Meyer, 1938)	Nomenclatura (Jeanloz, 1960)	Açúcares*	Posição do Sulfato	Ligação Glicosídica
Condroitim	Condroitim	N-acetilgalactosamina Ácido glucurônico	-	$\beta(1\rightarrow4)$ $\beta(1\rightarrow3)$
Condroitim sulfato A	Condroitim 4- sulfato	N-acetilgalactosamina Ácido glucurônico	4 -	$\beta(1\rightarrow4)$ $\beta(1\rightarrow3)$
Condroitim sulfato C	Condroitim 6- sulfato	N-acetilgalactosamina Ácido glucurônico	6 -	$\beta(1\rightarrow4)$ $\beta(1\rightarrow3)$
Condroitim sulfato B	Dermatam sulfato	N-acetilgalactosamina Ácido idurônico Ácido glucurônico	4 - -	$\beta(1\rightarrow4)$ $\alpha(1\rightarrow3)$ $\beta(1\rightarrow3)$
Ácido Hialurônico	Ácido Hialurônico	N-acetilglucosamina Ácido glucurônico	- -	$\beta(1\rightarrow4)$ $\beta(1\rightarrow3)$
Querato sulfato	Queratam sulfato	N-acetilglucosamina Galactose	6 -/6	$\beta(1\rightarrow3)$ $\beta(1\rightarrow4)$
Heparitim sulfato	Heparim sulfato	Glucosamina N-acetilglucosamina Ácido glucurônico Ácido idurônico	2/6 -/6 - -/2	$\alpha(1\rightarrow4)$ $\alpha(1\rightarrow4)$ $\beta(1\rightarrow4)$ $\alpha(1\rightarrow4)$
Heparina	Heparina	Glucosamina Ácido glucurônico Ácido idurônico	2/6 - 2	$\alpha(1\rightarrow4)$ $\beta(1\rightarrow4)$ $\alpha(1\rightarrow4)$

Os proteoglicanos participam da angiogênese e neurogênese (Bix & Iozzo, 2008; Yoo *et al.*, 2009); além disso, estão envolvidos na adesão célula-célula e célula-matriz, metabolismo de lipoproteínas e modulação da atividade proteolítica de algumas enzimas (Lopes *et al.*, 2006; Mythreye & Blobel, 2009; Ji *et al.*, 1997; Sorensen *et al.*, 2008).

As diversas funções atribuídas aos glicosaminoglicanos foram sugeridas com base na sua presença em determinados tecidos, relacionando as funções dos tecidos com as propriedades físico-químicas desses compostos, tais como: controle de água e eletrólitos; regulação da atividade nuclear; transporte de cálcio, quelantes de cálcio; lubrificação; cicatrização; controle de divisão celular; resistência à infecção; adesão, sinalização e reconhecimento celular (Esko & Selleck, 2002; Hardingham & Fosang, 1992). Muitas das propriedades funcionais dos glicosaminoglicanos dependem da interação entre o polissacarídeo e proteínas. Esta interação é geralmente de natureza eletrostática, podendo ocorrer outros tipos de ligações.

1.1. Ácido Hialurônico (AH)

O ácido hialurônico ou hialuronam é um polímero linear longo, podendo atingir pesos moleculares de até 4.000 kDa. Apresenta em sua estrutura unidades dissacarídicas representadas pelo ácido D-glucurônico e a N-acetil-D-glucosamina. Estes dissacarídeos podem ser unidos por ligações intradissacarídicas do tipo β -1,3 e ligações interdissacarídicas β -1,4 (Brimacombe & Webber, 1964). Tridimensionalmente, sua estrutura, em meio aquoso, é semelhante à uma longa hélice estirada, sendo estabilizada por pontes de hidrogênio (Laurent & Fraser, 1986; Kjéllén & Lindahl, 1991).

As moléculas de AH estão em constante movimento em meio fisiológico, formando poros de tamanhos variáveis. Estes poros permitem a difusão de diferentes moléculas pela malha de AH, onde moléculas maiores se difundem mais lentamente do que moléculas menores.

1.2. Condroitim Sulfato

O condroitim sulfato (CS) é um glicosaminoglicano formado de unidades dissacarídicas contendo N-acetilgalactosamina e ácido D-glucurônico; seus monossacarídeos estão unidos por ligação intradissacarídica do tipo β -1,3 e interdissacarídicas do tipo β -1,4 (Brimacombe & Webber, 1964). Existem dois tipos predominantes de condroitim sulfato, os quais se diferenciam entre si nas posições

do sulfato da hexosamina, sendo C-4 ou C-6, denominando-se condroitim 4-sulfato e condroitim 6-sulfato (C4S e C6S, antigamente denominados condroitim sulfato A e condroitim sulfato C, respectivamente).

Estes compostos estão presentes nos tecidos de mamíferos: pele, ossos, córnea e principalmente cartilagem. Deste modo, são os componentes principais da matriz dos tecidos conjuntivos, representando cerca de 10% do peso seco de cartilagens (Mourão & Dietrich, 1973). Juntamente com o ácido hialurônico possuem a função de reter água no tecido, favorecendo, por exemplo, o amortecimento da cartilagem contra pressões (Shatton & Schubert, 1954; Muir & Hardingham, 1975). Porém, o condroitim sulfato não forma soluções viscosas com a água, ao contrário do que acontece com o ácido hialurônico, já que a massa molecular deste composto é considerada pequena (Beaty, 1987).

A conformação espacial da molécula de condroitim sulfato mostra uma estrutura helicoidal e, dependendo de sua origem, existem variações no teor e posição da sulfatação da molécula (Michelacci & Dietrich, 1976; 1986). Estas variações moleculares fazem do condroitim sulfato específico para cada tecido.

O condroitim 6-sulfato está relacionado com a integridade dos tecidos sujeitos a forças mecânicas, sendo característico de cartilagens articulares (Michelacci *et al.*, 1979; Michelacci & Horton, 1989); também está relacionado com o mecanismo de divisão celular, impedindo o contato entre as células (Dietrich & Armelin, 1978; Dietrich & Montes de Oca, 1978; Dietrich *et al.*, 1982; Dietrich, 1984), e foi observado um aumento de condroitim 6-sulfato em diversos tecidos neoplásicos (Sampaio, Dietrich & Gianotti, 1977; Dietrich *et al.*, 1978; Dietrich *et al.*, 1980).

Já o condroitim 4-sulfato parece estar envolvido nos processos de crescimento e ossificação (Mourão & Dietrich, 1973; Mourão *et al.*, 1976; Carney & Muir, 1988), pois é mais característico de cartilagens em crescimento e está relacionado com patologias como artrose, condromas, condrossarcomas e calo ósseo (Mourão, Michelacci & Toledo, 1979; Michelacci, Laredo & Dietrich, 1981).

1.3. Dermatam Sulfato (DS)

Dermatam sulfato, anteriormente denominado de condroitim sulfato B, possui unidades dissacarídicas repetitivas constituídas predominantemente de resíduos de ácido idurônico, ligado através de ligações β -1,4 à resíduos de N-acetilgalactosamina, podendo ser sulfatado nas hidroxilas dos carbonos 4 e/ou 6, dependendo de sua origem. Assim, a galactosamina, preferencialmente sulfatada em C-4 (N-acetilgalactosamina-4-sulfato) pode, também, ser sulfatada em C-6 ou

em ambas as posições. Além disso, o ácido idurônico pode ser sulfatado na posição C-2 (Fransson & Malmstrom, 1971). Dados da literatura mostram que GAGs que contêm ácido idurônico em suas estruturas têm maior especificidade na interação com proteínas. Além deste fato, o ácido idurônico parece estar relacionado na inibição da proliferação de fibroblastos normais, ao contrário do que ocorre com GAGs com alto teor de ácido glucurônico (Westergren-Thorsson *et al.*, 1993).

Algumas cadeias de DS podem possuir predominantemente ácido glucurônico ligado de forma α -1,3 ao invés de ácido idurônico, se assemelhando ao condroitim sulfato. Semelhantemente ao HS, o DS forma *clusters* ou blocos de dissacarídeos de ácido idurônico e N-acetilgalactosamina altamente sulfatados (Kjéllen & Lindahl, 1991; Prydz & Dalen, 2000). Também foram descritas estruturas híbridas para dermatam sulfato purificados de vários tecidos de mamíferos, ficando claro que o número e a distribuição das diferentes unidades dissacarídicas ao longo da molécula varia de um DS ao outro (Población & Michelacci, 1986). Assim sendo, o tamanho total e variável da cadeia de DS, localização dos *clusters* de ácido idurônico, padrão de sulfatação e opções de interação com proteínas fazem a molécula de DS ser altamente complexa (Trowbridge & Gallo, 2002).

O dermatam sulfato está presente na matriz extracelular de tecidos conjuntivos, principalmente na pele, além de tendão, esclera, músculo esquelético, veias, ossos e cartilagens. Desempenha um importante papel na manutenção da integridade estrutural do tecido juntamente com o colágeno, elastina e outras glicoproteínas (Toledo & Dietrich, 1977; Lindahl & Hook, 1978; Fransson *et al.*, 1982; Población & Michelacci, 1986).

O DS é uma molécula importante e está implicado em várias atividades fisiológicas e patológicas, tais como: estabilização, co-fator e co-receptor de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas; regulação de atividade enzimática; sinalização celular na cicatrização, infecção e tumorigênese; alvo para fatores de virulência de microorganismos (Trowbridge & Gallo, 2002). O DS também apresenta algumas atividades farmacológicas: através de sua interação com o cofator II da heparina (HCII) torna-se um anticoagulante e possui atividade antilipásica, a qual aparentemente está relacionada com o grau de sulfatação (Linhardt & Hileman, 1995).

1.4. Heparan Sulfato (HS)

O HS é o glicosaminoglicano mais estudado. Sua molécula é constituída de unidades dissacarídicas repetitivas contendo ácido urônico alternando com resíduos de glicosamina, ligadas através de ligações α -1,4. O resíduo de ácido

urônico pode ser D-glucurônico ou L-idurônico, com ligações β -1,4 ou α -1,4, respectivamente, sendo O-sulfatados na hidroxila do carbono 2 ou dessulfatados. O grupo amino do resíduo de glucosamina pode ser N-sulfatado ou N-acetilado, podendo também ser sulfatado na hidroxila do carbono 6 e ocasionalmente no carbono 3. A proporção de ácido glucurônico e idurônico varia consideravelmente, não apenas entre espécies de HS, mas entre a própria cadeia de HS. O grau e tipo de sulfatação não são mantidos de forma estequiométrica (Kjéllen and Lindahl, 1991). Sua estrutura difere da heparina por possuir maior conteúdo de ácido glucurônico (GlcUA) e N-acetilglucosamina (GlcNAc) (Cifonelli & Dorfman, 1960; Taylor *et al.*, 1973; Dietrich *et al.*, 1971; Dietrich & Nader, 1974; Turnbull & Gallagher, 1990).

O HS forma blocos ou *clusters* entre dissacarídeos de ácido glucurônico e N-acetilglucosamina alternando com dissacarídeos de ácido idurônico e N-glucosamina altamente sulfatados (Lindahl *et al.*, 1998). Portanto, o heparan sulfato é constituído de cinco tipos de unidades dissacarídicas cuja proporção varia de acordo com o tecido e a espécie de origem (Silva, Dietrich & Nader, 1976; Dietrich, Nader & Straus, 1983; Nader *et al.*, 1984). Através de degradações enzimáticas com heparitinases específicas, foi demonstrado que as cinco unidades dissacarídicas estão distribuídas em regiões variáveis formadas por blocos contendo: GlcUA(1-4)GlcNAc, GlcUA(1-4)GlcNS, IdoUA(1-4)GlcNAc,6S, IdoUA(1-4)GlcNS,6S e IdoUA,2S(1-4)GlcNS,6S, e duas regiões constantes, uma contendo o tetrassacarídeo IdoUA-GlcNAc-IdoUA-GlcNS, e no terminal não redutor, a presença de GlcNS ou GlcNS,6S (Nader, *et al.*, 1987; Tersariol *et al.*, 1994; Dietrich *et al.*, 1998). Há variações no grau de sulfatação, acetilação e na proporção destas unidades dependendo do tipo celular. Esta arquitetura da distribuição dos blocos de dissacarídeos de HS é extremamente conservada, como mostram estudos de seqüenciamento de HS presente no molusco *Anomantidae sp.*, mostrando-se semelhante em mamíferos (Ferreira *et al.*, 1993; Nader *et al.*, 1988). Conseqüentemente, existe uma heterogeneidade nas cadeias de HS, bem como de DS, descrito anteriormente.

Proteoglicanos de heparan sulfato estão presentes na superfície celular de células de mamíferos em cultura (Dietrich & Montes de Oca, 1978) e em tecidos na maioria dos vertebrados e invertebrados (Cássaro & Dietrich, 1977) que apresentem organização tissular. Devido a sua grande variabilidade estrutural, o HS é característico para cada tipo celular. Sabe-se que os mais básicos fenômenos biológicos dependem de uma precisa interação química entre componentes da membrana celular com a matriz extracelular, existindo inúmeros relatos com evidências experimentais sugerindo que cadeias de HS

agem no reconhecimento celular, adesão celular e controle de proliferação (Porcionatto *et al.*, 1998).

1.5. Heparina (Hep)

A Heparina é um GAG que apresenta em sua estrutura resíduos de ácido L-idurônico (70-80%) e D-glucurônico (20-30%), sendo sulfatada no C2 do ácido L-idurônico (70-90%) e raramente sulfatada no ácido D-glucurônico. A glucosamina é sulfatada, geralmente, nas posições N- e C6 (Jorpes, 1962; Dietrich, 1968; Dietrich, 1969). As ligações interdissacarídicas são do tipo α -1,4 e as intradissacarídicas são do tipo α -1,4, para o ácido idurônico, e β -1,4 para o glucurônico.

A heparina possui funções biológicas e farmacológicas. Interage com diversas proteínas, tais como enzimas, inibidores enzimáticos e fatores de crescimento, devido ao seu caráter polianiónico.

Dentre as interações biológicas da Heparina, que dependem de seus grupamentos sulfatos (Yamada *et al.*, 1998), pode-se citar: a modulação da proliferação celular (Clowes & Karnovsky, 1977), modulação de síntese de um tipo de Heparan Sulfato com ação antitrombótica em células endoteliais (Nader *et al.*, 1989; Pinhal *et al.*, 1994; Nader *et al.*, 2004) e potencialização da angiogênese (Folkman & Shing, 1992). Em relação às atividades farmacológicas, a heparina possui: ação anticoagulante (Jaques, 1967), ação anti-hemostática (Cruz & Dietrich, 1967), antibacteriana (Rosett & Hodges, 1980) e antiviral (Vaheri, 2007). A ação anticoagulante é a mais estudada e este efeito pode ser dependente de antitrombina (AT) (Rosenberg & Damus, 1973; Ragazzi *et al.*, 1990) ou independente desta (interação se dá com o co-fator da heparina, HCII, que também interage com o Dermatan Sulfato) (Pangrazzi & Gianese, 1987; Bianchini *et al.*, 1985).

Biologicamente, a função da heparina deve ser diferente de sua função farmacológica, já que está ausente em espécies de mamíferos com mecanismo de coagulação sanguínea e está presente em espécies de moluscos que não apresentam o mecanismo de coagulação dependente de AT.

1.6. Queratam Sulfato (KS)

O Queratam sulfato é constituído por unidades dissacarídicas repetitivas de β -D-N-acetilglucosamina (GlcNAc) e β -D-galactose unidas por ligações glicosídicas

do tipo β -1,3, sendo que a galactose pode ou não estar sulfatada na posição C-6. A galactose está unida à *N*-acetilglucosamina por uma ligação do tipo β -1,4. A estrutura do KS é bastante complexa, pois possui variações de peso molecular, grau de sulfatação, presença de outros tipos de açúcares neutros, ácido siálico, e também dois tipos distintos de regiões de ligação à proteína que são diferentes das descritas para os outros glicosaminoglicanos (Figura 2). Também variam de acordo com o tecido de origem. O queratam sulfato tipo I está presente no estroma de córnea, interagindo através de um padrão regular com as bandas "a" e "c" das fibras de colágeno, conferindo transparência óptica à córnea (Scott & Haig, 1985; Blochberger *et al.*, 1992). O queratam sulfato tipo II representa cerca de 25% do total de glicosaminoglicanos em cartilagem articular adulta e não é detectado em cartilagens de recém-nascidos, sugerindo que esta distribuição distinta durante o desenvolvimento desempenha um papel funcional nos processos de crescimento (Michelacci *et al.*, 1979; 1981).

2. Proteoglicanos

Com exceção do ácido hialurônico, os GAGs são sintetizados, *in vivo*, na forma de proteoglicanos (PGs). Estas macromoléculas consistem de uma cadeia protéica ligada covalentemente a um glicosaminoglicano (Dietrich, 1984; Kjéllen & Lindahl, 1991; Lohmander *et al.*, 1980; Nilsson, De Luca & Lohmander, 1982). A ligação da cadeia de GAG ao esqueleto protéico é feita através de uma unidade tetrassacarídica de GlcUA-Gal-Gal-Xil (Ácido Glucurônico-Galactose-Galactose-Xilose) através da hidroxila do resíduo de serina da proteína. Os GAGs ligam-se, assim, através de sua extremidade redutora ao GlcUA do tetrassacarídeo, deixando a porção não redutora livre. Este tipo de ligação é específico para a maioria dos proteoglicanos de tecido conjuntivo, não sendo identificado em outros complexos de carboidrato-proteína (Bray, Leeberman & Meyer, 1967; Baker, Cifonelli & Rodén, 1975). O KS tipo I é uma exceção ao descrito acima, pois se encontra ligado à proteína através de uma ligação N-glicosídica entre a *N*-acetilglucosamina e a asparagina do *core* protéico (Baker, Cifonelli & Rodén, 1975). O tipo II, encontrado em cartilagem articular adulta e núcleo pulposo, une-se à proteína através de uma ligação do tipo O-glicosídica entre a *N*-acetilgalactosamina e a hidroxila de uma serina ou treonina (Bray, Leeberman & Meyer, 1967) (Figura 2).

Os PGs estão presentes na matriz extracelular, membrana basal, superfície celular e em grânulos secretórios intracelulares (Dietrich, 1984; Poole, 1986; Nader & Dietrich, 1989; Gallagher, 1989; Stevens, Kamada & Serafin, 1989; Nader, 1991; Esko, 1991; Bernfield *et al.*, 1992; 1999; Iozzo, 1998).

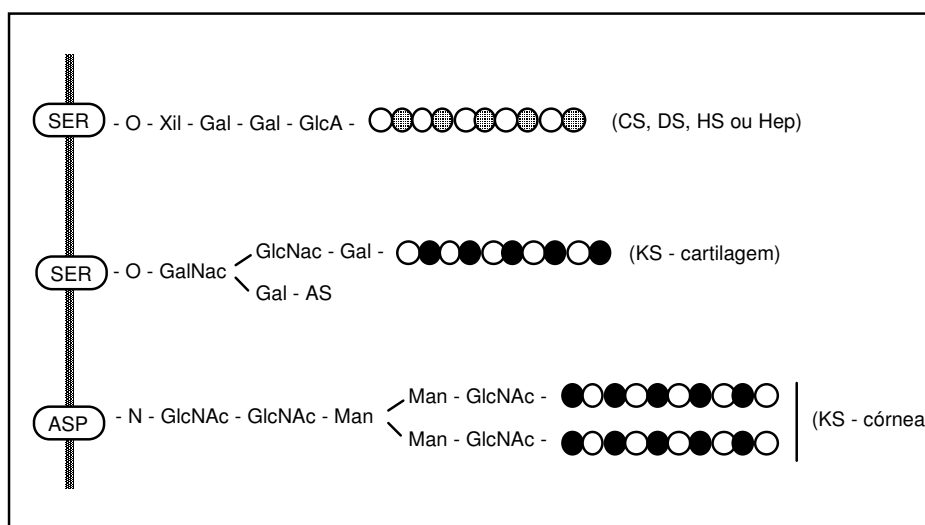


Figura 2: Região de ligação dos proteoglicanos. SER: serina; ASP: asparagina; Xil: xilose; Gal: galactose; GlcA: ácido glucurônico; GalNac: N-acetilgalactosamina; GlcNAc: N-acetilglucosamina; AS: ácido siálico; Man: manose; CS: condroitim sulfato; DS: dermatam sulfato; HS: heparam sulfato; KS: queratam sulfato;
○: hexosamina; ●: ácido urônico; ●: Galactose. (Figura modificada de Hardingham & Fosang, 1992)

Possuem variabilidade em relação ao número, comprimento e tipo de cadeia de GAG ligada ao esqueleto protéico, podendo apresentar de uma até mais de cem cadeias, desde poucas unidades dissacarídicas até centenas. Além disso, o mesmo esqueleto protéico pode conter mais de um tipo de cadeia de glicosaminoglicano, formando assim, um proteoglicano híbrido. Ainda, esqueletos protéicos diferentes podem estar substituídos com o mesmo tipo de cadeia de GAG.

As atividades biológicas de cada proteoglicano dependem das propriedades do seu esqueleto protéico, da estrutura química e tipo de cadeia do(s) GAG(s) covalentemente ligado(s) e sua localização. (Dietrich, 1984; Esko, 1991; Yanagishita & Hascall, 1992; Couchman & Woods, 1993; Iozzo, 1998; Bernfield *et al.*, 1992; 1999; Porcionatto, Nader & Dietrich, 1999).

Atualmente, são conhecidos muitos tipos diferentes de proteoglicanos (Tabela 2), os quais podem atuar como organizadores de tecidos, moduladores do crescimento celular e de seus fatores de crescimento, regulam a hidrólise de colágeno, afetam o crescimento, angiogênese e invasão tumoral, influenciam na transparência da córnea e no crescimento de neurônios, entre outras funções. O estudo de suas funções biológicas, utilizando animais transgênicos, tem indicado que certos proteoglicanos são essenciais para a vida (Iozzo, 1998; Bernfield *et al.*, 1992; 1999).

Tabela 2: Principais proteoglicanos e suas características

Nome	Massa Molecular (kDa)	Número e tipo de cadeias de GAGs	Esqueleto proteico (kDa) ^a	Localização (Tecido / Célula)	Atividade
Agregam	~1000	~100 CS, 20-30 KS	208-221 ^b	Cartilagem	Suporte mecânico, transporte de soluto
Biglicam	165-285	2 CS/DS	38 ^b	Conjuntivo	Adesão celular
Brevicam		CS	145	Sistema nervoso	
Colágeno $\alpha 2$ (IX)		0-1 CS	68 ^b	Cartilagem, humor vítreo	Ligação à banda D do colágeno tipo II
Decorim	80-140	1 CS/DS	36 ^b	Conjuntivo	adesão celular, modula a fibrinogênese
Fibromodulina		1-4 KS	41 ^b	Conjuntivo	modula a fibrilogênese
Perlecam		3-4 CS/HS	400-470	Membrana basal	estrutural
Sindecam-1		1-3 HS/CS 1-2 HS	30,5 ^b 82-88	Epitélio. Fibroblasto	morfogênese adesão celular
Sindecam-2 (Fibroglicam)		2-4 HS	20,2 ^b	Fibroblasto	adesão celular
Sindecam-3 (N-Sindecam)		HS/CS	40,8 ^b	Sistema nervoso, cartilagem em desenvolvimento	
Sindecam-4 (Riudocam, Anfiglicam)	200	3-4 HS	22 19,7 ^b	Endotélio. Epitélio, células musculares lisas, fibroblasto de pele	Adesão celular, atividade anticoagulante
Versicam		12-15 CS	265 ^b	Fibroblasto	Suporte mecânico, migração celular

CS: condroitim sulfato; **DS:** dermatam sulfato; **HS:** heparam sulfato; **GAG:** glicosaminoglicano; **SDS-PAGE:** eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS. **a:** Os pesos moleculares apresentados são os calculados por migração em SDS-PAGE do esqueleto protéico após remoção dos GAGs por enzimas específicas, com exceção dos marcados com (b). **b:** Pesos moleculares calculados com base nos dados obtidos por sequenciamento de amino ácidos ou cDNA.

3. Degradação de proteoglicanos e glicosaminoglicanos

As doenças de acúmulo lisossomal tiveram papel importante no entendimento do catabolismo normal dos proteoglicanos.

Em Procariotos, a degradação dos glicosaminoglicanos tem sido muito estudada utilizando-se *Flavobacterium heparinum*, *Proteus vulgaris* e *Arthrobacter aurescens*. As enzimas Condroitinases AC e ABC são liases bacterianas obtidas respectivamente de *Arthrobacter aurescens* e *Proteus vulgaris* e são muito usadas experimentalmente em métodos de determinação quantitativa e qualitativa da estrutura de GAGs isômeros de CS (DS e HA) (Yosizawa *et al.*, 1983). A nomenclatura dessas enzimas originou-se quando os GAGs ainda eram chamados segundo a nomenclatura de Meyer (1938). O condroitim 4-sulfato antigamente era denominado *condroitim sulfato A*, o dermatam sulfato era *condroitim sulfato B* e condroitim 6-sulfato era *condroitim sulfato C*. Desta maneira, a condroitinase AC é uma enzima que degrada o condroitim 4- e 6-sulfato, a condroitinase B degrada só dermatam sulfato (condroitim sulfato B) e a condroitinase ABC é capaz de degradar as três moléculas, respectivamente.

A condroitinase AC atua nas ligações das N-acetilhexosaminas dos dois tipos de condroitim sulfato, com pH ótimo de 7,3, produzindo dissacarídeos insaturados e sulfatados (Δ Di4S e Δ Di6S). Já a condroitinase ABC atua nas ligações das N-acetilhexosaminas do condroitim sulfato, dermatam sulfato e ácido hialurônico, com pH ótimo de 8,0, produzindo dissacarídeos insaturados correspondentes à esses três respectivos GAGs: Δ Di4S e Δ Di6S para o CS, somente Δ Di4S para o DS e Δ DiHA para o HÁ (Figura 3). Estas enzimas não degradam HS, Hep ou KS. (Hiyama & Okada, 1975).

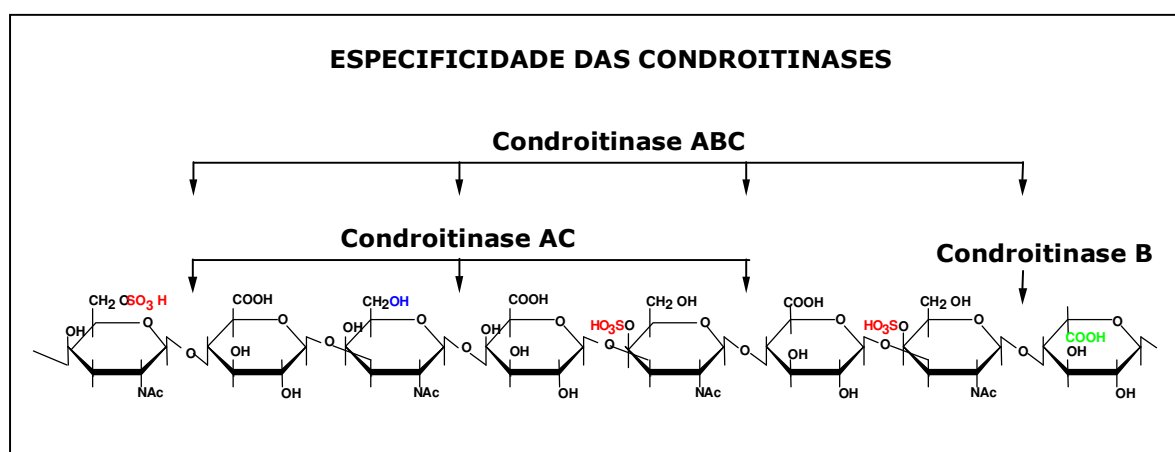


Figura 3: Especificidade das enzimas condroitinases AC e ABC

Outras enzimas bacterianas são também utilizadas em métodos de identificação estrutural de GAGs: condro-4-sulfatase, condro-6-sulfatase, hialuronidase, heparinase e heparitinases. As enzimas condro-4 e condro-6 sulfatases removem ou dessulfatam as moléculas de dissacarídeos insaturados sulfatados de condroitim 4 e 6 sulfato, respectivamente. Quando usadas como método de análise de glicosaminoglicanos, após a ação das enzimas condroitinase AC e/ou ABC, estas enzimas são úteis para a averiguação do sítio ou grau de insaturação desses GAGs. Já a hialuronidase testicular bovina é uma enzima importante envolvida na degradação das ligações de N-acetilhexosamina do ácido hialurônico e condroitim sulfato, tendo um pH ótimo de 5,0 à 37°C. Esta enzima também é utilizada em métodos de detecção de estrutura desses GAGs. Hialuronidase derivada de *Streptomyces* não atua no condroitim sulfato, sendo usada para excluir a possibilidade de ácido hialurônico da amostra analisada. As enzimas heparinase e heparitinase I e II de *Flavobacterium heparinum* estão envolvidas na degradação de heparina e heparan sulfato, em pH ótimo de 7,0, à 30°C, originando diversos tipos de dissacarídeos insaturados, típicos de cada polissacarídeo estudado, e de estrutura totalmente elucidada (Nader et al., 1988; Nader et al., 1990).

Em Eucariotos, o catabolismo fisiológico dos proteoglicanos tem início na superfície celular e matriz extracelular, a partir de sua internalização, via endocitose. Os endossomos se fundem com o lisossomo primário, originando o lisossomo maduro, onde grande parte do catabolismo dessas moléculas ocorre (Figura 4) . Nos lisossomos, em pH ácido, o *core* protéico dos proteoglicanos é clivado por proteases específicas, as quais liberam as longas cadeias de glicosaminoglicanos. Após esta etapa, endoglicosidases (e.g. hialuronidase) agem sobre as poucas e específicas ligações desses GAGs, dando origem a oligossacarídeos menores, os quais se tornam substratos para as exoglicosidases. Estas enzimas agem sequencialmente e alternadamente a partir do terminal não redutor e liberam ácido urônico, hexosamina e sulfato inorgânico (Neufeld, 1974; Glaser & Conrad, 1979;Nader *et al.*, 1993) (Figura 5). Os dois primeiros são reciclados através da via glicolítica e do desvio hexose monofosfato, respectivamente, enquanto o sulfato é excretado. As atividades das endo e exoglicosidases possuem alta especificidade pelo substrato.

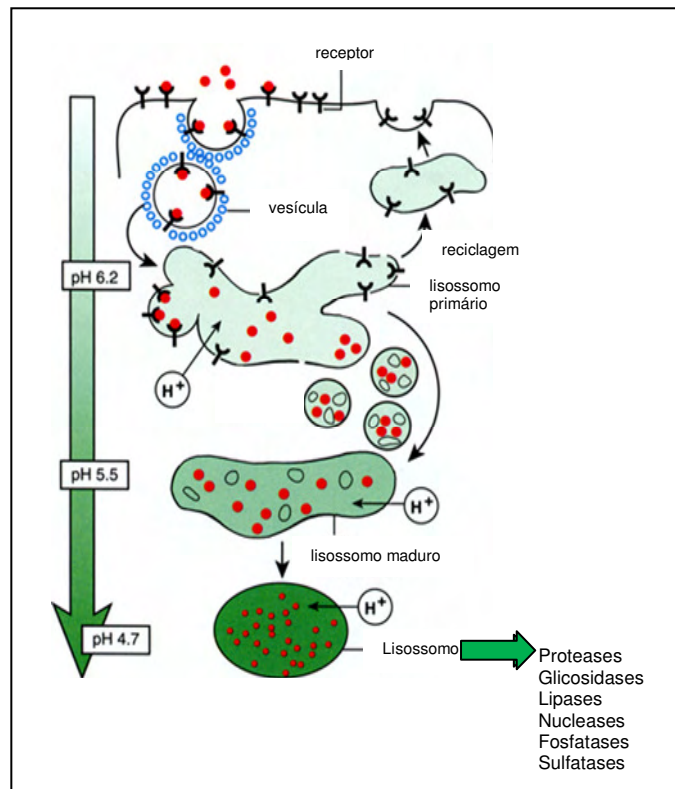


Figura 4: Esquema de formação e maturação de lisossomos na degradação de proteoglicanos.

4. Mucopolissacaridoses

Mucopolissacaridoses (MPS) são um grupo de doenças classificadas como erros inatos do metabolismo, causadas por um defeito enzimático específico que levam a um bloqueio de vias metabólicas específicas e conseqüente acúmulo de substrato (Neufeld, 1974). São doenças de caráter hereditário autossômico e recessivo, com exceção da MPS II ou Síndrome de Hunter, a qual é ligada ao X.

Deste modo, as MPS são originadas da deficiência de uma enzima lisossomal específica que participa do catabolismo de GAGs, gerando um acúmulo progressivo desses substratos não degradados (ou parcialmente degradados) que acumulam nas células e tecidos, onde o excesso é excretado na urina. Os genes destas enzimas lisossomais encontram-se mutados, dificultando o equilíbrio entre degradação e reciclagem correta dos

GAGs, desorganizando componentes celulares dos órgãos; estas mutações são específicas para apenas uma enzima envolvida em cada tipo de MPS. O acúmulo de GAGs causa

MPS I (atenuada, severa ou intermediária; antigamente denominadas de Síndromes de Hurler, Scheie e Hurler-Scheie respectivamente, devido aos seus descobridores), II (atenuada e severa; antigamente denominada de A e B), IIIA, B, C e D, IVA e B, VI, VII e IX. A classificação e nomenclatura destas doenças são confusas e variaram durante os anos, sendo aceito atualmente os termos acima descritos, com bases bioquímicas (Muenzer, 2004) (Tabela 3).

A prevalência das MPS é difícil de estimar devido à falta de estudos epidemiológicos a respeito. Já a incidência das mucopolissacaridoses é de aproximadamente 1:16.000 (Meikle, 1999).

Tabela 3: Mucopolissacaridoses, enzimas envolvidas e glicosaminoglicanos acumulados (Muenzer, 2004).

MPS	Denominação antiga	Enzima deficiente	GAGs acumulados
MPS I severa	Síndrome de Hurler	α -L-iduronidase	DS e HS
MPS I atenuada	Síndrome de Scheie	α -L-iduronidase	DS e HS
MPS I intermediária	Síndrome de Hurler-Scheie	α -L-iduronidase	DS e HS
MPS II severa	Síndrome de Hunter severa	Iduronato Sulfatase	DS e HS
MPS II atenuada	Síndrome de Hunter atenuada	Iduronato Sulfatase	DS e HS
MPS III A	Síndrome de Sanfilippo A	Heparam N-sulfatase	HS
MPS III B	Síndrome de Sanfilippo B	N-acetilglucosaminidase	HS
MPS III C	Síndrome de Sanfilippo C	Acetil-CoA-glucosaminidaacetiltransferase	HS
MPS III D	Síndrome de Sanfilippo D	N-acetilglucosamina 6-sulfatase	HS
MPS IV A	Síndrome de Mórquio tipo A	Galactose 6-sulfatase	KS, C6S
MPS IV B	Síndrome de Mórquio tipo B	β -galactosidase	KS
MPS VI	Síndrome Maroteaux-Lamy	N-acetilgalactosamina 4-sulfatase (arilsulfatase B)	DS
MPS VII	Síndrome de Sly-Neufeld	β -glucuronidase	DS, HS, C4S e C6S
MPS IX		Hialuronidase	Ácido Hialurônico

Em nosso laboratório, o diagnóstico das mucopolissacaridoses consiste na detecção da excreção aumentada de GAGs na urina, através de eletroforese em gel de agarose. Um exemplo é mostrado na Figura 6. Com relação à excreção urinária normal de GAGs, os valores de referência estão entre 10-30mg GAGs/L urina, sendo que o CS prevalece e representa cerca de 80%, o HS ao redor de 18% e o

DS 2%. Todas as MPS descritas apresentam aumento de excreção urinária de GAGs, bem como mudanças na proporção dos compostos excretados.

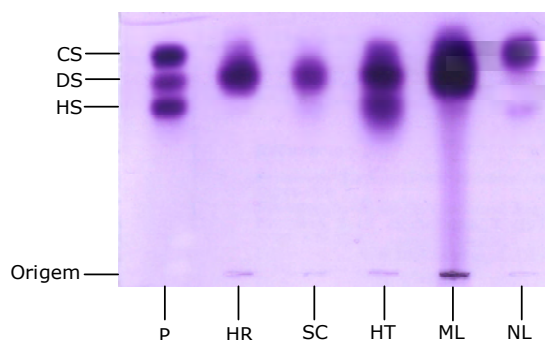


Figura 6: Eletroforese em gel de agarose de pacientes com diferentes mucopolissacaridoses.

HR: Síndrome de Hurler (MPS tipo I severa), **SC:** Síndrome de Scheie (MPS tipo I leve), **HT:** Síndrome de Hunter (MPS tipo II), **ML:** Síndrome de Maroteaux-Lamy (MPS tipo VI), **NL:** indivíduo normal. Cerca de 5µg de GAG totais urinários foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, como descrito em Métodos. **P:** Mistura padrão de 5µg de condroitim sulfato (CS); 5µg de dermatam sulfato (DS) e 5µg de heparam sulfato (HS).

Todas as técnicas de detecção de GAGs baseiam-se na presença de cargas negativas dos GAGs (grupamento carboxila e sulfato). Entretanto, o diagnóstico definitivo é dado pela dosagem enzimática específica. Estão disponíveis testes para todas as enzimas, podendo ser feito até mesmo durante a gravidez, porém com alta taxa de resultados falso-negativos devido à baixa quantidade de enzimas nas vilosidades coriônicas da placenta. A dosagem da atividade residual das enzimas envolvidas nas MPS é de baixo valor preditivo, pois as relações entre genótipo e fenótipo ainda não estão bem estabelecidas para estes tipos de doenças.

Enfim, o diagnóstico definitivo para cada paciente é feito baseando-se no conjunto de dados clínicos, radiológicos, genéticos e bioquímicos. Análises bioquímicas adicionais envolvendo métodos enzimáticos e químicos dessas estruturas isoladas têm contribuído significativamente no diagnóstico diferencial das diversas síndromes (Toma, Dietrich, Nader, 1996).

Pacientes diagnosticados com MPS devem receber aconselhamento genético, com o intuito de obter informações a respeito de hereditariedade e novos riscos de outros filhos virem a desenvolver MPS futuramente, bem como revelar se filhos normais são portadores ou não do gene mutado. A análise do tipo de mutação envolvido pode ser importante em relação à evolução da doença. Adicionalmente, o prognóstico da doença é importante para a escolha da terapia adequada para cada paciente (Scott, 1995). É importante a presença de uma equipe multidisciplinar no acompanhamento dos pacientes com MPS e seus familiares.

O tratamento das MPS baseia-se em corrigir a degradação dos glicosaminoglicanos dentro dos lisossomos. Desde os anos 70, este tipo de correção era conseguido com fibroblastos de pacientes em cultura (Fratantoni, Hall & Neufeld, 1968b). Este era o protótipo da terapia de reposição enzimática. Terapias paliativas estavam disponíveis para os pacientes com MPS, tais como: cirurgias para corrigir defeitos esqueléticos e em válvulas cardíacas, remoção da adenóide, amídalas para desobstrução das Vias Aéreas Superiores, transplante de córnea além de terapias comportamentais. Mais adiante, o transplante de células de medula óssea ou de cordão umbilical tornou possível melhorar o avanço da doença em pacientes com MPS tipo I e MPS tipo VI, já que o transplante de células normais substituíu a enzima deficiente. Com o avanço da Biologia Molecular, foi possível identificar e clonar os genes que codificam para cada enzima envolvida nas MPS; entender com maiores detalhes a estrutura primária de cada proteína só foi possível através do isolamento do cDNA que codifica essas enzimas. Além disso, foi possível produzir enzimas recombinantes, juntamente com o surgimento e disponibilidade de modelos animais. Tudo isto em associação tornou possível o início da Terapia de Reposição Enzimática, para retardar a progressão dessas doenças. Outras terapias que estão sendo averiguadas no momento são a terapia gênica e a terapia medicamentosa com pequenas moléculas, porém ainda não se encontram em estudos clínicos.

4.1. Mucopolissacaridose do tipo I

A Mucopolissacaridose do tipo I (MPS I) é a mais comum dos onze tipos de MPSs (Meikle *et al.*, 1999) e é causada devido a uma mutação do gene que codifica a enzima alfa-L-iduronidase (IDUA; *locus* gênico 4p16.3). Esta enzima hidrolisa os resíduos dos terminais não redutor do ácido alfa-L-idurônico do Dermatan Sulfato e do Heparan Sulfato (Neufeld & Muenzer, 2001), os quais se acumulam nos lisossomos. Originalmente, foi definida como o “fator corretivo de Hurler” (Barton & Neufeld, 1971), onde fibroblastos de pacientes em cultura só voltavam a degradar DS e HS após a adição de alfa-L-iduronidase contida no meio de cultura de indivíduos normais ou de outras mucopolissacaridoses.

Esta doença de armazenamento lisossomal pode ser subdividida em 3 fenótipos diferentes, de acordo com o grau de severidade: MPS tipo I severa (Síndrome de Hurler ou MPS IH), MPS tipo I atenuada (Síndrome de Scheie ou MPS IS), (McKusick *et al.*, 1972) e MPS I intermediária (Síndrome de Hurler-Scheie ou MPS IH/S), onde a primeira é a forma mais grave da doença, a segunda a forma mais branda e a última é a forma intermediária.

A idade média para o diagnóstico da MPS tipo I severa é de aproximadamente nove meses (Cleary & Wraith 1995), onde a maioria dos indivíduos é diagnosticada antes dos dezoito meses de idade. A morte é causada por falência cardiorespiratória e normalmente ocorre nos primeiros dez anos de vida. Pacientes com as outras formas da doença podem crescer até a fase adulta e estes são diagnosticados depois dos quinze anos de idade.

A frequência da MPS tipo I severa é de aproximadamente de 1: 100.000 e para a atenuada é de 1: 500.000 (Lowry & Renwick, 1971; Meikle *et al.*, 1999).

A MPS I parece ser a mais heterogênea das MPS e não há critérios clínicos e bioquímicos de rotina que definam e diferenciem estas três formas da doença; por esta razão, é de fundamental relevância a descoberta de novos critérios na busca da evolução de técnicas que permitam tal fato. Porém, já existem marcadores bioquímicos para a MPS tipo I, incluindo oligossacarídeos presentes nas urinas de pacientes portadores da doença.

O diagnóstico da MPS I pode ser feito durante o estágio pré-natal, em recém-nascidos ou crianças, através da demonstração da deficiência enzimática da IDUA lisossômica em leucócitos do sangue periférico, plasma ou em fibroblastos em cultura. A quantidade de IDUA geralmente não está correlacionada com a severidade da doença; quase todos os indivíduos com MPS tipo I apresentam níveis indetectáveis de atividade enzimática quando são feitos testes utilizando substratos artificiais. Embora ainda não ter sido rigorosamente testado, 0,13% da atividade enzimática normal parece ser suficiente para a apresentação de um fenótipo atenuado da doença (Ashton *et al.*, 1992). Deve ser notado que a deficiência na atividade da IDUA pode também ser encontrada na Doença da célula I (Mucopolidiose II) e na Pseudopolidistrofia de Hurler (Mucopolidose III), porém ela está sendo sintetizada corretamente e em quantidades normais, não sendo transportada aos lisossomos devido a um defeito no processo de endereçamento ao receptor lisossômico.

Usando análises de sequência ou mutações, é possível identificar 95% das mutações da IDUA em pacientes com MPS I (Clarke *et al.*, 1994). Já foram identificados mais de 70 tipos de mutações para a IDUA (Scott, 1995), com atividade residual geralmente abaixo de 1% da atividade normal dessa proteína. As mutações mais comuns são a W402X e a Q70X, que causam a forma mais grave da doença. A frequência dessas mutações varia de acordo com a população, variando de 11% a 55% para a W402X e de 7% a 65% para a mutação Q70X. Dessas mutações, até 70% são recorrentes na população e, assim, podem ser úteis na predição do fenótipo. Porém, muitas não são recorrentes e não são úteis para a predição do fenótipo.

A correlação entre o genótipo e o fenótipo da doença está sendo estudada nos últimos anos e a análise das mutações da IDUA está trazendo novas informações a respeito de sua estrutura e conseqüentemente de sua função mais detalhadamente. A relação entre as mutações, medições da atividade enzimática da IDUA e o fenótipo da doença não é de valor prognóstico fiel à doença. Casos demonstram que pacientes com a mesma mutação gênica possuem fenótipos diferentes; isto poderia ser explicado pela regulação da expressão gênica, *turnover* dos GAGs (relação entre a taxa de acúmulo ou armazenamento e a taxa de síntese) e fatores microambientais nas células que controlam os genes envolvidos, assim como ocorre até mesmo em células normais. Wegrzyn, 2004, propôs, ainda, que a medição da atividade da enzima deficiente e a eficiência na síntese de GAGs podem ser correlacionáveis e ter valor prognóstico considerável. A predição da severidade da doença pode ser uma ferramenta importante na escolha da melhor terapia a ser usada para a melhora da evolução da doença.

A quantificação da excreção urinária de GAGs através da eletroforese em gel de agarose, é um teste preliminar de diagnóstico, não sendo definitivo. Nestes pacientes, o DS aparece em grande quantidade na urina, com menor quantidade de HS (às vezes indetectável).

Os sintomas clínicos característicos desta doença são a opacidade da córnea, perda da audição, retardo mental, displasia esquelética, hérnias, hepatoesplenomegalia, alterações importantes no Sistema cardiorespiratório, variando de acordo com cada Síndrome. Recém-nascidos com a forma grave da doença aparentam características normais ao nascimento, com face grosseira aos dois anos de idade aproximadamente.

Várias tentativas de reposição enzimática foram realizadas como tratamento para a doença, incluindo transfusão de leucócitos e linfócitos. O transplante de células de medula óssea é eficiente para pacientes portadores da MPS tipo I severa, especialmente se for feito antes do agravamento do quadro. Entretanto, a morbidade e mortalidade substancial do processo de transplante e o requerimento de doadores compatíveis limitam seu uso. A TRE (Terapia de Reposição Enzimática) vem sendo estudada atualmente e é uma terapia que complementa ou substitui o transplante de medula óssea, dependendo da ocasião que será utilizada, porém a enzima não ultrapassa a barreira hematoencefálica e não altera o quadro do SNC. Porém, quanto mais cedo for recebida a terapia, maior as chances de melhora do paciente.

5. Terapia de Reposição Enzimática

A Terapia de Reposição Enzimática (TRE) é um tratamento potencial para doenças lisossomais de armazenamento e baseia-se em repor a enzima deficiente, através de infusões endovenosas seqüenciais. Comparando-se com o transplante de células de medula óssea ou células de cordão umbilical, possui as vantagens de que mais enzima está disponível para corrigir o problema, além de ser um método fácil, com menos riscos e disponível para maior número de pacientes usufruírem (Muenzer, 2004). Este tipo de terapia vem sendo usado em pacientes com as doenças: de Gaucher, Fabry e MPS tipo I. Já está em andamento estudos clínicos a respeito deste tipo de terapia para a MPS dos tipos II e IV, Doença de Pompe e Niemann-Pick tipo B. Porém, a terapia de reposição enzimática só se tornou possível a partir dos anos 90 (Desnick, 2004).

O desenvolvimento de técnicas onde foi caracterizado o aparelho lisossomal (de Duve, 1955,1975,1983; de Duve and Wattiaux, 1966), permitiu que se entendessem minuciosamente os pontos-chave que caracterizassem as doenças de acúmulo lisossomal. Devido ao grande impacto da Biologia Molecular, nos anos 90, os estudos clínicos a respeito da TRE foram aumentando.

Devido à necessidade óbvia e crescente de associar estudos clínicos à origem molecular/bioquímica da doença, foi proposto que a administração de enzimas normais poderia ter caráter terapêutico para pacientes com doenças de armazenamento lisossomal. Porém, algumas dificuldades eram encontradas, tais como: a inabilidade de se produzir uma enzima totalmente purificada, em quantidade suficiente e glicosilada corretamente, além da falta de modelos animais para as doenças de acúmulo lisossomal.

Brady et al, 1974, reportou a administração endovenosa de grandes quantidades da enzima glucocerebrosidase derivada de placenta humana, a qual diminuía a hepatomegalia em pacientes com a Doença de Gaucher do tipo I, diminuindo assim, o acúmulo do substrato enzimático no lisossomo. Foi feita assim, a primeira terapia de reposição enzimática bem sucedida, mostrando eficácia e segurança. Porém, a TRE só pode ser colocada em prática após o surgimento de técnicas de Biologia Molecular e de DNA recombinante, que caracterizou as enzimas lisossomais e suas estruturas, além da clonagem da própria enzima, sanando os problemas encontrados no início.

O mecanismo de ação da enzima recombinante, após a administração endovenosa, é baseado na chegada da enzima até os lisossomos e, em seguida, seu reconhecimento pelos receptores de manose 6-fosfato presente na membrana dessas organelas. Após, a enzima é internalizada e degrada os substratos ali

acumulados. Daí vem a importância da correta glicosilação enzimática para que esta seja reconhecida e internalizada pelos lisossomos.

Genes que codificam enzimas lisossomais e *knockout* de enzimas lisossomais em animais são técnicas que foram sendo usadas nas últimas duas décadas para o entendimento e melhoramento deste tipo de terapia, mostrando interesse para outras doenças de armazenamento.

5.1. Terapia de Reposição Enzimática em MPS tipo I

Recentemente, a clonagem do DNA complementar que codifica a enzima alfa-L-iduronidase levou à produção da enzima IDUA recombinante humana, a qual está envolvida na degradação normal dos resíduos de ácido idurônico do DS e do HS. A administração intravenosa desta enzima recombinante em cachorros portadores de MPS I severa, revelou que esta foi distribuída pelo corpo do animal e reduziu o armazenamento lisossomal em muitos tecidos (Kakkis *et al.*, 1993; 1996).

A TRE é um tratamento eficaz para diversos órgãos e tecidos. Três parâmetros são analisados quanto à eficácia: resposta patológica, clínica e imunológica; sua eficiência depende da entrega de quantidades suficientes da enzima infundida aos sítios-alvo específicos da doença e da reversibilidade dos sintomas apresentados pelos pacientes (Desnick, 2004). Assim, a resposta à enzima é diferente entre os órgãos e depende da biodistribuição da droga no organismo. Entretanto, a TRE tem seu uso limitado em pacientes com MPS I severa, os quais possuem grave comprometimento do SNC, já que a enzima recombinante não ultrapassa a barreira hematoencefálica. O correto prognóstico da severidade da MPS I seria de grande importância nestes casos, principalmente quanto à escolha da terapia para pacientes diagnosticados precocemente. Porém, ainda não pode ser esclarecido adequadamente devido a diversos fatores já discutidos anteriormente. Muitas estratégias já estão sendo estudadas para aprimorar a chegada da enzima até o SNC utilizando vetores retrovirais e administração intratecal (Chung, *et al.*, 2007; Watson, *et al.*, 2006; Hartung, *et al.*, 2004; Kakkis, *et al.*, 2004).

A laronidase (Aldurazyme®, Genzyme, Cambridge, MA, USA) é a enzima alfa-L-iduronidase recombinante humana, comercialmente disponível atualmente. Esta enzima foi primeiramente produzida em células CHO (Kakkis, *et al.*, 1994). Estudos clínicos de Fase 1/2 do uso desta enzima em TRE mostraram os benefícios clínicos do tratamento com a enzima e dados sobre a sua farmacodinâmica (Kakkis,

et al., 2001). Estudos de Fase 3 com a enzima demonstraram segurança satisfatória, comparável à do placebo, e a terapia vem melhorando muitos dos sinais e sintomas dos pacientes acometidos com a doença (Wraith *et al.*, 2004). Dados da literatura demonstram que houve, principalmente, redução da hepatoesplenomegalia, apnéia do sono e excreção de GAGs na urina dos pacientes sob tratamento. Houve também aumento da mobilidade nas articulações, além de aumento da taxa de crescimento. Mais estudos devem ser feitos para se saber os efeitos da terapia com esta enzima à longo prazo, principalmente porque o fenótipo da MPS tipo I é muito heterogêneo.

Já foram averiguados pacientes com resposta imune contra a enzima recombinante, com reações de hipersensibilidade e provocando uma fase de *platô* no decorrer da TRE, onde a progressão da doença durante terapia não muda. A reposta imunológica à TRE não afeta a eficácia da mesma; a ocorrência de febres, dermatites atópicas e *rushs* cutâneos pode ser diminuída com a diminuição da taxa de infusão ou pré-medicação anti-histamínica. Se há soroconversão, o título de anticorpos contra a enzima decresce com o passar do tempo, não acarretando problemas para o paciente em terapia (Kakavanos, *et al.*, 2003).

Os marcadores bioquímicos das MPS são essenciais para avaliar a eficácia da terapia e podem ser úteis na determinação da dosagem da terapia (Fuller, 2004). Fuller, 2004, utilizou a técnica de Espectrometria de massa por ionização electrospray em tandem (ESI-MS/MS) para averiguar alguns marcadores bioquímicos presentes na urina de pacientes com MPS I, reportando a existência de oligossacarídeos sulfatados derivados da degradação parcial de GAGs, apresentando seus terminais não redutores expostos, os quais são os substratos para a enzima deficiente. Após a terapia, esses compostos foram reduzidos significativamente na urina destes pacientes, demonstrando que a enzima degradou os GAGs que estavam armazenados. King, B. *et al.*, 2006, demonstrou que HS contendo dissacarídeos específicos estão acumulados no cérebro de camundongos com MPS III. Após a terapia de reposição enzimática com a enzima deficiente (sulfamidase, no caso), a concentração desses dissacarídeos diminui abruptamente. Estes achados mostram que a detecção destes dissacarídeos e os substratos podem ser úteis para monitorar a eficácia das terapias de reposição enzimática em seres humanos.

São poucos os dados existentes na literatura sobre os marcadores bioquímicos presentes nas urinas de pacientes com MPS tipo I. Na tentativa de elucidar esses processos, o estudo dos GAGs urinários excretados na MPS tipo I podem esclarecer algumas dessas questões, à luz do seqüenciamento estrutural desses polímeros.

6. Outras terapias

A TRE não é a única terapia que está sendo usada para o tratamento de MPS tipo I e outras doenças de armazenamento lisossomal. Novas terapias estão sendo estudadas atualmente e, junto aos estudos, existe o intuito de caracterizar os defeitos envolvidos nessas doenças. Algumas dessas terapias são: Terapia de privação de substrato, Terapia de “melhoramento” enzimático e a Terapia Gênica.

A primeira terapia citada acima, a Terapia de privação do substrato (PS), é baseada na administração de inibidores da enzima biossintética adjacente à enzima deficiente, diminuindo a produção do substrato acumulado. Cox *et al.* (2000) estudou este tipo de terapia, a qual está em Fase I/II em pacientes portadores de Gaucher. Houve melhoras, mas existem efeitos colaterais desagradáveis, tais como diarreia e parestesia. Entretanto, através da descoberta de inibidores enzimáticos mais específicos, esses efeitos tendem a diminuir bastante. Este tipo de terapia apenas previne o aparecimento de futuros acúmulos de substrato. No caso das MPS, genisteína tem sido usada em alguns poucos trabalhos, porque esse substrato inibe a atividade quinase do receptor de fator de crescimento epidérmico (EGF), que é usado para a expressão de genes de enzimas da via biossintética dos GAGs (Piotrowska *et al.*, 2006).

A segunda, Terapia de “melhoramento” enzimático, é baseada na estabilização de enzimas instáveis, porém ativas, as quais devem ser encaminhadas ao complexo retículo endoplasmático/complexo de Golgi adequadamente. Sabe-se que enzimas instáveis não conseguem chegar à esse complexo e são removidas através do sistema de ubiquitinação-proteossomo. As enzimas, neste caso, são estabilizadas por inibidores competitivos reversíveis de baixo peso molecular ou por análogos do substrato, os quais ligam-se aos sítios ativos e facilitam seu transporte através das organelas corretas (Matsuda *et al.*, 2003).

A terceira, a terapia gênica (TG), baseia-se em dois métodos: o gene pode ser direcionado diretamente para as células dos órgãos mais afetados que necessitam da enzima, através de um vetor viral (Watson *et al.*, 2006; Domenico *et al.*, 2006), ou *in trans* onde células vizinhas já transfectadas são fontes da enzima deficiente, secretando-a para essas células. Células de camundongos transfectadas expressam de 15 a 200 vezes mais IDUA, quando comparado com o nível de atividade endógena da enzima. Os resultados indicam que a terapia gênica é mais eficaz em neonatos do que em adultos jovens, principalmente no que diz respeito a passagem da enzima pela barreira hematoencefálica, onde ocorre maior nível de transfecção e conseqüente expressão de IDUA. *In vivo* houve um aumento

do nível de expressão da enzima no fígado e em neonatos isso diminui o acúmulo de GAGs nos tecidos, previne anormalidades esqueléticas, melhora a aparência e aumenta a taxa de sobrevivência. A extensão da transfecção é dose-dependente e os efeitos são observados em um período curto de tempo, comparando-se com o TMO.

A TG sistêmica está sendo estudada em modelos animais de MPS tipo I, onde há expressão de IDUA, a qual corrige o fenótipo da doença. Assim, a TG pode ser vista como uma medida profilática para a MPS I, quando diagnosticada cedo, podendo ser um potente tratamento no futuro para crianças recém nascidas portadoras de MPS tipo I (Hartung *et al.*, 2004; Kobayashi *et al.*, 2005; Chung *et al.* 2007).

As terapias descritas neste estudo podem ser utilizadas em conjunto, muitas vezes, de maneira a prevenir a evolução da doença.

OBJETIVOS

A identificação precoce de indivíduos com MPS tipo I, juntamente com a atual disponibilidade de algumas terapias de reposição enzimática, poderiam impedir a instalação de sintomas irreversíveis da doença. Marcadores bioquímicos da atividade da doença são, portanto, essenciais para avaliar a eficácia da terapia, e seriam também úteis para a determinação da dosagem da enzima a ser administrada. Os objetivos desta tese consistem em:

1. Analisar bioquimicamente os GAGs urinários excretados por pacientes com Mucopolissacaridose do tipo I, antes e durante a Terapia de Reposição Enzimática com a enzima α -L-iduronidase humana recombinante;
2. Analisar estruturalmente os dissacarídeos dos GAGs excretados, através de degradações enzimáticas;
3. Correlacionar os dados bioquímicos obtidos com a progressão clínica da doença.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS

1. Urinas humanas

As diversas amostras de urinas humanas normais e de pacientes portadores de mucopolissacaridoses do tipo I foram preservadas com cristais de timol e/ou mantidas congeladas a -20°C até a análise. As amostras dos pacientes em Terapia de Reposição Enzimática (ERT) foram enviadas pela Dr^a. Ana Maria Martins, do Centro de Genética do Departamento de Pediatria da UNIFESP. As urinas dos indivíduos normais foram coletadas através de doações.

2. Considerações éticas

Todos os pais e tutores legais forneceram consentimento de informação, por escrito, para a participação no estudo. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética institucional 0660/05.

3. Dados clínicos dos pacientes

Três pacientes portadores de MPS tipo I foram submetidos ao tratamento de Reposição de Enzima Recombinante (TRE). Aqui apresentamos os dados clínicos dos três pacientes, antes do tratamento. Todo o acompanhamento clínico antes e depois das infusões foram realizadas pela equipe multidisciplinar coordenado pela Dra Ana Maria Martins: Dras Sandra Obikawa Kyosen, Cecília Micheletti, Tânia Arlete Verlemati do Amaral Secches, Carmem Sílvia Curiati Mendes, Maret Holanda Rand, Vânia D'Almeida.

Paciente 1: M.M.H.S., sexo masculino, 3 anos, fenótipo de MPS tipo I severa (Síndrome de Hurler). As primeiras manifestações ocorreram com 1 (um) ano de idade, sendo o diagnóstico feito aos 3 anos, através da dosagem da atividade enzimática de IDUA. Apresenta comprometimento mental moderado, irritabilidade, marcha com apoio lateralizada com semiflexão dos joelhos, hipotonia global e fala ininteligível, insuficiência mitral leve e hepatoesplenomegalia, com o fígado a 3cm de RCD e baço a 2cm de RCE. Disostose múltipla, opacidade de córnea, infecções recorrentes das vias aéreas superiores (VAS), dermatite atópica, asma e história familiar positiva para atopia. O paciente interrompeu várias vezes a terapia devido a quadros infecciosos febris e atopias, em acompanhamento no serviço de alergias pediátrica.

Paciente 2: G.C.A., sexo masculino, 8 anos, fenótipo de MPS tipo I severa (Síndrome de Hurler), com as primeiras manifestações ocorrendo com 1 (um) ano de idade. O diagnóstico foi feito aos 6 anos e 6 meses de idade, através da dosagem da atividade enzimática de IDUA. Apresenta comprometimento mental grave, hidrocefalia severa, hipotonia axial, dupla hemiparesia de predomínio crural, hiperreflexia miotática de membros inferiores (MMII) nistagmo, cardiomiopatia hipertrófica concêntrica do VE e espessamento mitral e hepatoesplenomegalia, com o fígado a 6cm do rebordo costal direito (RCD) e baço a 8,5cm do rebordo costal esquerdo (RCE). Apresenta também opacidade de córnea, disostose múltipla e a polissonografia, antes da ERT, evidenciava a ocorrência de roncos de intensidade leve e constante.

Paciente 3: A.G.M., sexo feminino, 9 anos, fenótipo de MPS tipo I intermediária (Síndrome de Hurler-Scheie), primeiras manifestações clínicas a partir de 1 ano e 6 meses de idade. O diagnóstico foi feito com 7 anos e 6 meses através da dosagem enzimática de IDUA. Apresenta comprometimento mental leve, hepatoesplenomegalia, com o fígado a 8 cm do rebordo costal direito (RCD) e baço a 11cm do rebordo costal esquerdo (RCE); opacidade de córnea, apnéia obstrutiva do sono severa, cardiomiopatia hipertrófica concêntrica do ventrículo esquerdo (VE) e estenose pulmonária leve, espessamento mitral e aórtico; disostose múltipla, hidrocefalia não hipertensiva.

4. INFUSÕES ENZIMÁTICAS

Enzima recombinante humana alfa-L-iduronidase (Laronidase), produzida pela BioMarin Pharmaceutical, Inc, Novato, CA e Genzyme Corp, Cambridge, MA (Aldurazyme®) (diluída em salina com 0,1% de soroalbumina humana, como recomendada por Martins et al., 2009) foi administrada intravenosamente numa dose de 0,58 mg/Kg, semanalmente, numa Unidade de Terapia Intensiva.

5. GLICOSAMINOGLICANOS PADRÕES

Condroitim 4-sulfato (C4S ou CSA) e condroitim 6-sulfato (C6S ou CSC), extraídos de cartilagem de baleia e tubarão, respectivamente, foram adquiridos de Sigma Chemical Co. ® (St. Louis, MO, EUA). Condroitim sulfato (CS) foi extraído de traquéia bovina em nosso laboratório (MOURÃO et al., 1976). Dermatam sulfato (DS) de pele de porco ou de mucosa intestinal suína foi adquirido de Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, EUA). Heparan sulfato (HS) de pâncreas bovino foi cedido pelo Dr. P. Bianchini da Opocrin Research Laboratories (Modena, Itália).

6. DISSACARÍDEOS PADRÕES

O dissacarídeo insaturado não sulfatado (Δ DiOS), dissacarídeo insaturado 4-sulfato (Δ Di4S) e dissacarídeo insaturado 6-sulfato (Δ Di6S) são produtos de degradação do condroitim sulfato com a enzima condroitinase ABC de *Proteus vulgaris* e são constituídos de ácido urônico insaturado entre C-4 e C-5 unidos por ligação β 1 $\rightarrow$ 3 à *N*-acetilgalactosamina, com diferentes substituições.

7. ENZIMAS

As enzimas utilizadas para a degradação enzimática dos glicosaminoglicanos são de origem bacteriana e foram adquiridas comercialmente ou produzidas em nosso laboratório.

As enzimas Condroitinase AC (extraída de *Arthrobacter aurescens* e solubilizada em tampão Tris-HCl 0,02M pH 7,3) e Condroitinase ABC (extraída de *Proteus vulgaris* e solubilizada em tampão Tris-HCl 0,02M pH 8,0) foram adquiridas de Sigma Chemical Co.® e purificadas como descrito em HIYAMA & OKADA, 1975 e YAMAGATA et al., 1968, respectivamente.

8. OUTROS MATERIAIS

- Ácido isobutírico – Aldrich Chemical Co. Inc. (Millwaukee, WI, EUA);
- Agarose (standard low mr) - BioRad Laboratories (Richmond, CA, EUA);
- Albumina sérica bovina (BSA) (Sigma Chemical Co. ® (St. Louis, MO, EUA);
- Azul de toluidina da Fisher Scientific Co.® (Fair Lawn, NY, EUA);
- Brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB ou CETAVLON) (Merck®, Darmstadt, Alemanha);
- Cloreto de sódio (Merck®, Darmstadt, Alemanha);
- Colunas para cromatografia de gel filtração no tamanho de 1x10cm (Bio-Rad Laboratories Ltda., Richmond, CA, EUA);
- Express Plus 550 (Chiron) Baye®, metodologia ácido picrico/picrato alcalino, Biotécnica®;
- Kit para dosagem de Creatinina (Sigma Chemical Co. ® (St. Louis, MO, EUA);
- Papel para cromatografia nº 1 e 3 MM – Whatman International (W & R Balston Ltd, Maidstone, Inglaterra);
- Placas de ELISA – Nunc polysorp para imunocitoquímica;
- Resina Lewatit (Bayer, São Paulo, S.P.);

- Resina Sephadex G-50 e Sephadex G-25/PD10 – GE Healthcare Life Sciences (UK);
- Resina Q-Sepharose - GE Healthcare Life Sciences (UK).

9. EQUIPAMENTOS

- Agitador Vortex Genie-2 modelo 250 – Scientific Industries, Inc. (Bohemia NY, EUA);
- Agitador Magnético BPI micro Corning, EUA;
- Balança analítica Metler – A&D Company, EUA;
- Balança eletrônica – Ohaus (New York, NY, EUA)
- Banhos e estufas de temperatura constantes – FANEN Ltda. (São Paulo, SP, BR);
- Cuba para eletroforese em gel, desenvolvido por JAQUES et al., 1968 – Técnica Permatron Ind. Com. Ltda (São Paulo, SP, BR);
- Centrífuga de mesa LS3- CELM (São Paulo, SP, BR);
- Densitômetro Quick Scan Flur-Vis – Helena Laboratories;
- Densitômetro Shimadzu, Modelo CS-9000 (Kyoto, Japão);
- Espectrofotômetro Spectronic 2000 – Bausch & Lomb (Rochester, NY, EUA)
- Fontes de corrente contínua reguláveis - Técnica Permatron Ind. Com. Ltda (São Paulo, SP, BR);
- Lâmpada de ultravioleta de alta densidade UVG-11 – Ultra-violet Products, Inc.;
- Leitora de placas de Elisa ELX 800 Universal Microplate Reader – BioTek Instruments, Inc. (EUA);
- Liofilizador tipo Speed-Vac VR-1 – Heto Holten A/S (Allerød, Dinamarca);
- Liofilizador modelo Flexi-DryTM μ p, da FTS Systems (Stone Ridge, NY, EUA);
- Medidor de pH 420A – Orion Research Incorporated (EUA);
- Microcentrífuga, modelo 5451C – Brinkman Instruments, Inc. (NY, EUA);

Todos os demais reagentes e materiais empregados foram da melhor qualidade comercial disponível.

MÉTODOS

1. EXTRAÇÃO DE GAGs DE URINA

Glicosaminoglicanos (GAGs) urinários foram purificados essencialmente por dois métodos:

1.1. Cromatografia de gel filtração em Sephadex G-25/PD 10

Para a extração de GAGs de pequenos volumes de urina foi utilizado uma coluna de gel filtração em Sephadex G-25/PD 10 (1,5 X 10cm) (GE Healthcare Life Sciences). Amostras de 2 ml de urina foram aplicados à coluna equilibrada em água destilada. Frações de 1 ml foram coletadas e secas sob vácuo (SpeedVac), ressuspensas em 100 µl de água destilada, e 5 µl aplicadas a eletroforese em gel de agarose para análise quanto à presença de GAGs.

1.2. Cromatografia de troca iônica em resina Q-Sepharose

Para análises estruturais, GAGs urinários foram extraídos por troca iônica em resina Q-Sepharose (coluna de 5mL). Amostras de 15 mL de urina foram previamente diluídas acrescentando-se 5mL de água destilada e aplicadas na coluna. Após lavagem da coluna com uma solução de NaCl 0,2M, de modo a remover compostos inespecíficos, os GAGs foram descomplexados da coluna com NaCl 3M, com um volume equivalente a três vezes o volume da coluna, ou seja, 15mL. Estas amostras contendo GAGs foram dessalificadas em colunas de Sephadex G 25/PD 10, previamente descritas.

2. IDENTIFICAÇÃO DE GAGs POR ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

O método de eletroforese em gel de agarose, desenvolvido por Jaques *et al.*, 1968 e modificado por Dietrich & Dietrich, 1976, foi utilizado para a identificação e quantificação de GAGs presentes em cada amostra urinária. Foram aplicadas alíquotas das amostras em lâminas de gel de agarose 0,6% de diversos tamanhos, dependendo do número de amostras a serem analisadas - pequeno (5,0 x 7,5cm), médio (7,5 x 7,5cm) ou grande (10,0 x 7,5cm) - em tampão 1,3 diaminopropano acetato 0,05M, pH 9,0 (PDA), com espessura de 2mm. A eletroforese é feita em caixa refrigerada a 4°C (5V/cm), durante 1 hora ou até que se obtenha a migração apropriada. Este sistema separa eficientemente os GAGs por ordem decrescente de mobilidade devido às cargas negativas dos GAGs, onde ocorre a interação da diamina do tampão com os compostos; quanto maior a interação, menor a

migração eletroforética. Assim, o CS é o GAG de maior mobilidade, seguido de DS e HS, com a menor mobilidade.

Após a corrida eletroforética, os compostos foram precipitados com CTAB 0,2% por 1 hora. O gel foi seco por ventilação e aquecimento, e corado com azul de toluidina 0,1% em ácido acético 1% e etanol 50%, durante 30 minutos; o excesso de corante foi removido por solução descorante de ácido acético 1% em etanol 50%. Após evaporação dos solventes descorantes em temperatura ambiente, os GAGs do gel puderam ser quantificados por densitometria em 525nm, comparando-se a intensidade da cor metacromática dos GAGs das amostras com as do padrão de GAGs de concentração conhecida.

3. CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE GAGs URINÁRIOS

3.1. DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA

Os GAGs das amostras urinárias foram investigados quanto à sua estrutura através de degradações enzimáticas com Condroitinases AC e ABC (Sigma Chemical Co.®). Cerca de 40µg de GAGs urinário foram incubados com 30µL de condroitinase ABC (tampão Tris-HCl 0,02M pH 8,0) e 30µL condroitinase AC (tampão Tris-HCl 0,02M pH 7,3) durante 18 horas a 37°C. CS e DS padrões também foram utilizados como controle.

Os dissacarídeos padrões foram obtidos através da degradação enzimática dos GAGs Condroitim-4-Sulfato e Condroitim-6-Sulfato (Sigma Chemical Co.®), com condroitinase ABC de *Proteus vulgaris*, produzida em nosso laboratório (Dodgson & Lloyd, 1957; Yamagata et al., 1968).

3.2. CROMATOGRAFIA ANALÍTICA DESCENDENTE EM PAPEL

Os produtos formados pelas degradações enzimáticas dos GAGs foram analisados por cromatografia descendente em papel (papel Whatman nº1), no solvente ácido isobutírico:hidróxido de amônio 1,25N (5:3 v/v), por 18 horas; logo após, a cromatografia foi seca em estufa, com aquecimento. Os dissacarídeos insaturados foram localizados por absorção da luz ultravioleta em 232 nm (Dietrich, 1968) e todos os demais produtos foram revelados por reação com nitrato de prata alcalino e fixados com tiosulfato de sódio 5% (Trevelyan *et al.*, 1950). Os produtos formados na cromatografia em papel foram quantificados por densitometria em 540 nm no densitômetro Shimadzu, modelo CS-9000 (Kyoto, Japão).

4. DOSAGEM DE CREATININA URINÁRIA

A quantificação de GAGs foi correlacionada com creatinina urinária, corrigindo-se assim, os diferentes volumes e concentrações das amostras. As amostras de urina foram previamente diluídas 1:100 (v/v) e creatinina quantificada pelo método do picrato alcalino, utilizando-se o kit da Sigma Diagnostics para micro escala, e a absorbância lida a 490 nm no Microplate Reader (ELISA ELX-800 Universal, Bio Tek Instruments INC.).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com a finalidade de avaliar os efeitos da Terapia de Reposição Enzimática periódica com alfa-L-iduronidase recombinante nos níveis de GAGs, três pacientes portadores de mucopolissacaridose tipo I foram submetidos à infusão intravenosa com Laronidase na dosagem de 0,58 mg/kg, semanalmente, em Unidade de Terapia Intensiva.

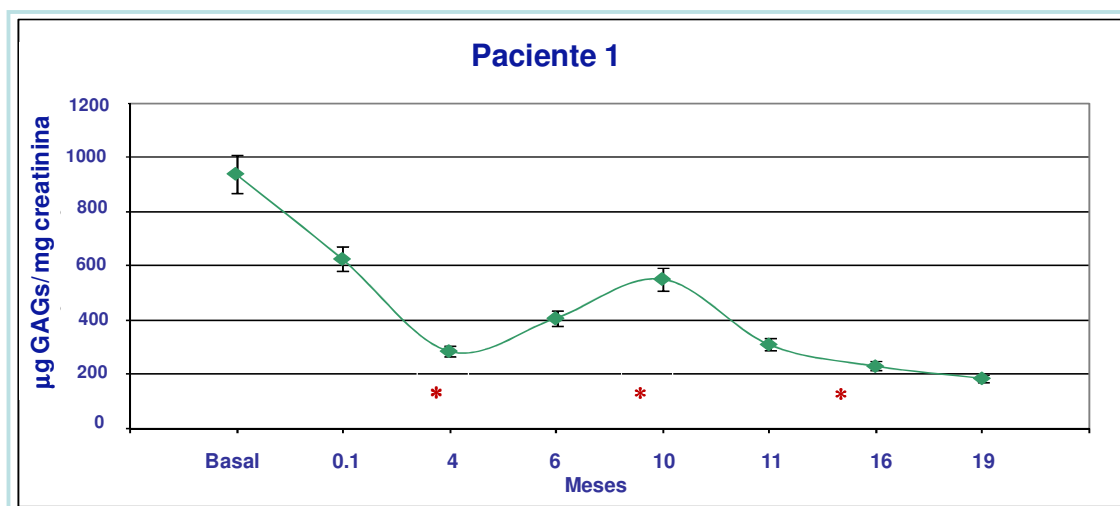
O primeiro paciente deste estudo, submetido ao tratamento com Terapia de Reposição Enzimática consistiu de um menino de 3 anos de idade (M.M.H.S.), com fenótipo da síndrome de Hurler, apresentando comprometimento mental, disostose, hepatoesplenomegalia, problemas cardíacos, infecções recorrentes do tracto respiratório superior e asma (Materiais). Altos níveis de glicosaminoglicanos urinários consistiram primariamente de aumento na excreção de dermatam sulfato, e a atividade de alfa-L-iduronidase que se apresentava extremamente baixa no sangue, consistente com o diagnóstico de mucopolissacaridose (MPS) tipo I (Tabela 4).

Tabela 4 – Níveis basais de glicosaminoglicanos urinários e atividade de alfa-L-iduronidase de sangue dos pacientes.

Pacientes	GAGs urinários, níveis basais				Atividade de α-L-iduronidase μmol/Litro sangue/h
	GAGs totais μg/mg creatinina	Porcentagem			
		CS	DS	HS	
M.M.H.S.	943 ± 57	7%	74%	19%	0.20
G.C.A.	373 ± 27	25%	61%	13%	0.47
A.G.M.	323 ± 18	14%	73%	14%	0.59
Valores normais	< 100	70%	5%	10%	2.2 – 11.7

GAGs, glicosaminoglicanos; CS, condroitim sulfato; DS, dermatam sulfato; HS, heparam sulfato. GAGs totais urinários foram quantificados por eletroforese em gel de agarose (Métodos), e representam a média $\pm$ erro padrão, com duas determinações para cada amostra. A quantificação enzimática da alfa-L-iduronidase foi realizada em gotas de sangue secas em papel de filtro (Chamoles, 2001).

Após início do tratamento com Laronidase, uma diminuição gradual, mas significativa nos GAGs urinários foi observado (Figura 7).



* Interrupções devido a brocoespasmo e urticária.

Figura 7 – **Excreção urinária de GAGs do paciente M.M.H.S. durante terapia de reposição de α -L-iduronidase.** Amostras de urina foram coletadas do paciente, como indicado na figura. GAGs foram purificados como descrito em Métodos e correlacionados com creatinina. GAGs totais urinários foram quantificados por eletroforese em gel de agarose (Métodos), e representam a média $\pm$ erro padrão, com duas determinações para cada amostra.

Dezenove (19) meses depois do início do tratamento os níveis urinários de GAGs se mantiveram baixos, porém não atingiu os níveis normais ($< 100 \mu\text{g GAG/mg}$ de creatinina) (Wraith *et al.*, 2004; Harmatz *et al.*, 2006), provavelmente por causa das várias interrupções devido às frequentes infecções do trato respiratório apresentado pelo paciente, não relacionadas às infusões. Os benefícios clínicos incluíram redução da hepatoesplenomegalia (Figura 8), e significativa melhora na flexão e extensão dos ombros, cotovelos, joelhos, interfalanges e cervical. Melhora na habilidade de deambulação foi observada, no entanto, nenhuma alteração foi detectada no ecocardiograma e polissonografia.

O segundo paciente (G.C.A.) consistiu de um menino de 8 anos, com fenótipo de síndrome de Hurler severo. Além de todos os problemas clínicos típicos da síndrome, apresentava hidrocefalia (Materiais). O diagnóstico foi confirmado com altos níveis de dermatam sulfato urinários e baixa atividade de alfa-L-iduronidase sanguínea (Tabela 4).

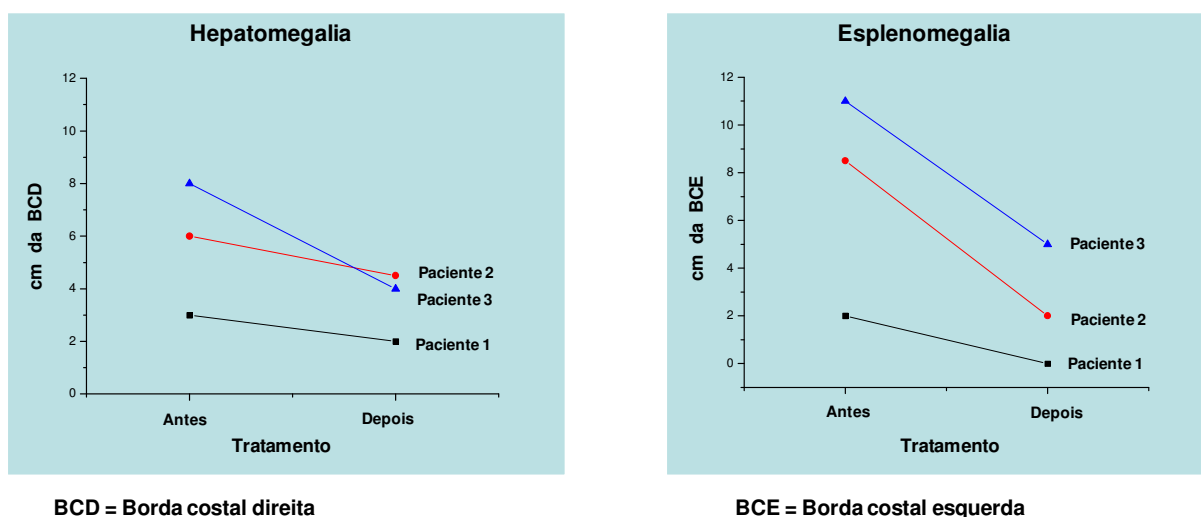


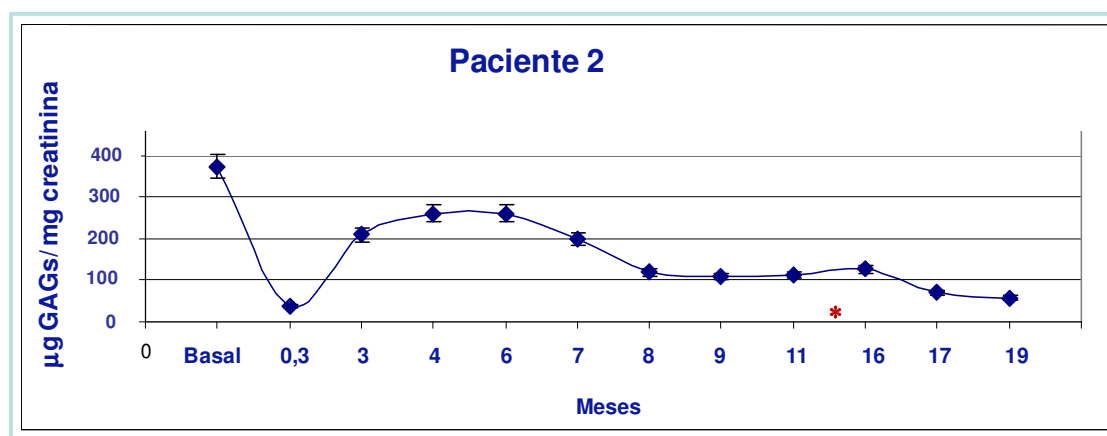
Figura 8 – Comparação de hepatomegalia e esplenomegalia antes e depois da Terapia de Reposição Enzimática dos pacientes.

Após início do tratamento, os níveis de GAGs urinários apresentaram declínio acentuado dentro de 10 dias iniciais (Figura 9), aproximando a valores de indivíduos normais, que é aproximadamente 100 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de creatinina. Clinicamente, uma redução acentuada de hepatoesplenomegalia (Figura 8) foi detectada, além de normalização de ecocardiograma.

O terceiro paciente, consistiu de uma menina de 9 anos (A.G.M.), com fenótipo de Hurler-Scheie intermediário (Tabela 4). Clinicamente, ela era semelhante aos outros pacientes, mas não apresentava comprometimento mental. Bioquimicamente, os dados confirmaram o diagnóstico (Tabela 4). Uma importante diminuição dos GAGs urinários foram observados durante 21 meses de tratamento, resultando em níveis de excreção normais (Figura 10). Exceção foi observada aos 11 meses de tratamento, apresentando uma elevação nos níveis de GAGs, devido à interrupção no tratamento.

Os resultados obtidos em algumas amostras desta paciente (A.G.M.) apresentaram-se interessantes, onde uma banda distinta foi observada, sugerindo tratar-se de condroitim sulfato, à medida em que dermatam sulfato diminui (Figura 11). Condroitim sulfato está presente em quantidades muito insignificantes na urina de pacientes portadores de MPS I (Figura 11, basal), no entanto este composto predomina em indivíduos normais.

Por esta razão, decidimos investigar a presença de condroitim sulfato na urina desta paciente, em particular, pela utilização de enzimas específicas, como a enzima condroitinase ABC (Figura 12). Os produtos desta enzima foram detectados por redução com nitrato de prata alcalino, após cromatografia descendente em papel.

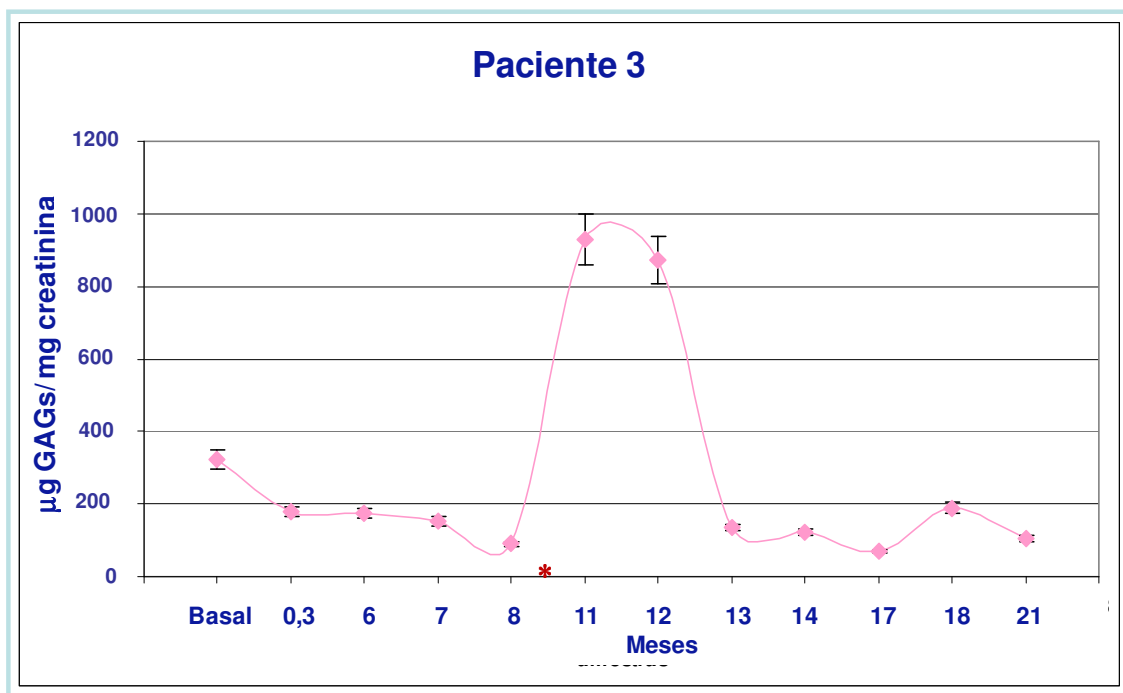


* Interrupções devido a hidrocefalia

Figura 9 - **Excreção urinária de GAGs do paciente G.C.A. durante terapia de reposição de α -L-iduronidase.** GAGs foram purificados como descrito em Métodos e correlacionados com creatinina. GAGs totais urinários foram quantificados por eletroforese em gel de agarose (Métodos), e representam a média $\pm$ erro padrão, com duas determinações para cada amostra.

O dissacarídeo insaturado-4-sulfatado (Δ Di-4S) foi o principal produto detectado nas amostras desta paciente no início do tratamento (amostra basal, Figura 12), proveniente da quebra de dermatam sulfato, que predomina na urina destes pacientes. No entanto, dissacarídeo insaturado-6-sulfatado (Δ Di-6S) também foi detectado nas amostras subsequentes desta mesma paciente.

Deve-se salientar que nas análises desta enzima, o condroitim sulfato derivado de urina de indivíduos normais resultam na formação de Δ Di-4S e Δ Di-6S (Figura 12). No entanto, o dermatam sulfato padrão resulta na formação exclusiva de Δ Di-4S. Assim, por esta análise, podemos concluir que todos os produtos 6-sulfatados são derivados exclusivamente de condroitim sulfato (CS).



* Interrupção

Figura 10 - **Excreção urinária de GAGs do paciente A.G.M. durante terapia de reposição de α -L-iduronidase.** GAGs foram purificados como descrito em Métodos e correlacionados com creatinina. GAGs totais urinários foram quantificados por eletroforese em gel de agarose (Métodos), e representam a média $\pm$ erro padrão, com duas determinações para cada amostra.

Assim, a presença de Δ Di-6S na amostra da paciente A.G.M., principalmente nas amostras mais tardias é portanto, proveniente da presença de CS na urina. Esses

produtos foram quantificados por densitometria, e em algumas amostras da paciente A.G.M., estes produtos 6-sulfatados estão aumentados cerca de 3 vezes mais em relação ao basal antes do tratamento (Figura 13). Clinicamente, esta paciente apresentou uma redução importante na hepatoesplenomegalia (Figura 8) e melhoras significativas na mobilidade articular.

Essa mesma análise envolvendo condroitinase ABC também foi realizado com os GAGs dos pacientes M.M.H.S. e G.C.A., porém não foi detectado aumento nos produtos 6-sulfatados provenientes de condroitim sulfato (dados não mostrados).

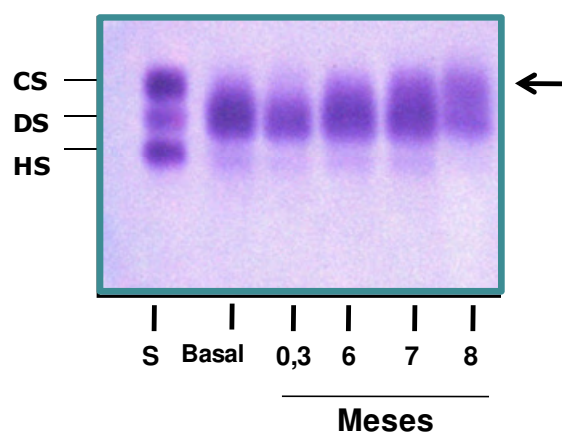


Figura 11 – **Eletroforese em gel de agarose de GAGs urinários dos oito primeiros meses de infusão da paciente A.G.M., durante a Terapia de Reposição Enzimática.** 5 μ l de amostras urinárias processadas de acordo com Métodos, foram aplicadas a eletroforese em gel de agarose. S, 5 μ l de amostra padrão de glicosaminoglicanos, CS, condroitim sulfato; DS, dermatam sulfato; HS, heparam sulfato; Basal, amostra antes do tratamento com Terapia de Reposição Enzimática.

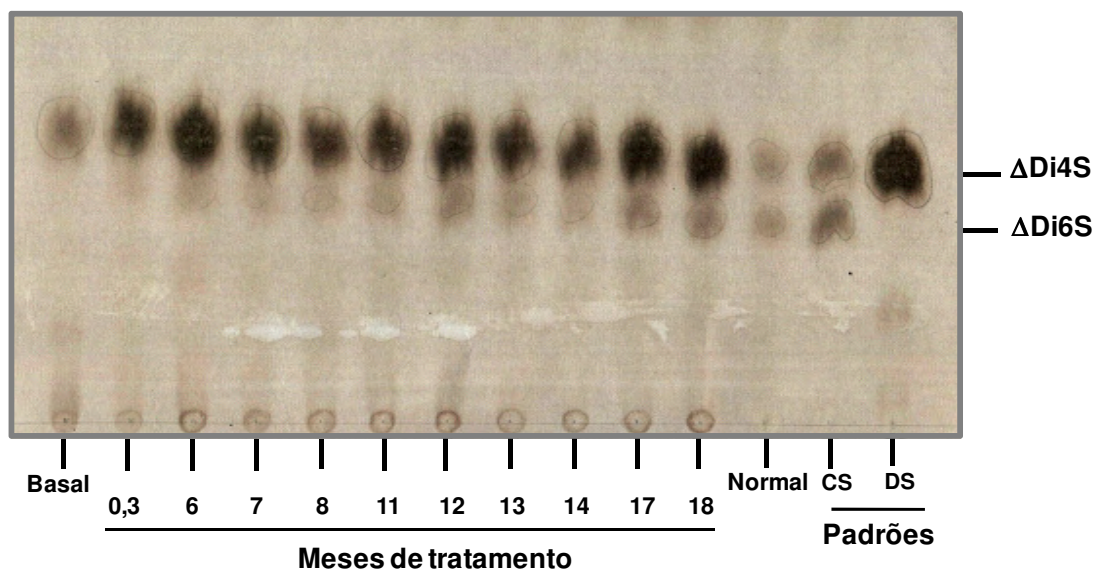


Figura 12 – **Cromatografia em papel dos produtos da condroitinase ABC sobre GAGs urinários da paciente 3, A.G.M. durante a Terapia de Reposição Enzimática.** Cerca de 40 μ g de GAGs purificados de urina como descrito em Métodos, foram incubados com condroitinase ABC e os produtos separados por cromatografia em papel e detectados por nitrato de prata alcalino. Δ Di4S, dissacarídeo-4-sulfatado; Δ Di6S, dissacarídeo-6-sulfatado; Basal, amostra antes do tratamento; Normal, GAGs de indivíduo normal; CS, condroitim sulfato; DS, dermatam sulfato.

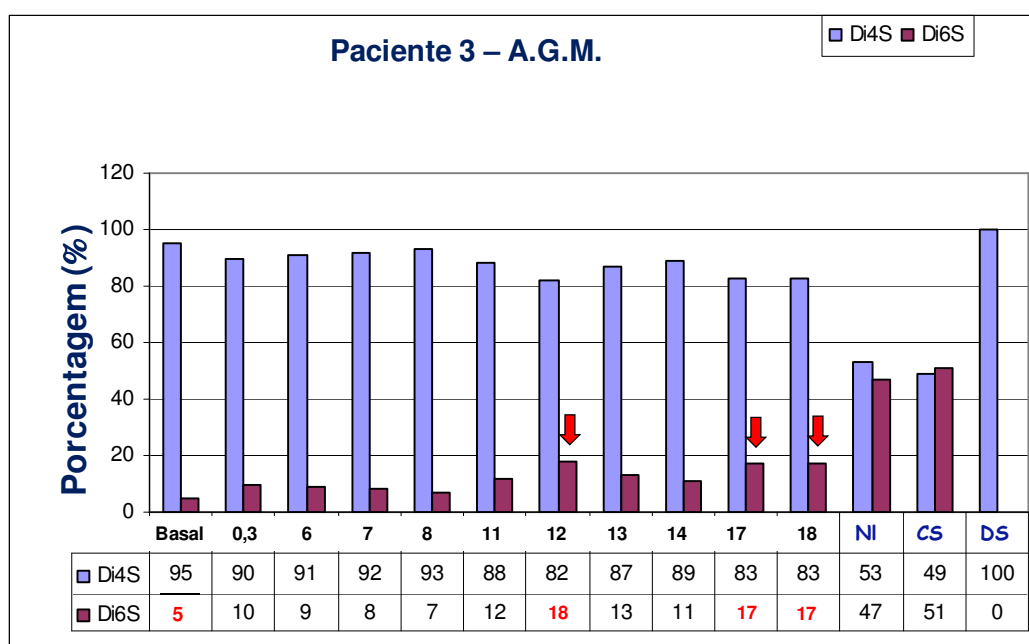


Figura 13 – **Porcentagem de dissacarídeos 4 e 6-sulfatados presentes nas diversas amostras da paciente A.G.M. durante ERT.** Os produtos mostrados na Figura 5 foram densitometrados, quantificados e comparados com o basal do paciente.

Muitas tentativas terapêuticas tem sido realizadas com o objetivo de diminuir os efeitos das doenças de acúmulo, como transfusões de plasma (Di Ferrante *et al.*, 1971; Orii *et al.*, 1974) e leucócitos (Knudson *et al.*, 1971; Nishioka *et al.*, 1979; Toma *et al.*, 1983), bem como transplante de fibroblastos (Muir *et al.*, 1976; Purkiss, 1983) e membrana amniótica (Akle *et al.*, 1985; Muenzer *et al.*, 1992; Kosuga *et al.*, 2000; Nakama *et al.*, 2006), com efeitos clínicos transitórios. Alterações clínicas mais consistentes têm sido relatadas com transplante de medula óssea (Whitley *et al.*, 1993; Vellodi *et al.*, 1997; Guffon *et al.*, 1998; Peters *et al.*, 1998). Contudo, este procedimento apresenta alto risco de mortalidade e morbidade, devido às doenças e complicações relacionadas, além da necessidade de compatibilidade entre doador e receptor. A possibilidade de utilizar enzimas recombinantes permitiu contornar estes riscos.

Embora um pequeno número de pacientes tenha sido utilizado no presente estudo, foi possível mostrar a eficácia do tratamento na redução de hepatoesplenomegalia (Figura 8) e melhoras clínicas consistentes nos pacientes.

Os resultados obtidos neste estudo foram interessantíssimos, onde o dermatam sulfato diminuiu na urina de todos os pacientes estudados e os valores não mais retornaram aos valores iniciais. Foi possível verificar que em alguns pacientes houve interrupção do tratamento, seguido de aumento imediato na

excreção de GAGs urinários. Esse efeito foi mais significativo na paciente A.G.M. É preciso salientar que essas interrupções não tiveram relação com o tratamento em si, mas foi devido a frequentes infecções respiratórias crônicas que estes pacientes apresentam, como consequência do acúmulo dos GAGs em células do sistema imune.

Notáveis foram os resultados onde condroitim sulfato foi detectado na urina da paciente A.G.M., e comprovado sua presença por degradação com condroitinase ABC, mostrando o aumento de dissacarídeo-6-sulfatado, típico de indivíduos normais. Outro fato que deve ser considerado é que esta paciente tem idade mais avançada em relação aos outros pacientes, e a forma clínica mais leve da doença.

Devido à natureza progressiva, debilitante e fatal destas doenças as tentativas terapêuticas são válidas, desde que seguras, com o objetivo de diminuir a sintomatologia e progressão da doença.

Recentemente, trabalhos na literatura tem sugerido a terapia de mucopolissacaridoses por inibição de formação do substrato (Cox *et al.*, 2005), como a genisteína, uma isoflavona que inibe a síntese de GAGs (Piotrowska *et al.*, 2006; Jakobkiewicz-Nanecka *et al.*, 2009). Esses trabalhos tem demonstrado por meio de cultivo de fibroblastos de pacientes portadores de MPS, que em presença de genisteína, ocorre uma importante redução no acúmulo de GAGs. Aparentemente, o fator de crescimento epidermal, EGF, e seu receptor são requeridos na via que leva à expressão plena das enzimas envolvidas na biossíntese dos GAGs. Estas possibilidades têm sido investigadas, uma vez que as enzimas fornecidas pela reposição de enzima recombinante não atravessam a barreira hematoencefálica. Recentemente, um estudo clínico piloto indicou que o tratamento de pacientes com MPS III A e III B com genisteína na dose de 5 mg/kg/dia resultou em melhora estatisticamente importante em todos os parâmetros testados, incluindo funções cognitivas (Piotrowska *et al.*, 2008). Porém, as consequências *in vivo* da genisteína à longo prazo podem ser desastrosas, uma vez que interfere na síntese de GAGs, compostos estes imprescindíveis a vários eventos celulares e biológicos.

A Terapia de Reposição Enzimática pode não representar a cura destas doenças porque os efeitos ainda não alcançam todos os tecidos e órgãos afetados. Contudo, ela representa hoje uma opção alternativa e segura, enquanto a terapia gênica não se encontra disponível aos seres humanos.

CONCLUSÕES

O presente estudo confirma a segurança e eficácia da Terapia de Reposição Enzimática (TRE) com alfa-L-iduronidase na dose e frequência utilizada nos três pacientes portadores de mucopolissacaridose do tipo I.

A disponibilidade desta Terapia ofereceu importantes benefícios clínicos, em especial uma significativa diminuição e melhora na hepatoesplenomegalia.

Bioquímicamente, a redução de dermatam sulfato foi muito significativa na urina dos três pacientes, comparando-se com o basal. Em destaque, enfatizamos a detecção de condroitim sulfato aumentado em um dos pacientes estudados (A.G.M.), composto este presente em grandes quantidades em indivíduos normais. Estudos com maior número de pacientes são necessários, onde é possível que a detecção deste composto possa representar um marcador de seguimento para este tipo de tratamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akle, C., McColl, I., Dean, M., Adinolfi, M., Brown, S., Fensom, A.H., Marsh, J., Welsh, K. Transplantation of amniotic epithelial membranes in patients with mucopolysaccharidoses. **Exp Clin Immunogenet.** 2(1):43-8, 1985.
- Ashton, L.J., Brooks, D.A., McCourt, P.A., Muller, V.J., Clements, P.R., Hopwood, J.J. Immunoquantification and enzyme kinetics of alpha-L-iduronidase in cultured fibroblasts from normal controls and mucopolysaccharidosis type I patients. **Am J Hum Genet.** 50(4):787-94, 1992.
- Baker, J.R., Cifonelli, J.A., Roden, L. The linkage of corneal keratin sulfate to protein. **Connect. Tissue Res.** 3(2): 149-156, 1975.
- Barton, R.W., Neufeld, E.F. The Hurler corrective factor. **J. Biol. Chem.** 246: 7773-7779, 1971.
- Beaty, N.B., Mello, R.J. Extracellular mammalian polysaccharides: glycosaminoglycans and proteoglycans. **J Chromatogr;** 418:187-222, 1987.
- Bernfield, M., Kokenyesi, R., Kato, M., Hinkes, M.T., Spring, J., Gallo, R.L., Lose, E.J. Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. **Annu Rev Cell Biol.** 8:365-93, 1992.
- Bernfield, M., Götte, M., Park, P.W., Reizes, O., Fitzgerald, M.L., Lincecum, J., Zako, M. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. **Annu Rev Biochem.** 68:729-77, 1999.
- Bianchini, P., Osima, B., Parma, B., Nader, H.B., Dietrich, C.P. Lack of correlation between "in vitro" and "in vivo" antithrombotic activity of heparin fractions and related compounds. Heparan sulfate as an antithrombotic agent "in vivo". **Thromb Res.** 1985 Dec 1;40(5):597-607.
- Bix, G., Iozzo, R.V. Novel interactions of perlecan: unraveling perlecan's role in angiogenesis. **Microsc Res Tech.** 71(5):339-48, 2008.
- Blochberger, T.C., Vergnes, J.P., Hempel, J., Hassell, JR. cDNA to chick lumican (corneal keratan sulfate proteoglycan) reveals homology to the small interstitial proteoglycan gene family and expression in muscle and intestine. **J Biol Chem.** 267(1):347-52, 1992.
- Brady, R.O., Pentchev, P.G., Gal, A.E., Hibbert, S.R., Dekaban, A.S. Replacement therapy for inherited enzyme deficiency. Use of purified glucocerebrosidase in Gaucher's disease. **N Engl J Med.** 291(19):989-93, 1974.
- Bray, B.A., Lieberman, R., Meyer, K. Structure of human skeletal keratosulfate. The linkage region. **J Biol Chem.** 242(14):3373-80, 1967.
- Brimacombe, J.S. & Weber, J.M. Mucopolysaccharides. Chemical structure, distribution and isolation. B.B.A. Library, **Elsevier Publishing Company, New York**, pg 1-181, 1964.
- Carney, S.L. & Muir, H. The structure and function of cartilage proteoglycans. **Physiol. Rev.** 68(3): 858-910, 1988.

- Cássaro, C.M., Dietrich, C.P. Distribution of sulfated mucopolysaccharides in invertebrates. **J Biol Chem.** 252(7):2254-61, 1977.
- Chamoles, N.A., Blanco, M.B., Gaggioli, D., Casentini, C. Hurler-like phenotype: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. **Clinical Chemistry** 47(12): 2098-2102, 2001.
- Chung, S., Ma, Xiucui, Liu, Y., Lee, D., Tittiger, M., Ponder, K.P. Effect of neonatal administration of a retroviral vector expressing α -L-iduronidase upon lysosomal storage in brain and other organs in mucopolysaccharidosis I mice. **Mol. Genetics Metabolism** 90(2): 181-192, 2007.
- Cifonelli, J.A., Dorfman, A. Properties of heparin monosulfate (heparitin monosulfate). **J Biol Chem.** 235:3283-6, 1960.
- Clarke, L.A., Nelson, P.V., Warrington, C.L., Morris, C.P., Hopwood, J.J., Scott, H.S. Mutation analysis of 19 North American mucopolysaccharidosis type I patients: identification of two additional frequent mutations. *Hum Mutat.* 1994;3(3):275-82.
- Cleary, M.A., Wraith, J.E. The presenting features of mucopolysaccharidosis type IH (Hurler syndrome). **Acta Paediatr.** 84(3):337-9, 1995.
- Clowes, A.W., Karnovsky, M.J. Failure of certain antiplatelet drugs to affect myointimal thickening following arterial endothelial injury in the rat. **Lab Invest.** 36(4):452-64, 1977.
- Couchman, J.R. & Woods, A. Structure and biology of pericellular proteoglycans. In: Roberts, D.D. & Mecham, R.P. – Cell Surface and Extracellular Glycoconjugates. San Diego, Academic Press, 1993. P. 33-82.
- Cox, T., Lachmann R., Hollak, C., Aerts J., van Weely, S., Hrebíček, M., Platt, F., Butters, T., Dwek, R., Moyses, C., Gow, I., Elstein, D., Zimran, A. Novel oral treatment of Gaucher's disease with N-butyldeoxynojirimycin (OGT 918) to decrease substrate biosynthesis. **Lancet** 355(9214): 1481-1485, 2000.
- Cox, T.M. Substrate reduction therapy for lysosomal storage diseases. **Acta Paediatrica** 94(447): 69-75, 2005.
- Cruz, W.O., Dietrich, C.P. Antihemostatic effect of heparin counteracted by adenosine triphosphate. **Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.** 126: 420-426, 1967.
- De Duve, C., Pressman, B.C., Gianetto, R., Wattiaux, R., Appelmans, F. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. **Biochem J.** 60(4):604-17, 1955.
- De Duve, C. The role of lysosomes in the pathogeny of disease. **Scand J Rheumatol** 12:63-6, 1975.
- De Duve, C. Lysosomes revisited. **Eur J Biochem.** 137(3):391-7, 1983.
- De Duve, C., Wattiaux, R. Functions of lysosomes. **Ann. Rev. Physiol.** 28: 435-492, 1966.
- Desnick, R. J. Enzyme replacement and enhancement therapies for lysosomal diseases. **J. Inherit. Metab. Dis.** 27: 385-410, 2004.

- Dietrich, C.P. Novel heparin degradation products. Isolation and characterization of novel disaccharides and oligosaccharides produced from heparin by bacterial degradation. **Biochem. J.** 108: 647-654, 1968.
- Dietrich, C.P. Enzymatic degradation of heparin. A glycosaminidase and glycuronidase from *Flavobacterium heparinum*. **Biochemistry** 8: 2089-2094, 1969.
- Dietrich C.P. A model for cell-cell recognition and control of cell growth mediated by sulfated glycosaminoglycans. **Braz J Med Biol Res.** 17(1):5-15, 1984.
- Dietrich, C.P. & Dietrich, S.M.C. Electrophoretic behavior of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. **Anal. Biochem.** 70: 645-647, 1976.
- Dietrich, C.P., Armelin, H.A. Sulfated mucopolysaccharides from normal Swiss 3T3 cell line and its tumorigenic mutant ST1: possible role of chondroitin sulfates in neoplastic transformation. **Biochem Biophys Res Commun.** 84(3):794-801, 1978.
- Dietrich, C.P., Montes de Oca, H. Surface sulfated mucopolysaccharides of primary and permanent mammalian cell lines. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 80: 805-812, 1978.
- Dietrich, C.P., Nader, H.B., Brito, L.R.G. & Silva, M.E. Chemical composition of heparitin sulfate: Fractionation and characterization of four acidic mucopolysaccharides in heparitin sulfate from beef lung tissue **Biochim. Biophys. Acta** 237: 430, 1971.
- Dietrich, C.P., Nader, H.B. Fractionation and properties of four heparitin sulfates from beef lung tissue. Isolation and partial characterization of a homogeneous species of heparitin sulfate. **Biochim Biophys Acta.** 343(1):34-44, 1974.
- Dietrich, C.P., Nader, H.B., Straus, A.H. Structural differences of heparan sulfates according to the tissue and species of origin. **Biochem Biophys Res Commun.** 111(3):865-71, 1983.
- Dietrich, C.P., Sampaio, L.O., Montes de Oca, H., Nader, H.B. Role of sulfated mucopolysaccharides in cell recognition and neoplastic transformation. **An. Acad. Brasil. Ciênc.** 52: 179-186, 1980.
- Dietrich, C.P., Armelin, H.A., Nogueira, Y.L., Nader, H.B., Michelacci, Y.M. Turnover, change composition with the rate of cell growth and effect of phenylxyloside on synthesis and structure of cell surface glycosaminoglycans of normal and transformed cells. **Biochim. Biophys. Acta** 717: 387-397, 1982.
- Dietrich, C.P. A model for cell-cell recognition and control of cell growth mediated by sulfated glycosaminoglycan. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 17: 5-15, 1984.
- Dietrich, C.P., Tersariol, I.L.S., Toma, L., Moraes, C.T., Porcionatto, M.A., Oliveira, F.W., Nader, H.B. Sequencing of heparan sulfate: identification of variable and constant oligosaccharide regions in eight heparan sulfates from different origins. **Cell Mol. Biol.** 44: 417-429, 1998.
- Di Ferrante, N., Nichols, B. L., Donnelly, P. V., Neri, G., Hrgovcic, R., Berglund, R. K. Induced degradation of glycosaminoglycans in Hurler's and Hunter's syndromes by plasma infusion. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 68: 303-307, 1971.

- Dodgson, K.S. & Lloyd, A.G. Sulfatases. XVIII. Preparation of chondroitinase-free chondrosulfatase from extracts of *Proteus vulgaris*. **Biochem. J.** 66: 532-538, 1957.
- Domenico, C.D., Napoli, D.D., Reyero, E.G., Lombardo, A., Naldini, L., Natale, P.D. Limited transgene immune response and long-term expression of human α -L-iduronidase in young adult mice with mucopolysaccharidosis type I by liver-directed gene therapy. **Human Gene Therapy** 17: 1112-1121, 2006.
- Esko, J.D. Genetic analysis of proteoglycan structure, function and metabolism. **Curr Opin Cell Biol.** 3(5):805-16, 1991.
- Esko, J.D., Selleck, S.B. Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate. **Annu. Rev. Biochem.** 71: 435-471, 2002.
- Ferreira, T.M.P.C., Medeiros, M.G.L., Dietrich, C.P., Nader, H.B. Structure of heparan sulfate from the water mollusk *Anomantidae* sp: sequencing of its disaccharide units. **Int. J. Biochem.** 24: 1219-1225, 1993.
- Folkman, J., Shing, Y. Control of angiogenesis by heparin and other sulfated polysaccharides. **Adv. Exp. Med. Biol.** 313: 355-364, 1992.
- Fransson, L.A., Malmström, A. Structure of pig skin dermatan sulfate. 1. Distribution of D-glucuronic acid residues. **Eur J Biochem.** 18(3):422-30, 1971.
- Fransson, L.A., Cöster, L., Malmström, A., Sheehan, J.K. Self-association of scleral proteodermatan sulfate. Evidence for interaction via the dermatan sulfate side chains. **J Biol Chem.** 257(11):6333-8, 1982.
- Fratantoni, J.C., Hall, C.W., Neufeld, E.F. The defect in Hurler's and Hunter's syndromes: faulty degradation of mucopolysaccharides. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** 60: 699-706, 1968a.
- Fratantoni, J.C., Hall, C.W., Neufeld, E.F. Hurler and Hunter syndromes: mutual correction of the defect in cultured fibroblasts. **Science** 162:570-572, 1968b.
- Fuller, M., Meikle, P.J., Hopwood, J.J. Glycosaminoglycans degradation fragments in mucopolysaccharidosis I. **Glycobiology** 14(5): 443-450, 2004.
- Gallagher, J.T. The extent family of proteoglycans: social residents of the pericellular zone. **Current Opin. Cell Biol.** 1: 1201-1218, 1989.
- Glaser, J.H. & Conrad, H.E. Chondroitin sulfate catabolism in chick embryo chondrocytes. **J. Biol. Chem.** 254: 2316-2325, 1979.
- Gomes, P.B., Dietrich, C.P. Distribution of heparin and other sulfated glycosaminoglycans in vertebrates. **Comp Biochem Physiol B.** 73(4):857-863, 1982.
- Guffon, N., Souillet, G., Maire, I., Straczek, J., Guibaud, P. Follow-up of nine patients with Hurler syndrome after bone marrow transplantation. **J. Pediatr.** 133: 119-125, 1998.
- Hardingham, T.E. & Fosang, A.J. Proteoglycans: many forms and many functions. **FASEB J.** 6: 861-870, 1992.

- Harmatz, P., Giugliani, R., Schwartz, J., Guffon, N., Teles, E.L., Miranda, M.C.S., Wraith, J.E., Beck, M., Arash, L., Scarpa, M., Yu, Z., Wittes, J., Berger, K.I., Newman, M.S., Lowe, A.M., Kakkis, E., Swiedler, S.J. Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis VI: a phase 3, randomized, double-blind, placebo-controlled, multinational study of recombinant human N-acetylgalactosamine 4-sulfatase (recombinant human arylsulfatase B or RHASB) and follow-on, open-label extension study. **J. Pediatr.** 148: 533-539, 2006.
- Hartung, S.D., Frandsen, J.L., Pan, D., Koniar, B.L., Graupman, P., Gunther, R., Low, W.C., Whitley, C.B., McIvor, R.S. Correction of metabolic, craniofacial, and neurologic abnormalities in MPS I mice treated at birth with adeno-associated virus vector transducing the human α -L-iduronidase gene. **Molecular Therapy** 9(6): 866-875, 2004.
- Hatae, Y.; Atsuta, T. & Makita, A. Glycosaminoglycans in human lung carcinoma. **Gann.** 68: 59-63, 1997.
- Hinek A, Wilson SE. Impaired elastogenesis in Hurler disease: dermatan sulfate accumulation linked to deficiency in elastin-binding protein and elastic fiber assembly. **Am. J. Pathol.**;156:925-38, 2000.
- Hiyama K, Okada S. Crystallization and some properties of chondroitinase from *Arthrobacter aurescens*. **J Biol Chem.** 250(5):1824-8, 1975.
- Iozzo RV. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. **Annu Rev Biochem.** 67:609-52, 1998.
- Jaques, L.B. The pharmacology of heparin and heparinoids. **Prog. Med. Chem.** 5: 139-198, 1967.
- Jaques, L.B., Ballieux, R.E., Dietrich, C.P., Kavanagh, L.W. A microelectrophoresis method for heparin. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** 46: 351-360, 1968.
- Jakobkiewicz-Baneka, J., Piotrowska, E., Narajczyk, M., Baranska, S., Wegrzyn, G. Genistein-mediated inhibition of glycosaminoglycan synthesis, which corrects storage in cells of patients suffering from mucopolysaccharidoses, acts by influencing an epidermal growth factor-dependent pathway. **Journal of Biomedical Science** 16(26): 1-9, 2009.
- Jeanloz, R.W. The nomenclature of mucopolysaccharides. **Arthritis Rheum.** 3: 233-237, 1960.
- Ji, Z.S., Dichek, H.L., Miranda, R.D., Mahley, R.W. Heparan sulfate proteoglycans participate in hepatic lipase and apolipoprotein E-mediated binding and uptake of plasma lipoproteins, including high density lipoproteins. **J. Biol. Chem.** 272(50): 31285-31292, 1997.
- Jorpes, J.E. Heparin, its chemistry, pharmacology and clinical use. **Am. J. Med.** 33: 692-702, 1962.
- Kakavanos, R., Turner, C.T., Hopwood, J.J., Kakkis, E.D., Brooks, D.A. Immune tolerance after long-term enzyme replacement therapy among patients who have mucopolysaccharidosis I. **The Lancet** 361: 1608-1613, 2003.
- Kakkis, E.D., Jonas, A.J.; Shull, R.M.; Mishu, L.; Neufeld, E.F. Treatment of canine MPS I using recombinant α -L-iduronidase. **Am. J. Hum. Genet.** 53:, 1993.

- Kakkis, E.D., Matynia, A., Jonas, A.J., Neufeld, E.F. Overexpression of the human lysosomal enzyme α -L-iduronidase in Chinese Hamster ovary cells. **Protein Expression and Purification** 5: 225-232, 1994.
- Kakkis, E.D., McEntee, M.F., Schmidtchen, A., Neufeld, E.F., Ward, D.A., Gompf, R.E., Kania, S., Bedolla, C., Chien, S., Shull, R.M. Long-Term and high-dose trials of enzyme replacement therapy in the canine model of mucopolysaccharidosis I. **Biochem. Mol. Med.** 58:156-167, 1996.
- Kakkis, E.D., Muenzer, J., Tiller, G.E., Waber, L., Belmont, J., Passage, M., Izykowski, B., Phillips, J., Doroshow, R., Walot, I., Hoft, R., Neufeld, E.F. Enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis I. **N. Engl. J. Med.** 344(3): 182-188, 2001.
- Kakkis, E.D., McEntee, M., Vogler, C., LE, S., Levy, B., Belichenko, P., Mobley, W., Dickson, P., Hanson, S., Passage, M. Intratecal enzyme replacement therapy reduces lysosomal storage in the brain and meninges of the canine model of MPS I. **Mol. Genetics and Metabol.** 83: 163-174, 2004.
- King, B., Savas, P., Fuller, M., Hopwood, J., Hemsley, K. Validation of a heparan sulfate-derived disaccharide as a marker of accumulation in murine mucopolysaccharidosis type IIIA. **Mol. Genet. Metab.** 87(2): 107-112, 2006.
- Kjellén, L., Lindahl, U. Proteoglycans: structures and interactions. **Annu Rev Biochem.** 60:443-75, 1991.
- Knudson, A.G.Jr, Di Ferrante, N. & Curtis, J.E. Effect of leukocyte transfusion in a child with type II mucopolysaccharidosis. **Proc. Natl. Acad Sci, USA**, 68: 1738-1741, 1971.
- Kobayashi, H., Carbonaro, D., Pepper, K., Petersen, D., Ge, S., Jackson, H., Shimada, H., Moals, R., Kohn, D.B. Neonatal gene therapy of MPS I mice by intravenous injection of a lentiviral vector. **Mol. Ther.** 11(5): 776-789, 2005.
- Kosuga, M., Takahashi, S., Sasaki, K., Enosawa, S., Li, X.K., Okuyama, S., Fujino, M., Suzuki, S., Yamada, M., Matsuo, N., Sakuragawa, N., Okuyama, T. Phenotype correction in murine mucopolysaccharidosis type VII by transplantation of human amniotic epithelial cells after adenovirus-mediated gene transfer. **Cell Transplant.** 9(5):687-92, 2000.
- Kraemer, P.M. Heparan sulfates of cultures cells II. Acid-soluble and -precipitable species of different cell lines. **Biochemistry** 10: 1445-1451, 1971.
- Laurent, T.C., Fraser, J.R. The properties and turnover of hyaluronan. **Ciba Found Symp.** 124:9-29, 1986.
- Lindahl, U., Höök, M. Glycosaminoglycans and their binding to biological macromolecules. **Annu Rev Biochem.** 47:385-417, 1978.
- Lindahl, U., Kusche-Gullberg, M., Kjellén, L. Regulated diversity of heparan sulfate. **J Biol Chem.** 273(39):24979-82, 1998.
- Linhardt, R.J. & Hileman, R.E. Dermatan sulfate as a potential therapeutic agent. **Gen. Pharmacol.** 26(3): 443-451, 1995.

- Lohmander LS, De Luca S, Nilsson B, Hascall VC, Caputo CB, Kimura JH, Heinegard D. Oligosaccharides on proteoglycans from the swarm rat chondrosarcoma. **J Biol Chem.** 255(13):6084-91, 1980.
- Lopes, C.C., Toma, L., Pinhal, M.A., Porcionatto, M.A., Sogayar, M.C., Dietrich, C.P., Nader, H.B. EJ-ras oncogene transfection of endothelial cells upregulates the expression of syndecan-4 and downregulates heparan sulfate sulfotransferases and epimerase. **Biochimie.** 88(10):1493-504, 2006.
- Lowry, R.B., Renwick, D.H. Relative frequency of the Hurler and Hunter syndromes. **N Engl J Med.** 284(4):221-2, 1971.
- Martins AM, Dualibi AP, Norato D, Takata ET, Santos ES, Valadares ER, Porta G, de Luca G, Moreira G, Pimentel H, Coelho J, Brum JM, Semionato Filho J, Kerstenetzky MS, Guimarães MR, Rojas MV, Aranda PC, Pires RF, Faria RG, Mota RM, Matte U, Guedes ZC. Guidelines for the management of mucopolysaccharidosis type I. **J Pediatr.** 155(4):S32-46, 2009.
- Mathews, M. B. Connective tissue: Macromolecular structure and evolution. **V.19, New York, Springer-Verlag,** 320 p., 1975.
- Matsuda, J., Suzuki, O., Oshima, A., Yamamoto, Y., Noguchi, A., Takimoto, K., Itoh, M., Matsuzaki, Y., Yasuda, Y., Ogawa, S., Sakata, Y., Nanba, E., Higaki, K., Ogawa, Y., Tominaga, L., Kousaku, O., Iwasaki, H., Watanabe, H., Brady, R.O., Suzuki, Y. Chemical chaperone therapy for brain pathology in GM1-gangliosidosis. **Proc.Nat. Acad. Sc.** 100(26): 15912-15917, 2003.
- McKusick, V.A. Heritable disorders of connective tissue, 4th ed., pp. 521-686, St Louis, Mosby, 1972.
- Meikle, P.J., Hopwood, J.J., Clague, A.E., Carey, W.F. Prevalence of lysosomal storage disorders. **JAMA,** 281:249-254, 1999.
- Meyer, K. The chemistry and biology of mucopolysaccharides and glycoproteins. **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.** 6: 91-102, 1938.
- Meyer, K. Biochemistry and biology of mucopolysaccharides. **Amer. J. Med.** 47: 664 – 672, 1969.
- Michelacci, Y.M. & Dietrich, C.P. The structure of chondroitin sulfates. **Biochem. Biophys. Acta.** 451: 436, 1976.
- Michelacci, Y.M.; Mourão, P.A.S.; Laredo, J. & Dietrich, C.P. Chondroitin sulfates and proteoglycans from normal and arthrotic human cartilage. **Connect. Tiss. Res.** 7: 29-36, 1979.
- Michelacci, Y.M., Laredo, J., Dietrich, C.P. Proteoglycans and chondroitin sulfates from human multiple chondroma (enchondromatosis). **Braz. J. Med. Biol. Res.** 14(2-3): 161-172, 1981.
- Michelacci, Y.M. & Dietrich, C.P.. Structure of chondroitin sulfate from whale cartilage. Distribution of 6- and 4-sulfated oligosaccharides in the polymer chain. **Int. J. Biol. Macromol.** 8: 108, 1986.
- Michelacci, Y.M. & Horton, D.S.P.Q. Proteoglycans from the cartilage of young hammerhead shark *Sphyrna lewini*. **Comp. Biochem. Physiol.** 92B: 651-658, 1989.

- Mourão, P.A.S. & Dietrich, C.P. Chondroitin sulfates of the epiphyseal cartilages of different mammals. **Comp. Biochem. Physiol.** **62B**: 115, 1973.
- Mourão, P.A.S., Michelacci, Y.M., Toledo, O.M.S. Glycosaminoglycans and proteoglycans of normal and tumoral cartilages of humans and rats. **Cancer Res.** 39(1): 2802-2806, 1979.
- Mourão, P.A.S.; Rozenfeld, S.; Laredo, J. & Dietrich, C. P. The distribution of chondroitin sulfates in articular and growth cartilages of human bones. **Biochem. Biophys. Acta** **428**: 19-26, 1976.
- Muenzer, J. The mucopolysaccharidoses: a heterogeneous group of disorders with variable pediatric presentations. **J. Pediatr.** 144(5): 27-34, 2004.
- Muir, H., Benson, M.F., Button, L.R., Boylston, A., Mowbray, J. Enzyme replacement therapy by fibroblast transplantation in a case of Hunter syndrome. **Nature** 261: 323, 1976.
- Muir, H. & Hardingham, T.E. Structure of proteoglycans. In: WHELAN, W.J. - Biochemistry of carbohydrates. Biochemistry, series one - MTP **International Review of Science vol 5. Ed. Baltimore, University Park Press**, p. 153-222, 1975.
- Muenzer, J., Neufeld, E.F., Constantopoulos, G., Caruso, R.C., Kaiser-Kupfer, M.I., Pikus, A., Danoff, J., Berry, R.R., McDonald, H.D., Thompson, J.N. Attempted enzyme replacement using human amnion membrane implantations in mucopolysaccharidoses. **J Inherit Metab Dis.** 15(1):25-37, 1992.
- Mulloy, B., Rider, C.C. Cytokines and proteoglycans: an introductory overview. **Biochem Soc Trans.** 34(3):409-13, 2006.
- Mythreya, K., Blobel, G.C. Proteoglycan signaling co-receptors: roles in cell adhesion, migration and invasion. **Cell Signal.** 21(11):1548-58, 2009.
- Nader, H.B. Characterization of a heparan sulfate and a peculiar chondroitin 4-sulfate proteoglycan from platelets. Inhibition of the aggregation process by platelet chondroitin sulfate proteoglycan. **J Biol Chem.** 266(16):10518-23, 1991.
- Nader, H.B., Ferreira, T.M.P.C., Paiva, J.F., Medeiros, M.G.L., Jerônimo, S.M.B., Paiva, V.M.P., Dietrich, C.P. Isolation and structural studies of heparan sulfates and chondroitin sulfates from three different species of mollusks. **J. Biol. Chem.** 259: 1431-1435, 1984.
- Nader, H.B., Dietrich, C.P., Buonassisi, V., Colburn, P. Heparin sequences in heparan sulfate chain of an endothelial cell proteoglycan. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 84: 3565-3569, 1987.
- Nader, H.B., Ferreira, T.M., Toma, L., Chavante, S.F., Dietrich, C.P., Casu, B., Torri, G. Maintenance of heparan sulfate structure throughout evolution: chemical and enzymic degradation, and ¹³C-n.m.r.-spectral evidence. **Carbohydr Res.** 184:292-300, 1988.
- Nader, H.B., Buonassisi, V., Colburn, P., Dietrich, C.P. Heparin stimulates the synthesis and modifies the sulfation pattern of heparan sulfate proteoglycan from endothelial cells. **J. Cell Physiol.** 140(2): 305-310, 1989.

- Nader, H.B. & Dietrich, C.P. Natural occurrence and possible biological role of heparin. In: Lane, D.A. & Lindahl, U. – Heparin. Chemical and biological properties, clinical applications. London, Edward Arnold, 1989, p. 81-96.
- Nader, H.B., Porcionatto, M.A., Tersariol, I.L.S., Pinhal, M.A.S., Oliveira, F.W., Moraes, C.T., Dietrich, C.P. Purification and substrate specificity of heparitinase I and heparitinase II from *Flavobacterium heparinum*. Analyses of the heparin and heparan sulfate degradation products by ¹³C NMR spectroscopy. **J. Biol. Chem.** 265(28): 16807-16813, 1990.
- Nader, H.B., Medeiros, M.G.L., Sousa-Filho, J.F., Ferreira, T.M.P.C., Dietrich, C.P. The mode of action of sulfated glycosaminoglycans degrading enzymes in bacteria, invertebrates and vertebrates. **Ciência e Cultura** 45(1): 62-65, 1993.
- Nader, H.B., Lopes, C.C., Rocha, H.A., Santos, E.A., Dietrich, C.P. Heparins and heparinoids: occurrence, structure and mechanism of antithrombotic and hemorrhagic activities. **Curr Pharm Des.** 10(9):951-66,2004.
- Nakama, H., Ohsugi, K., Otsuki, T., Date, I., Kosuga, M., Okuyama, T., Sakuragawa, N. Encapsulation cell therapy for mucopolysaccharidosis type VII using genetically engineered immortalized human amniotic epithelial cells. **Tohoku J Exp Med.** 209(1):23-32, 2006.
- Neufeld, E.F. The biochemical basis for mucopolysaccharidosis and mucopolipidoses. In: Arthur G. Steinberg, Alexander G. Bearn, eds. Progress in Medical Genetics 10: 81-101, 1974.
- Neufeld, E. F., Muenzer, J. The mucopolysaccharidosis. In: SCRIVER, C. R., BEAUDET, A. L., SLY, W. S., Valle, D.(eds). The metabolic and molecular bases of inherited disease. New York: McGraw Hill; 2001. p. 3421-52.
- Nilsson, B., De Luca, S., Lohmander, S., Hascall, V.C. Structures of N-linked and O-linked oligosaccharides on proteoglycans monomer isolated from the Swarm rat chondrosarcoma. **J. Biol. Chem.** 257(18): 10920-10927, 1982.
- Nishioka J., Mizushima T., Ono K. Treatment of mucopolysaccharidosis: clinical and biochemical aspects of leucocyte transfusion as compared with plasma infusion in patients with Hurler's and Scheie's syndromes. **Clin Orthop Relat Res.** 140:194-203, 1979.
- Orii, T., Yamaguchi, M., Minami, R., Ito, H., Nakao, T. Influence of fresh plasma infusions on patients with genetic mucopolysaccharidosis. **Tohoku J Exp Med.** 114(4):385-92,1974.
- Pangrazzi, J., Gianese, F. Dermatan sulfate as a potential antithrombotic drug **Haematologica.** 72(5):459-64, 1987.
- Peters, C., Shapiro, E.G., Anderson, J., Henslee-Downey, P.J., Klemperer, M.R., Cowan, M.J., Saunders, E.F., deAlarcon, P.A., Twist, C., Nachman, J.B., Hale, G.A., Harris, R.E., Rozans, M.K., Kurtzberg, J., Grayson, G.H., Williams, T.E., Lenarsky, C., Wagner, J.E., Krivit, W. Hurler syndrome II: outcome of HLA-genotypically identical sibling and HLA-haploidentical related donor bone marrow transplantation in fifty-four children: the Storage Disease Collaborative Study Group. **Blood** 91: 2601-2608, 1998.

- Pinhal, M.A., Walenga, J.M., Jeske, W., Hoppensteadt, D., Dietrich, C.P., Fareed, J., Nader, H.B. Antithrombotic agents stimulate the synthesis and modify the sulfation pattern of a heparan sulfate proteoglycan from endothelial cells. **Thromb Res.** 74(2):143-53, 1994.
- Piotrowska, E., Jakóbkiewicz-Banecka, J., Baranska, S., Tylki-Szymanska, A., Czartoryska, B., Wegrzyn, A., Wegrzyn, G. Genistein-mediated inhibition of glycosaminoglycan synthesis as a basis for gene expression-targeted isoflavone therapy for mucopolysaccharidoses. **European Journal of Human Genetics** 14: 846-852, 2006.
- Piotrowska, E., Jakóbkiewicz-Banecka, J., Tylki-Szymanska, A., Liberek, A., Maryniak, A., Malinowska, M., Czartoryska, B., Puk, E., Kloska, A., Liberek, T., Baranska, S., Wegrzyn, A., Wegrzyn, G. Genistin-rich isoflavone extract in substrate reduction therapy for Sanfilippo syndrome: an open-label, pilot study in 10 pediatric patients. **Curr. Ther. Res. Clin. Exp.** 69: 166-179, 2008.
- Población, C.A., Michelacci, Y.M. Structural differences of dermatan sulfates from different origins. *Carbohydr. Res.* 147(1):87-100, 1986.
- Poole C. Surgical treatment of lead poisoning in a mute swan (Cygnus olor). **Vet Rec.** 119(20):501-2, 1986.
- Porcionatto, M.A., Moreira, C.R., Lotfi, C.F., Armelin, H.A., Dietrich, C.P., Nader, H.B. Stimulation of heparan sulfate proteoglycan synthesis and secretion during G1 phase induced by growth factors and PMA. **J Cell Biochem.** 70(4):563-72, 1998.
- Porcionatto, M.A., Nader, H.B. & Dietrich, C.P. Heparan sulfate and cell division. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 32: 539-544, 1999.
- Prydz K, Dalen KT. Synthesis and sorting of proteoglycans. **J. Cell Sci.** 113(2):193-205, 2000.
- Purkiss, P., Gibbs, D.A., & Watts, R.W.E. Studies on the composition of urinary glycosaminoglycans and oligosaccharides in patients with mucopolysaccharidoses who were receiving fibroblast transplants. **Clin. Chim. Acta** 131(1-2): 109-121, 1983.
- Ragazzi, M., Ferro, D.R., Perly, B., Sinaÿ, P., Petitou, M., Choay, J. Conformation of the pentasaccharide corresponding to the binding site of heparin for antithrombin III. **Carbohydr Res.** 195(2):169-85, 1990.
- Rosenberg, R.D., Damus, P.S. The purification and mechanism of action of human antithrombin-heparin cofactor. **J. Biol. Chem.** 248(18): 6490-6505, 1973.
- Rosett W, Hodges GR. Antimicrobial activity of heparin. **J Clin Microbiol.** 1980 Jan;11(1):30-4.
- Sampaio, L.O., Dietrich, C.P., Giannotti Filho, O. Changes in the sulfated mucopolysaccharide composition in mammalian tissue during growth and in cancer tissue. **Biochim. Biophys. Acta** 498:123-131, 1977.
- Scott, J.E., Haigh, M. Small-proteoglycan:collagen interactions: keratan sulphate proteoglycan associates with rabbit corneal collagen fibrils at the 'a' and 'c' bands. **Biosci Rep.** 5(9):765-74, 1985.

- Scott, H. S., Bunge, S., Gal, A., Clarke, L. A., Morris, C. P., Hopwood, J. J. Molecular genetics of mucopolysaccharidosis type I: diagnostic, clinical and biological implications. **Hum. Mutat.**, 6 (4) 203-302, 1995
- Shatton, J. & Schubert, M. Isolation of a mucoprotein from cartilage. **J. Biol. Chem.** **211**: 565-573, 1954.
- Silva, M., Dietrich, C.P., Nader, H.B. On the structure of heparitin sulfates. Analysis of the products formed from heparitin sulfates by two heparitinases and a heparinase from *Flavobacterium heparinum*. **Biochim Biophys Acta** 437(1): 129-141, 1976.
- Sorensen, H.P., Vivès, R.R., Manetopoulos, C., Albrechtsen, R., Lydolph, M.C., Jacobsen, J., Couchman, J.R., Wewer, U.M. Heparan sulfate regulates ADAM 12 through a molecular switch mechanism. **J. Biol. Chem.** 283(46): 31920-31932, 2008.
- Stevens, R.L., Kamada, M.M., Serafin, W.E. Structure and function of the family of proteoglycans that reside in the secretory granules of natural killer cells and other effector cells of the immune response. **Curr Top Microbiol Immunol.** 140:93-108, 1989.
- Taylor, R.L., Shively, J.E., Conrad, H.E., Cifonelli, J.A. Uronic acid composition of heparins and heparan sulfates. **Biochemistry** 12(19):3633-7, 1973.
- Tersariol, I.L.S., Ferreira, T.M.P.C., Medeiros, M.G.L., Porcionatto, M.A., Moraes, C.T., Abreu, L.R.D., Nader, H.B., Dietrich, C.P. Sequencing of heparan sulfate proteoglycans: identification of variable and constant oligosaccharide regions in eight heparan sulfate proteoglycans of different origins. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 27: 2097-2102, 1994.
- Toledo, O.M.S. & Dietrich, C.P. Tissue specific distribution of sulfated mucopolysaccharides in mammals. **Biochim. Biophys. Acta** **498**: 114-122, 1977.
- Toma, L., Pinto Jr., W., Nader, H.B., Dietrich, C.P. Clinical and biochemical changes in a child with type I mucopolysaccharidosis during long-term transfusion of leukocytes. **Brazilian J. Med. Biol. Res.** 16: 29-33, 1983.
- Toma, L., Dietrich, C.P., Nader, H.B. Differences in the nonreducing ends of heparan sulfates excreted by patients with mucopolysaccharidoses revealed by bacterial heparitinases: a new tool for structural studies and differential diagnosis of Sanfilippo's and Hunter's syndromes. **Lab. Inv.** 75(6): 771-781, 1996.
- Trevelyan, W.E., Procter, D.P., & Harrison, J.S. Detection of sugar on paper chromatograms. **Nature** 166: 444-445, 1950.
- Trowbridge, J.M., Gallo, R.L. Dermatan sulfate: new functions from an old glycosaminoglycan. **Glycobiology.** 12(9):117R-25R, 2002.
- Turnbull, J.E., Gallagher, J.T. Molecular organization of heparan sulphate from human skin fibroblasts. **Biochem J.** 265(3):715-24, 1990.
- Vaheri, A. Heparin and related polyionic substances as virus inhibitors. **Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica** 115(5): 565-570, 2007.

- Vellodi, A., Young, E.P., Cooper, A., Wraith, J.E., Winchester, B., Meaney, C., Ramaswami, U., Will, A. Bone marrow transplantation for mucopolysaccharidosis type I: experience of two British centres. **Arch. Dis. Child.** 76: 92-96, 1997.
- Watson, G., Bastacky, J., Belichenko, P., Buddhikot, M., Jungles, S., Vellard, M., Mobley, W.C., Kakkis, E.D. Intrathecal administration of AAV vectors for the treatment of lysosomal storage in the brains of MPS I mice. **Gene Therapy** 13: 917-925, 2006.
- Whitley, C.B., Belani, K.G., Chang, P.N., Summers, C.G., Blazar, B.R., Tsai, M.Y., Latchaw, R.E., Ramsay, N.K., Kersey, J.H. Long-term outcome of Hurler syndrome following bone marrow transplantation. **Am. J. Med. Genet.** 46: 209-218, 1993.
- Wegrzyn, G., Wegrzyn, A., Tytki-Szymańska, A. A general model for genetic regulation of turnover of glycosaminoglycans suggests a possible procedure for prediction of severity and clinical progress of mucopolysaccharidoses. **Med Hypotheses.** 62(6):986-92, 2004.
- Westergren-Thorsson, G., Persson, S., Isaksson, A., Onnervik, P.O., Malmström, A., Fransson, L.A. L-iduronate-rich glycosaminoglycans inhibit growth of normal fibroblasts independently of serum or added growth factors. **Exp. Cell Res.** 206(1):93-9, 1993.
- Wraith, J.E., Clarke, L.A., Beck, M., Kolodny, E.H., Pastores, G.M., Muenzer, J., Rapoport, D.M., Berger, K.I., Swiedler, S.J., Kakkis, E.D., Braakman, T., Chadbourne, E., Walton-Bowen, K., Cox, G.F. Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis I: a randomized, double-blinded, placebo-controlled, multinational study of recombinant human α -L-iduronidase (Laronidase). **J. Pediatric.** 144: 581-588, 2004.
- Yamada, S., Yamane, Y., Tsuda, H., Yoshida, K., Sugahara, K. A major common trisulfated hexasaccharide core sequence, hexuronic acid(2-sulfate)-glucosamine(N-sulfate)-iduronic acid-N-acetylglucosamine-glucuronic acid-glucosamine(N-sulfate), isolated from the low sulfated irregular region of porcine intestinal heparin. **J Biol Chem.** 273(4):1863-71, 1998.
- Yamagata, T., Saito, H., Habuchi, O., Suzuki, S. Purification and properties of bacterial chondroitinases and chondrosulfatases. **J Biol Chem.** 243(7):1523-35, 1968.
- Yanagishita, M., Hascall, V.C. Cell surface heparan sulfate proteoglycans. **J Biol Chem.** 267(14):9451-4, 1992.
- Yoo, C.J., Yoo, Y.M., Kim, Y.J. The identification of proteoglycans, collagen and neuron in precursor cells from human fetal spinal cord. **Neurosci. Lett.** 457(3): 151-154, 2009.
- Yosizawa, Z., Ototani, N., Satake, S. A simple method for the quantitation of glycuronic acid-containing glycosaminoglycans with mucopolysaccharidases. **Anal Biochem.** 128(1):250-6, 1983.

ANEXO

O presente trabalho de tese gerou as seguintes comunicações em Congresso:

1. Menegatti, E., Martin, E.F., Kyosen, S.O., Micheletti, C., **Braghioli, P.S.**, Toma, L., Secches, T.A.V.A., Mendes, C.S.C., Rand, M.H., Nader, H.B., Dálmeida, V., Martins, A.M. Relato de caso de paciente com mucopolissacaridose tipo I (MPS I) em terapia de reposição enzimática (TRE): experiência de 11 meses. V Congresso Latinoamericano de Errores Innatos del Metabolismo y Pesquisa Neonatal, San José, Costa Rica, 08 a 10 de novembro de 2005.
2. Kyosen, S.O., Micheletti, C., **Braghioli, P.S.**, Toma, L., Secches, T.A.V.A., Mendes, C.S.C., Rand, M.H., Nader, H.B., D'Almeida, V., Chamoles, N.A., Martins, A.M. Clinical and biochemical alterations in MPS I patients receiving enzyme replacement therapy (ERT): an 11 months experience. 42th Annual Symposium of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism, 6-9 setembro 2005. **Journal of Inherited Metabolic Disease** 28(1): 182, 2005.
3. Kyosen, S.O., Micheletti, C., **Braghioli, P.S.**, Toma, L., Secches, T.A.V.A., Mendes, C.S.C., Rand, M.H., Nader, H.B., D'Almeida, V., Martins, A.M. Clinical and laboratorial alterations in 3 MPS I patients receiving enzyme replacement therapy (ERT) with laronidase: a 22 months experience. 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, Chiba, Japão, 12-16 de setembro de 2006. **Journal of Inherited Metabolic Disease** 29(1):152, 2006.
4. Toma, L., **Braghioli, P.S.**, Kyosen, S.O., Micheletti, C., Secches, T.A.V.A., Mendes, C.S.C., Rand, M.H., Nader, H.B., D'Almeida, V., Martins, A.M. Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis type I: biochemical changes and clinical correlations. 5th International Conference on Proteoglycans, Rio de Janeiro, Brazil, 16-20 setembro 2007.
5. Martins, A.M., Micheletti, C., Silva, C.T., Vicente, C.M., **Braghioli, P.S.**, Canossa, S., Aquino, R., Silva, D., Coulson-Thomas, V., Toma, L. MPS I patients in enzyme replacement therapy with laronidase in double dose every two weeks and glycosaminoglycans measurements. **Molecular Genetics and Metabolism** 98(1-2): 87-88, 2009.