

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

CARACTERIZAÇÃO DA DOENÇA ARTICULAR E ÓSSEA EM CAMUNDONGOS
COM MUCOPOLISSACARIDOSE II (SÍNDROME DE HUNTER)

LILIAN CORRÊA DA SILVA

Porto Alegre

2017

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

**CARACTERIZAÇÃO PROGRESSIVA DA DOENÇA ARTICULAR E ÓSSEA EM
CAMUNDONGOS COM MUCOPOLISSACARIDOSE II (SÍNDROME DE HUNTER)**

Lilian Corrêa da Silva

Orientador: Prof Dr Guilherme Baldo

Co-Orientadora: Dra Fernanda Pereira

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas: Fisiologia.

Porto Alegre, outubro de 2017

Este trabalho foi desenvolvido no Centro de Terapia Gênica do Centro de Pesquisa Experimental e na Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). O estudo foi financiado pelo Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos (FIPE), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela ONG Casa Hunter. Todos os experimentos apresentados nesta dissertação estão incluídos no projeto de pesquisa aprovado por seus aspectos éticos e metodológicos pelo Comitê de Ética em Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sob o registro nº15-0330.

Agradecimentos

Ao professor Guilherme Baldo por todos ensinamentos, pela oportunidade de trabalhar ao seu lado, pela extrema disponibilidade, sempre alegre e gentil sendo impecável na condução desse trabalho.

À Dra Fernanda Pereira, quem sempre me incentivou e esteve presente esclarecendo dúvidas.

Aos colegas do Centro de Terapia Gênica pela parceria inestimável na realização dessa pesquisa, em especial à Amanda Stapenhorst, Giselle Martins, Álvaro Franco, Esteban Gonzalez e Gabriela Pasqualim.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial à equipe de experimentação animal (Marta Cioatto, Tuane Garcez e Daniela Campagn). Grata por todo aprendizado!

À UFRGS e ao PPG Fisiologia em especial ao Diego Coelho, sempre disposto a ajudar.

Ao CNPq, ao FIFE e à Casa Hunter pelo apoio financeiro.

À todos os amigos que colaboraram com sugestões para a elaboração desse trabalho. Em especial à Camila Wilhelm e Fabiane Hinnah, que tanto me auxiliaram. Obrigada meninas por todos os acolhimentos.

À minha família e à família do meu esposo, por todo apoio.

Ao meu esposo Jonatan Soares, por ser meu maior incentivador, um super parceiro que não mediu esforços para que eu chegasse à conclusão desse trabalho. Obrigada por cuidar tão bem da nossa família!

À minha filha Laura, por ser a principal razão para que eu seja uma pessoa cada vez melhor. Por me fazer perceber o quanto posso ser forte e por fazer todo o cansaço desaparecer com um abraço!

À Deus pela vida e cuidados!

RESUMO

Base teórica: A Mucopolissacaridose II (MPS II) é uma doença genética recessiva ligada ao X causada por mutações no gene *IDS*. Como consequência, há acúmulo dos glicosaminoglicanos (GAGs) no lisossomo, fato que é responsável pelo fenótipo de MPS II. Anormalidades articulares e ósseas são conhecidas nos pacientes com MPS II e os tratamentos existentes não são eficientes para sanar tais anormalidades, portanto, realizamos este estudo de caracterização da doença articular e óssea, buscando evidenciar possíveis mecanismos responsáveis pela progressão da doença.

Objetivo: Avaliar a progressão das alterações osteoarticulares em animais com MPS II dos dois aos oito meses de idade.

Métodos: Foram utilizados camundongos nocaute *B6N.Cg-Idstm1Muen/J*, adquiridos do Jackson's Lab. Os machos foram genotipados para compor o grupo controle (normal) ou o grupo de animais com MPS II. Ambos foram avaliados aos 2, 4, 6 e 8 meses de idade. Foi realizada análise histológica da articulação tíbio-femural, avaliando presença de infiltrado inflamatório, reabsorção óssea, reabsorção cartilaginosa e proliferação fibrocartilaginosa. Também foi realizada a mensuração do tamanho total da placa de crescimento e suas zonas e avaliação de anormalidades ósseas mediante exame de imagem por Raio-X dos ossos fêmur e zigomático.

Resultados: Nos animais MPS II foi observado que o focinho era menos afilado (mais arredondado) e, em comparação com os animais controle, os animais MPS II apresentaram peso significativamente maior a partir dos 4 meses de idade. O escore histológico teve como principal característica a presença de reabsorção

cartilaginosa, presente em 80% (4/5 animais) dos animais aos 8 meses, outras anormalidades encontradas neste tempo foram presença de infiltrado inflamatório (2/5 animais aos 8 meses) e proliferação fibrocartilaginosa (1/5 animais). Não houve diferença significativa entre animais normais e MPS II no tamanho das zonas de cartilagem da placa de crescimento ósseo. As medidas em diâmetro do osso zigomático apresentaram-se significativamente superiores nos animais MPS II aos 4, 6 e 8 meses. Quanto ao comprimento do fêmur não houve diferença significativa entre os grupos. Já, na medida da espessura do fêmur, os animais MPS II do grupo de 6 meses de idade mostraram diferença significativa.

Conclusões: Anormalidades na articulação tíbio-femural foram detectadas nos animais aos 8 meses de idade. Não foram encontradas anormalidades óbvias na estrutura da placa de crescimento. Foi observado aumento na espessura do fêmur e do zigomático nos animais MPS II, sem alterações do tamanho do fêmur.

Palavras-chave: Mucopolissacaridose tipo II, doença articular e óssea, síndrome de Hunter.

ABSTRACT

Background: Mucopolysaccharidosis II (MPS II) is a recessive X-linked genetic disease caused by mutations in the *IDS* gene. Consequently, there is an accumulation of glycosaminoglycans (GAGs) in the lysosome, fact that is responsible by the MPS II phenotype. Joints and bone abnormalities are known in MPS II patients and existing treatments are not efficient in correcting these abnormalities. Therefore, this study was performed to evidence bone and joint disease description in the animal model, searching for mechanisms responsible for disease progression.

Objective: To evaluate the progression of osteoarticular changes in animals with MPS II from two to eight months of age.

Methods: Male animals from the MPS II colony (*B6N.Cg-Idstm1Muen/J*) were genotyped to form the control (normal) group or MPS II group. Both groups were evaluated at the 2, 4, 6 or 8 months. Histological analysis of knee joint (presence of inflammatory infiltrate, bone resorption, cartilaginous reabsorption and fibrocartilaginous proliferation), measurement of total growth plate size and its zones, and evaluation of bone abnormalities by X-ray imaging of the femur and zygomatic bones were performed.

Results: MPS II mice presented progressive abnormal features, such as a more rounded snout and a significative increased weight from 4 months of age. The main histological alteration was the presence of cartilage reabsorption, present in 80% (4/5 animals) of the eighth-month old animals. Other abnormalities found at this period were the presence of inflammatory infiltrate (2/5 animals at the eighth months old) and fibrocartilaginous proliferation (1/5 animals). There was no significant difference in the growth plate between normal and MPS II animals. The zygomatic bone

diameter was increased in MPS II at fourth, sixth and eighth months. There were no significant differences in femur length between groups. Thickness of the femur was increased in MPS II at six months.

Conclusions: Abnormalities in the joint were detected in the animals at 8 months of age. No obvious abnormalities were found in the growth plate structure. An increase in femur and zygomatic thickness was observed in MPS II animals, with no changes in femur size.

Key words: Mucopolysaccharidosis type II, joint and bone disease, Hunter syndrome.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Rota de degradação do Dermatan Sulfato.....	20
Figura 2: Rota de degradação do Heparan Sulfato.....	22
Figura 3: Representação de uma célula com degradação normal e anormal de GAGs.	23
Figura 4: Representação da localização e tamanho do gene IDS em humanos.....	24
Figura 5: Estrutura histológica do osso.....	31
Figura 6: Imagem ilustrativa do joelho de um roedor corada com Hematoxilina-eosina.....	32
Figura 7: Zonas do disco epifisário.....	33
Figura 8: Localização da matriz extracelular representada em azul e matriz óssea representada em vermelho.....	34
Figura 9: Animais sendo anestesiados com isoflurano inalatório 2%.....	38
Figura 10: Coleta de parte da orelha com furador.....	39
Figura 11: Peso dos camundongos dos grupos normal e MPS II ao longo da vida..	45
Figura 12: Resultado do escore histológico – Inflamação (avaliada como presente ou ausente). Cada ponto representa o escore de um animal.....	46
Figura 13: Resultado do escore histológico – Reabsorção óssea (avaliada de 0 a 3). Cada ponto representa um animal.	47
Figura 14: Resultado do escore histológico – Reabsorção cartilaginosa (avaliada de 0 a 3).	47
Figura 15: Resultado do escore histológico – Proliferação fibrocartilaginosa, avaliada de 0 a 3. Cada ponto representa um animal.	48
Figura 16: Resultado do escore histológico final.	49

Figura 17: Microscopia HE e Alcian Blue animal normal 8 meses.	50
Figura 18: Microscopia HE e Alcian Blue animal MPS II 2 meses.....	50
Figura 19: Microscopia HE e Alcian Blue animal MPS II 8 meses.....	51
Figura 20: Medida das zonas do disco epifisário dos animais de 2 meses.....	52
Figura 21: Disco epifisário dos animais de 4 meses.	52
Figura 22: Disco epifisário dos animais de 6 meses.	53
Figura 23: Disco epifisário dos animais de 8 meses.	53
Figura 24: Diâmetro em mm do Zigomático ao longo do tempo analisado por raio-X.	55
Figura 25: Comprimento do Fêmur em mm analisado por raio-X.....	55
Figura 26: Espessura do Fêmur em mm analisado por raio-X.	56
Figura 27: Exemplo do zigomático de uma animal normal e MPS II.	56
Figura 28: Análise do femur.	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de animais por grupo que fizeram parte da análise histológica. ..45

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO II (MPS II, SÍNDROME DE HUNTER).....	18
1.1.1 Aspectos Genéticos.....	23
1.1.2 Estrutura do gene.....	24
1.1.3 Aspectos Bioquímicos.....	25
1.1.4 Tratamento.....	26
1.1.5 Manifestações clínicas	27
1.1.5.1 Alterações articulares e ósseas em MPS	29
1.2 PROCESSO FISIOLÓGICO DE OSSIFICAÇÃO	30
2 OBJETIVOS.....	36
2.1 OBJETIVO GERAL	36
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	36
3 MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 MODELO ANIMAL DE MPS II	37
3.2 DESENHO EXPERIMENTAL	40
3.3 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO.....	40
3.4 ALTERAÇÕES NA PLACA DE CRESCIMENTO	41
3.5 AVALIAÇÃO DE ANORMALIDADES ÓSSEAS	42
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
4 RESULTADOS.....	43
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA COLÔNIA	43
4.2 ESCORE HISTOLÓGICO.....	45

4.3 TAMANHO DAS ZONAS DE CARTILAGEM DA PLACA DE CRESCIMENTO	
ÓSSEO	51
4.4 ANORMALIDADES OBSERVADAS NOS RAIOS-X	53
5 DISCUSSÃO	58
6 CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS

AB – Alcian Blue

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

D - GalNac – *N*-acetil-D-galactosamina

DS – Dermatan Sulfato

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

EMA – European Medicines Agency

FDA – Food and Drug Administration

GAGs – Glicosaminoglicanos

GC Box - Padrão distinto de nucleótidos encontrados na região promotora de alguns genes eucarióticos, ricos em GC

GlcA – β -ácido D-glucurônico

GlcN – α -D-glucosamina

H&E ou HE – Coloração Hematoxilina Eosina

HLA- Antígeno Leucocitário Humano

HS – Heparan Sulfato

IdoA – α -L-idurônico ácido

IDS – Iduronato-2-sulfatase

Kb – Kilobase

KDa – Unidade de massa atômica

MMP – Metaloproteinase

KO – Knockout

MPS – Mucopolissacaridose

MPS I – Mucopolissacaridose tipo I

MPS II – Mucopolissacaridose tipo II

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

TCTH – Transplante de células tronco hematopoiéticas

TRE – Terapia de Reposição Enzimática

UEA – Unidade de Experimentação Animal

Xq – Braço longo do cromossomo X

WT – Wild type

1 INTRODUÇÃO

Mucopolissacaridoses (MPS) são doenças de depósito lisossomal caracterizadas por mutações em enzimas que degradam glicosaminoglicanos (GAGs) e na maioria dos casos são herdadas de forma autossômica recessiva (exceto no caso de MPS II que está ligada ao cromossomo X). Existem onze deficiências enzimáticas conhecidas que dão origem a sete MPS distintas: MPS I, MPS II, MPS III, MPS IV, MPS VI, MPS VII, MPS IX, sendo que em cada uma delas ocorre uma deficiência congênita de diferentes enzimas lisossômicas. A degradação gradativa de GAGs requer quatro exoglicosidases, cinco sulfatases e uma transferase não hidrolítica, além de endoglicosidases (OLIVEIRA et al., 2013; GOKDOĞAN et al., 2016; NEUFELD; MUENZER, 2001).

Para a elucidação da estrutura primária, produção de enzimas recombinantes e identificação de mutações que causam a doença, os genes e cDNAs que codificam a maioria destas enzimas foram clonados. Mesmo com variação da incidência de MPS entre seus subtipos, é estimado que sua incidência global seja de 1/25.000 habitantes (OLIVEIRA et al., 2013; GOKDOĞAN et al., 2016; NEUFELD; MUENZER, 2001).

Uma vez que as enzimas lisossômicas são expressas de forma constitutiva, suas deficiências levam a complicações multissistêmicas e o acúmulo de substrato faz com que a doença tenha cunho progressivo, podendo causar a morte do paciente nos primeiros anos de vida (NEUFELD; MUENZER, 2001). Dentre os achados clínicos das MPS estão retardo no desenvolvimento neuropsicomotor, deficiência cognitiva, hepatoesplenomegalia, dilatação da aorta e válvulas cardíacas,

opacidade de córnea e perda de audição. Alterações articulares também estão presentes e são caracterizadas por desenvolvimento anormal da cartilagem óssea que tem como consequência característica a baixa estatura desses pacientes, além de poder originar doenças articulares degenerativas (NEUFELD; MUENZER, 2001; PASTORES; MEERE, 2005).

1.1 MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO II (MPS II, SÍNDROME DE HUNTER)

A Mucopolissacaridose tipo II é uma doença recessiva ligada ao X causada por mutações no gene *IDS*, que codifica a enzima lisossômica iduronato-sulfatase (IDS). Esta enzima tem por função a remoção de sulfatos ligados ao oxigênio dos glicosaminoglicanos (também conhecidos como GAGs, carboidratos que atuam na formação, manutenção e reparação de tecidos estruturais). Em decorrência da deficiência de IDS há acúmulo dos GAGs heparan e dermatan sulfato no lisossomo (NEUFELD; MUENZER, 2001). Por conseguinte, esse aumento de GAGs parcialmente degradados no interior de tecidos e órgãos é provavelmente o principal responsável pelo fenótipo da MPS II (GARCIA et al., 2007).

A síndrome de Hunter afeta pelo menos 1/162.000 nascidos-vivos do sexo masculino, em virtude de seu padrão de herança genética, recessivo ligado ao X. Isso significa que o gene *IDS* se localiza no cromossomo X, especificamente no locus Xq28. A Rede MPS Brasil, uma iniciativa para promoção do diagnóstico das MPS em nosso país, tem um total de 983 pacientes brasileiros com MPS cadastrados desde 2004 até junho de 2012, sendo 194 com MPS I, 292 com MPS II, 134 com MPS III, 113 com MPS IVA, 8 com MPS IVB, 230 com MPS VI e 12 com MPS VII (ALEGRA et al. 2013; BRUSIUS-FACCHIN et al., 2014). Através dos dados

pode-se observar que a MPS II é a mais comum. Dentre os pacientes brasileiros, grande parte possui o fenótipo grave. Nesses casos, prevalecem as mutações onde há deleção total do gene, assim como mutações de ponto (p.R443X, p.R468W, p.G374sp) (ALEGRA et al., 2013; BRUSIUS-FACCHIN et al., 2014).

O Dermatan Sulfato é um polímero linear heterogêneo constituído por uma sequência de 70 a 200 unidades sucessivas de *N*-acetil-D-galactosamina (D-GalNac) unidas por ligações β -(1,3) a resíduos de ácido *L*-idurônico. Dermatan sulfato apresenta um grupo O-sulfato para cada unidade de dissacarídeo, encontrando-se na posição 4 da D-GalNac, e em menor frequência na posição 6 da D-GalNac e na posição 2 do ácido *L*-idurônico. O Dermatan Sulfato apresenta peso molecular entre 12 e 45 KDa, com peso molecular médio entre 20 e 30 KDa (FACCHIN, 2012; FERNÁNDEZ, 2008) e sua rota de degradação está mostrada na figura 1.

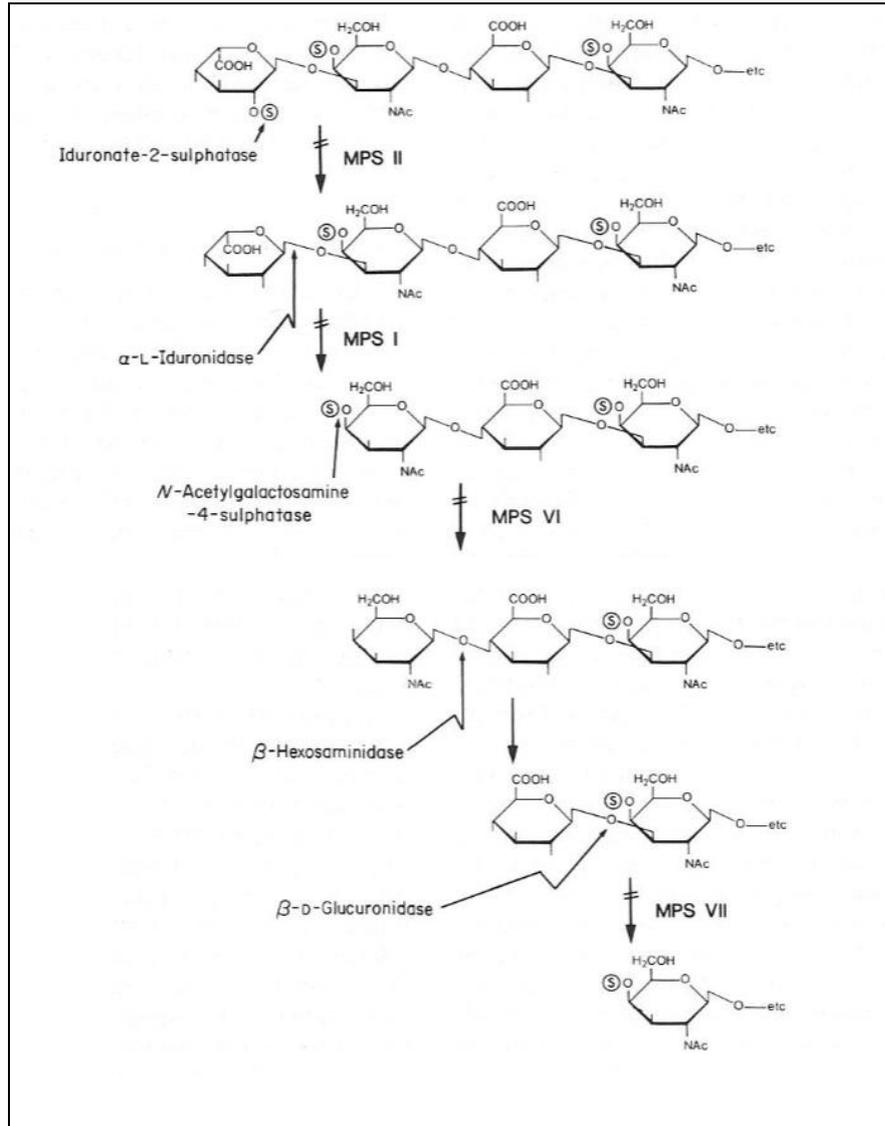


Figura 1: Rota de degradação do Dermatan Sulfato. A iduronato-2-sulfatase (deficiente na MPS II) é a primeira enzima da rota de degradação. Fonte: Hopwood e Morris (1990).

Já o heparan sulfato é um polímero polidisperso linear formado por unidades alternadas de α-D-glucosamina (GlcN) e ácido urônico, ou β-ácido D-glucurônico (GlcA) ou α-L-idurônico ácido (IdoA), unidas entre si por ligações glicosídicas, localizando-se de frente ao compartimento extracelular. Logo, pode estar ligado à formação de matrizes extracelulares, modulação da atividade de enzimas e seus inibidores, fornecimento de gradiente extracelular de fatores de crescimento e

quimiocinas, entre outros (FACCHIN, 2012; PERETTI et al., 2008; RAMAN et al., 2005; GRUNERT et al., 2008). Sua rota de degradação está mostrada na figura 2.

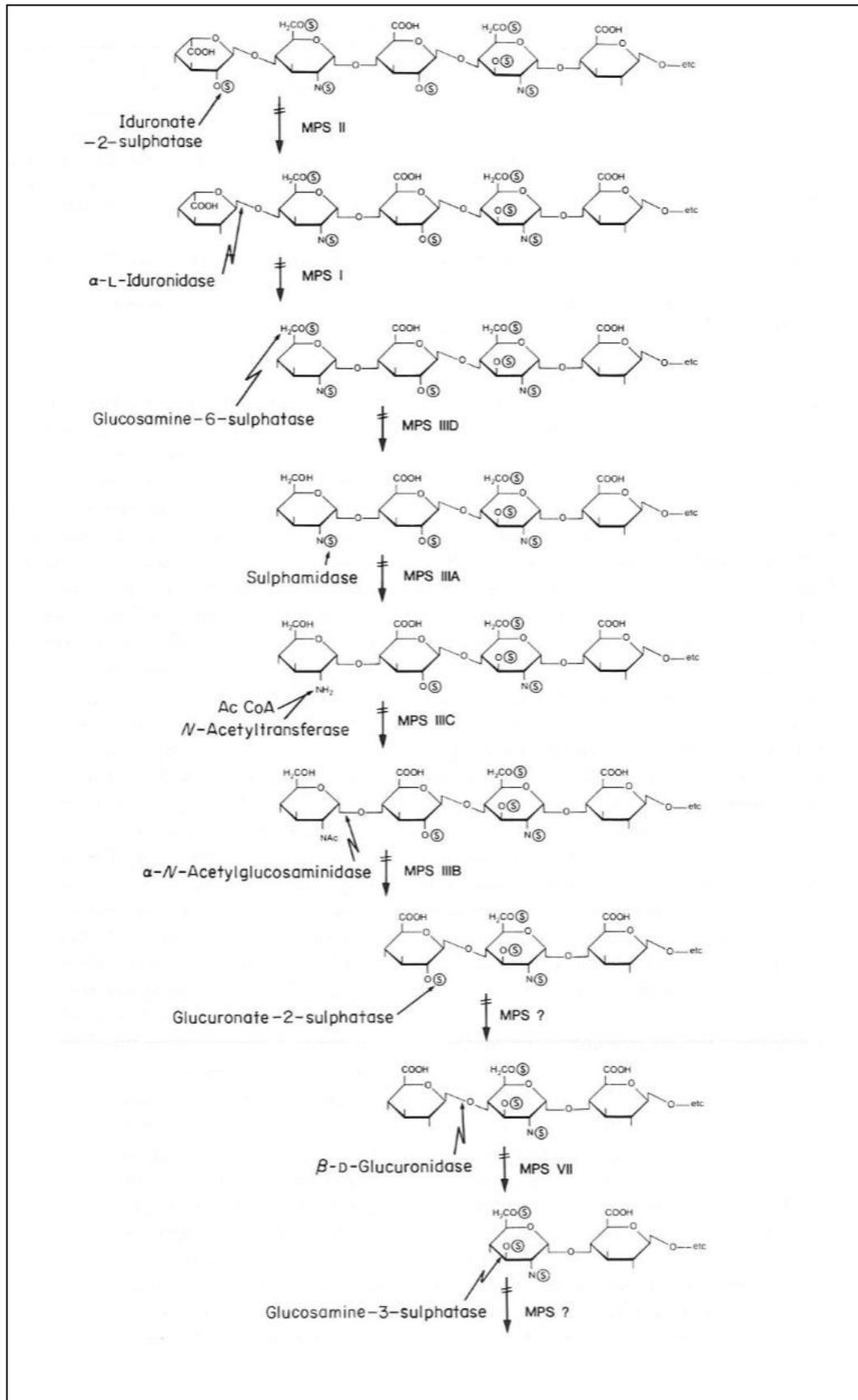


Figura 2: Rota de degradação do Heparan Sulfato. A iduronato sulfatase é a primeira enzima da rota.

Fonte: Hopwood e Morris (1990).

Os GAGs HS e DS que não são degradados no lisossomo acumulam-se em seu interior (figura 3), fato que leva os pacientes a apresentarem diferentes formas clínicas da doença (FACCHIN, 2012).

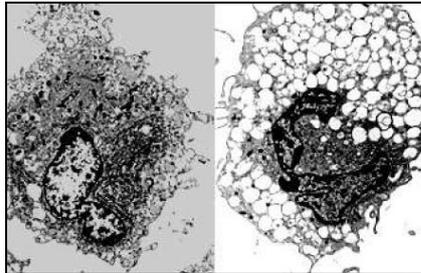


Figura 3: Representação de uma célula com degradação normal e anormal de GAGs. A célula da esquerda tem degradação normal e a célula da direita apresenta degradação anormal de GAGs, onde é possível observar o acúmulo destes dentro dos lisossomos, que se apresentam grandes, redondos e edemaciados ao microscópio (NEUFELD; MUENZER, 2001).

1.1.1 Aspectos Genéticos

Sulfatases humanas (incluindo a Iduronato-2-sulfatase) são uma classe de enzimas com sequência e mecanismo catalítico altamente conservados. As sulfatases humanas são encontradas em inúmeros locais subcelulares, onde participam da síntese de hormônios, degradação de glicosaminoglicanos e glicolípídeos e modulação de sinais entre célula e matriz extracelular (FACCHIN, 2012; HANSON; BEST; WONG, 2004).

A enzima iduronato-2-sulfatase é uma glicoproteína monomérica composta por 550 aminoácidos e sua principal função é remover o grupo sulfato da posição 2 do ácido L-idurônico no dermatan sulfato e no heparan sulfato (BOND et al, 1997;

FACCHIN, 2012). Tal enzima é a primeira que atua na rota de degradação de heparan e dermatan sulfato (HOPWOOD; MORRIS, 1990).

1.1.2 Estrutura do gene

O gene que codifica a *IDS* foi mapeado no cromossomo Xq28.1 e é formado por 9 exons, 8 introns e seu tamanho aproximado é de 24 kb (Figura 4). O cDNA possui 2.3 Kb e o promotor contém duas sequências consenso do tipo GC Box, mostrando baixos níveis de transcrição e indicando que este é um gene *housekeeping*, (FACCHIN, 2012; WILSON et al, 1990).

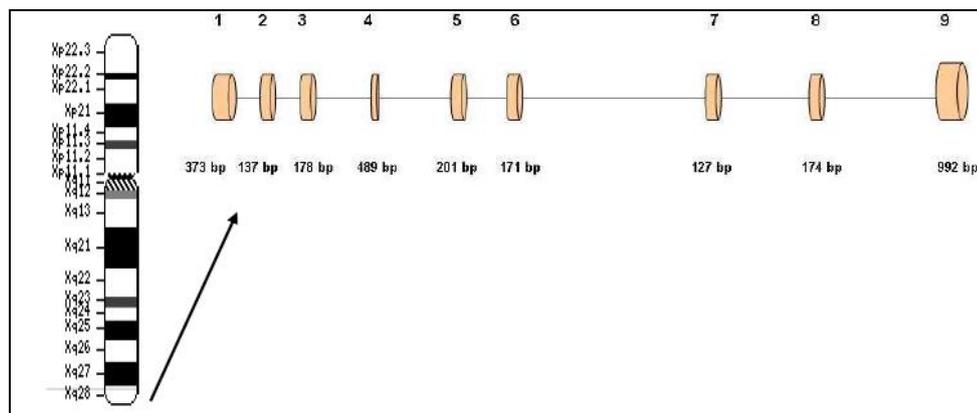


Figura 4: Representação da localização e tamanho do gene *IDS* em humanos. Fonte: Facchin (2012).

No último estudo abrangente, haviam sido relatadas 346 mutações patogênicas no gene *IDS*, sendo que a maior parte se trata de mutações de ponto (180) ou pequenas deleções (62). Deleções grandes e rearranjos acontecem em cerca de 20% dos pacientes e a frequência de deleção completa é de 6 a 8%, podendo incluir outros genes e produzir fenótipos que resultam de síndromes de genes contíguos. Em cerca de 10% dos pacientes ocorre um tipo específico de

inversão do gene *IDS*, secundário à recombinação homóloga entre o gene ativo (intron 7) e o pseudogene (sequência próxima ao exon 3). Mutações de ponto ocorrem mais frequentemente nos exons III, VIII e IX. (BONDESON et al, 1995; FACCHIN, 2012).

1.1.3 Aspectos Bioquímicos

No ano de 1957 foram estabelecidas as bases de teste bioquímico de rotina para diagnóstico da MPS, a partir da identificação da presença de dermatan e heparan sulfatos na urina dos pacientes, pois há excreção aumentada de tipos diferentes de GAGs na urina de acordo com a deficiência enzimática. Logo, primeiramente é realizado teste de triagem na urina para orientar a escolha do ensaio enzimático a ser realizado (FACCHIN, 2012; GIUGLIANI et al, 2010; NEUFELD; MUENZER, 2001; HOPWOOD; MORRIS, 1990).

Geralmente, a suspeita diagnóstica não é específica para um tipo de MPS a partir dos sinais clínicos, pois estes se sobrepõem em muitas MPS. Portanto, o primeiro exame realizado é a análise dos GAGs na urina através da dosagem e de cromatografia. Tais exames orientam a direção dos estudos enzimáticos, mas somente a medida da atividade da enzima específica fornecerá o diagnóstico definitivo do tipo de MPS (FACCHIN, 2012; NEUFELD; MUENZER, 2001; WRAITH, 2013).

Pacientes com MPS II excretam heparan e dermatan sulfato em quantidades aumentadas, o que pode ser detectado por testes semiquantitativos, qualitativos (cromatografia em camada delgada de glicosaminoglicanos e eletroforese bi-dimensional) e quantitativos (quantificação de GAGs totais pela técnica de dimetil-

blue ou quantificação de cada GAG por espectrometria de massa em tandem). São testes rápidos, relativamente baratos e úteis para uma avaliação inicial. O diagnóstico definitivo de MPS II depende da demonstração da deficiência de IDS em plasma, leucócitos ou fibroblastos. Histologicamente pode ser detectada uma excessiva vacuolização, devido ao acúmulo de GAGs nos lisossomos das células, principalmente em fibroblastos, células endoteliais, macrófagos e leucócitos (FACCHIN, 2012; GIUGLIANI et al, 2010; NEUFELD; MUENZER, 2001).

1.1.4 Tratamento

Estão disponíveis atualmente dois tipos de tratamento para a MPS II, são eles: o transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) e a terapia de reposição enzimática (TRE). O princípio dos dois tratamentos baseia-se no fato de que a enzima IDS apresenta resíduos de manose-6-fosfato (M6P), e pode ser captada pelos receptores de manose-6-fosfato (M6PR) das células dos pacientes.

Com a realização do TCTH, as células transplantadas passam a produzir e distribuir aos órgãos a enzima deficiente. Estudo recente demonstrou que a maioria dos pacientes apresentou melhora nas características somáticas e movimentos articulares após o TCTH em comparação com os pacientes em tratamento de reposição enzimática, além disso, esses pacientes também mostraram melhora ou ausência de progressão de achados anormais na ressonância magnética cerebral (KUBASKIET et al., 2017).

Quando bem sucedido, o TCTH melhora a qualidade de vida do paciente, pois preserva a neurocognição e reduz as alterações somáticas. Entretanto, pode haver dificuldades como encontrar doador HLA compatível, a possibilidade da

doença do enxerto contra o hospedeiro e a falta de efeito sobre anormalidades ósseas e neurológicas já estabelecidas, o que impede a utilização dessa terapia em um número maior de pacientes.

A TRE foi aprovada pelo Food and Drug Administration em 2006 (Idursulfase®, Shire, USA) e pelo European Medicines Agency em 2005 (EMA, Europa), além de ter sido registrado na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 2008. A dose preconizada é de 0,5mg/kg por semana, em infusão que deve durar de uma a três horas.

Mediante a TRE observou-se redução no volume do fígado e redução de secreção de GAGs na urina, em ensaios clínicos. Entretanto, tal terapia apresenta aspectos negativos como reações adversas e incapacidade de reaver sintomas neurológicos. Outro ponto insatisfatório refere-se ao pouco ou nenhum benefício a alguns órgãos, como por exemplo, aos ossos. (GIUGLIANI et al., 2010; ALEGRA et al., 2013).

Devido ao alto custo da TRE por paciente, este tratamento geralmente é requerido por meio legal ao serviço público, o que pode levar algum tempo devido aos protocolos burocráticos que devem ser seguidos. Pode haver formação de anticorpos contra a enzima, o que reduz a eficiência do tratamento. Ainda, as aplicações semanais interferem diretamente na qualidade de vida dos pacientes e suas famílias (BROOKS et al., 2003).

1.1.5 Manifestações clínicas

Manifestações clínicas diferentes e fenótipos variáveis podem ser encontrados nessa doença, podendo ser observados: traços faciais

desproporcionais, tais como cabeça grande, testa saliente, nariz largo e lábios grossos, infecções respiratórias recorrentes, coriza crônica, alterações no sistema nervoso, hepatoesplenomegalia, deformidades esqueléticas, regurgitação valvular cardíaca, obstrução das vias aéreas superiores, dentição anormal, doença pulmonar restritiva, hérnias, contraturas articulares, síndrome da apneia obstrutiva do sono, alterações no desenvolvimento e/ou fala, resultando em redução da qualidade de vida. Achados clínicos adicionais incluem perda auditiva, síndrome do túnel do carpo, macroglossia, baixa estatura, macrocefalia com ou sem hidrocefalia comunicante, displasia esquelética (NEUFELD; MUENZER, 2001; ALEGRA et al., 2013).

Tal fenótipo surge na infância e de acordo com a variabilidade da gravidade podem ser encontrados achados clínicos diferentes. Na forma mais grave da doença, as manifestações clínicas iniciam-se por volta de 1-2 anos de idade, progredindo para sinais e sintomas somáticos e deficiência cognitiva durante a infância. Já nos indivíduos com a forma mais branda da doença, onde há produção da enzima de forma deficiente, os primeiros sintomas podem aparecer na infância tardia, com progressão lenta da doença e pouca ou nenhuma deficiência cognitiva (NEUFELD; MUENZER, 2001; GIUGLIANI et al, 2010; ALEGRA et al., 2013).

O fenótipo grave parece ser duas vezes mais frequente do que a forma atenuada da doença, mesmo que as taxas de prevalência não estejam disponíveis. 84% dos homens afetados tem algum tipo de envolvimento neurológico e o comprometimento cardiovascular foi relatado em 82% dos indivíduos afetados. A MPS II na sua forma mais grave pode levar o paciente a óbito na primeira década de vida (NEUFELD; MUENZER, 2001; ALEGRA et al., 2013). Alterações ósseas e

articulares são encontradas tanto na forma grave como na forma atenuada da doença.

1.1.5.1 Alterações articulares e ósseas em MPS

Nas MPS, a patogênese da doença articular e óssea é um processo que requer estudos mais aprofundados, uma vez que os tratamentos disponíveis apresentam resultados modestos na correção das desordens geradas pelas alterações no desenvolvimento cartilaginoso. Os pacientes com MPS II apresentam baixa estatura, dores articulares e má-formação dos ossos, e os mecanismos responsáveis por essas alterações ainda não são bem compreendidos.

Estudo de progressão da Mucopolissacaridose tipo I (MPS I) mostrou que camundongos apresentaram aspectos histológicos semelhantes à osteoartrite observados a partir de 6 meses de idade. Genes diferencialmente expressos em artrite reumatoide foram elevados em células sinoviais e houve aumento da expressão de colagenases, o que poderia ser a causa de alterações destrutivas, pois Metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9) foram identificadas na cartilagem afetada. Outras proteases, como a catepsina B, também podem degradar a matriz extracelular, e podem contribuir para a patogênese da doença. Estudo anterior também revelou desorganização na placa de crescimento em animais com MPS I (OLIVEIRA et al., 2013).

Outro ponto comum em todas as MPS é o acometimento do sistema musculoesquelético ou “disostose múltipla”. Tal acometimento é caracterizado por deformidades osteoarticulares (cifose, escoliose, joelho valgo, pé equino), rigidez articular com perda de amplitude de movimentos e acometimento do neurônio motor superior (mielopatia, hipertonia e espasticidade), uma vez que a progressão das

manifestações clínicas motoras apresenta relação direta com a gravidade geral da doença. Esta má-formação dos ossos e alteração de tamanho pode estar associada a alterações no processo fisiológico de ossificação, por exemplo (MATOS et al., 2013).

1.2 PROCESSO FISIOLÓGICO DE OSSIFICAÇÃO

O processo fisiológico de ossificação dos ossos envolve o crescimento destes em diâmetro e comprimento, como ocorre nos ossos longos. O crescimento também pode se dar de modo uniforme, em suas diferentes dimensões, como acontece, por exemplo, em ossos sesamóides. A articulação do joelho, que será analisada neste trabalho, é formada por dois ossos longos (tíbia e fíbula) e um osso sesamoide (patela) (KIERSZENBAUM; TRES, 2016).

O crescimento geral de ossos diversos e crescimento em diâmetro de diáfises por deposição de osso na superfície externa e reabsorção na superfície interna é dado, de forma simplificada, a partir da multiplicação de células-tronco, sobreposição de osteoblastos ao osso já existente, secreção de matriz óssea, mineralização da matriz, captura dos osteoblastos no interior de lacunas e sua transformação em osteócitos. Na sequência, uma nova camada de osteoblastos repete o ciclo e adiciona mais osso à superfície, e assim por diante (KIERSZENBAUM; TRES, 2016).

Na imagem abaixo (figura 5) é possível observar muitos osteoclastos na superfície interna deste osso, enquanto na superfície externa do osso há uma grande quantidade de osteoblastos.

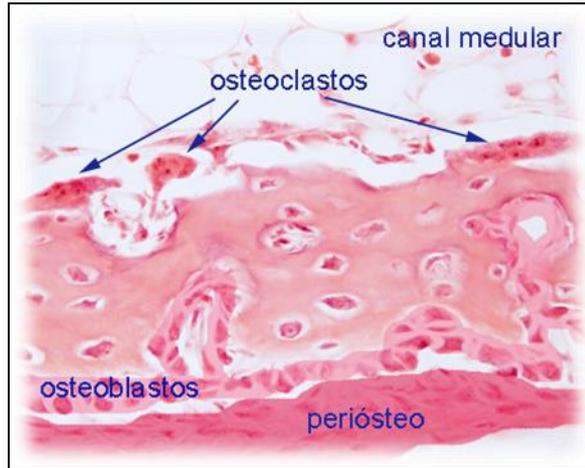


Figura 5: Estrutura histológica do osso. Fonte: <http://www.icb.usp.br/mol/7-34-crescim-aposicao.html>.

Já no crescimento do osso em comprimento de diáfise, os osteoblastos derivados de células-tronco se apoiam sobre a matriz extracelular cartilaginosa que serve de modelo para a ossificação. Os osteoblastos produzem matriz óssea, que é secretada e depositada sobre a matriz de cartilagem e o restante ocorre como descrito no processo anterior de crescimento em diâmetro das diáfises. A imagem abaixo é de um joelho de um roedor (Figura 6, coloração H&E) onde é possível observar as epífises dos dois ossos envolvidos na articulação do joelho, a diáfise de um dos ossos, músculo estriado esquelético em torno do osso, uma cápsula articular que reveste a articulação, o menisco situado entre as duas epífises, o centro de uma das epífises contendo a medula óssea e uma faixa de coloração mais clara, situada entre a epífise e a diáfise, chamada disco epifisário também conhecido como cartilagem de conjugação ou metáfise.

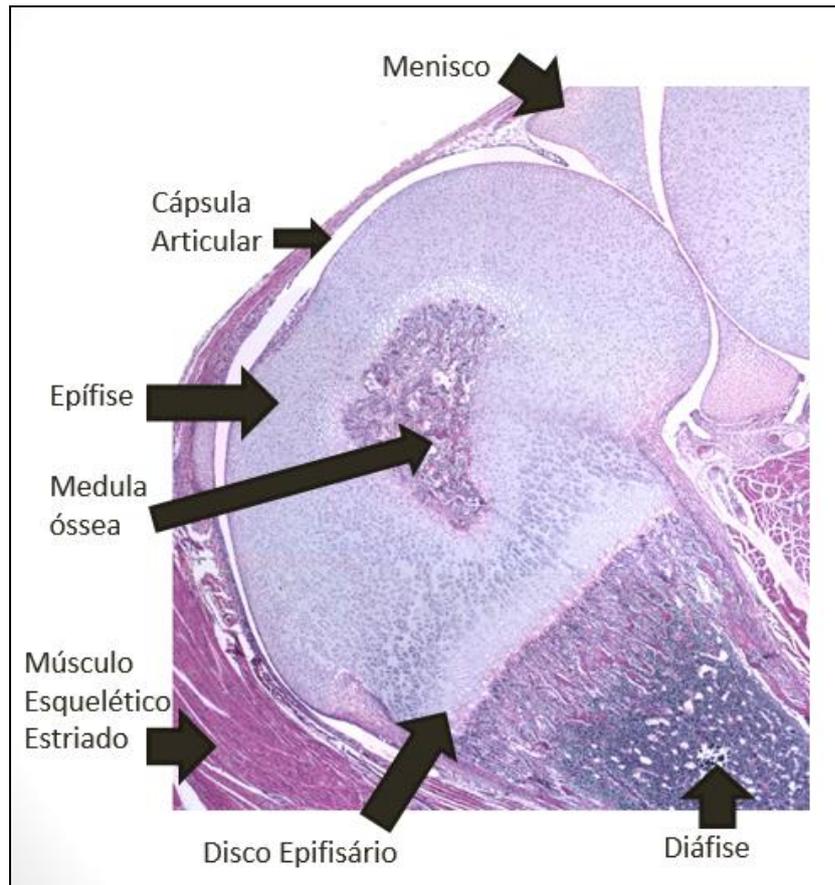


Figura 6: Imagem ilustrativa do joelho de um roedor corada com Hematoxilina-eosina. Fonte:

<http://www.icb.usp.br/mol/7-35-crescim1.html>.

O disco epifisário ou cartilagem de crescimento é responsável pelo crescimento longitudinal de ossos longos. Nesta região é possível identificar cinco zonas distintas: 1 – Zona de cartilagem em repouso; 2 – Zona de cartilagem seriada – apresenta condrócitos que se dividem por mitose na porção mais próxima à epífise, forma pilha de condrócitos, semelhante a pilhas de moedas; 3 – Zona de cartilagem hipertrófica – apresenta condrócitos aumentados, separados por delgados septos de matriz extracelular cartilaginosa; 4 – Zona de cartilagem calcificada – observa-se septos de matriz extracelular da cartilagem que separam os condrócitos, há calcificação; 5 – zona de ossificação – região vascularizada presença de muitos osteoblastos, células do tecido ósseo e conjuntivo (figura 7).

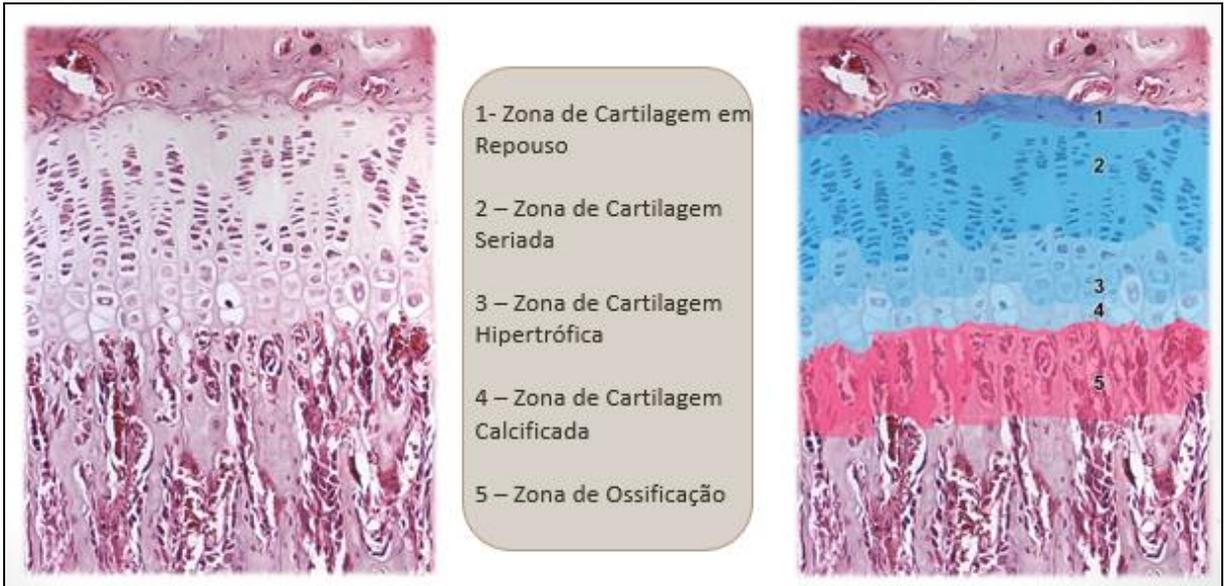


Figura 7: Zonas do disco epifisário. Fonte: <http://www.icb.usp.br/mol/7-37-discoepif-1.html>.

A matriz extracelular do tecido cartilaginoso é formada por colágeno (10%), proteoglicanos (30%) e água (65 a 85%). Já a matriz óssea é formada em grande parte por colágeno. A localização da matriz extracelular do tecido cartilaginoso e a matriz óssea podem ser observadas na figura 8, onde a cor azul representa a matriz extracelular cartilaginosa e em vermelhos está representada a matriz extracelular óssea.

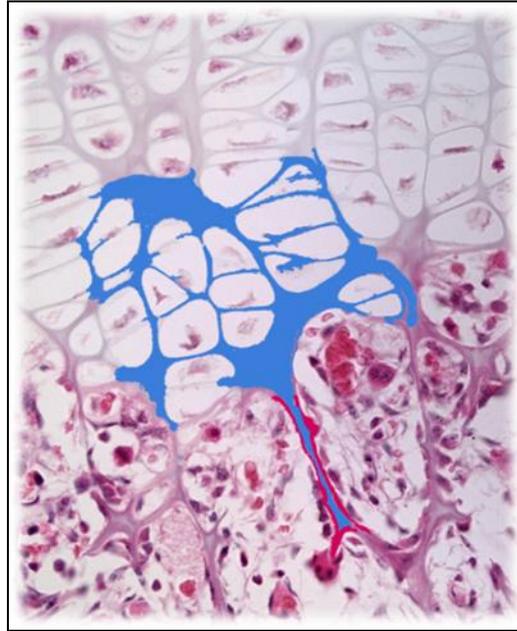


Figura 8: Localização da matriz extracelular representada em azul e matriz óssea representada em vermelho. Fonte: <http://www.icb.usp.br/mol/7-41-discoepif-5-zossificacao.html>.

O colágeno, presente tanto na matriz extracelular cartilaginosa quanto na matriz óssea, pode ser degradado por Metaloproteases. A MMP-2 (gelatinase A) e a MMP-9 (gelatinase B) já vem sendo citadas na literatura por participar da degradação dos colágenos tipo IV, V, VII e XI, além de degradar a elastina e proteínas de ligação da cartilagem. Sabe-se atualmente que as Catepsinas estão envolvidas com a degradação proteolítica fisiológica e em situações patológicas podem estar envolvidas com a degradação de colágeno. (VELOSA; TEODORO; YOSHINARI, 2003). Portanto, degradação excessiva desta estrutura pode acontecer em decorrência do aumento da atividade de uma ou mais destas enzimas.

Sendo que as anormalidades articulares e ósseas são conhecidas nos pacientes com MPS, faz-se necessário um estudo de caracterização progressiva da doença articular e óssea no modelo murino de MPS II e se estes processos fisiológicos de ossificação estão ocorrendo de forma normal buscando identificar se

e em que momento elas ocorrem no modelo animal e evidenciar possíveis mecanismos responsáveis pela progressão da doença.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a progressão das alterações osteoarticulares em animais com MPS II dos 2 aos 8 meses de idade.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar anormalidades na articulação tíbio-femural dos animais até os 8 meses de idade através de um escore histológico.
- Avaliar anormalidades na placa de crescimento pela medida das suas zonas e da sua organização geral;
- Estudar alterações ósseas no fêmur e zigomático através da análise de raios-X para comprimento e espessura dos ossos supra-citados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MODELO ANIMAL DE MPS II

Os modelos animais têm sido importantes para a compreensão de patologêneses associadas às doenças genéticas como, por exemplo, modelos caninos e felinos que são fundamentais para o desenvolvimento de terapias onde há substituição enzimática no tratamento de MPS I. Entretanto, o tamanho e o tempo de vida desses animais limitam a eficácia de testes de substituição enzimática a longo prazo, dificultando a investigação de terapias novas (KAKKIS et al., 2001).

Foram desenvolvidos então modelos de camundongos que estão sendo utilizados para avaliação de novos tratamentos, uma vez que este modelo reproduz muitas características presentes nessa doença em humanos (GARCIA et al., 2007). Para a realização deste estudo, três casais de camundongos formados por machos hemizogotos e fêmeas heterozigotas para o Gene *IDS* (*iduronato sulfatase*) foram comprados do Jackson's Lab (EUA) com o objetivo de formar colônias na Unidade de Experimentação Animal (UEA), no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Os camundongos nocaute B6N.Cg-Idstm1Muen/J, adquiridos do Jackson's Lab, apresentam uma inserção da sequência de resistência à neomicina entre o exon 5 e o exon 4, o que suprime a expressão do gene IDS. As fêmeas heterozigotas são viáveis e férteis e o acúmulo lisossomal dos glicosaminoglicanos, faz com que os tecidos sofram danos crônicos e progressivos, levando à disfunção de órgãos nos animais como é visto em pacientes com MPS II (THE JACKSON'S LABORATORY).

Todos os procedimentos com animais foram realizados na Unidade de Experimentação Animal (UEA), no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, e seguiram as normas de adequação às diretrizes vigentes previstas na Lei 11.794/08 e nas resoluções normativas números 12 (Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos) e 13 (Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA). Os animais foram mantidos na Unidade de Experimentação Animal, do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em caixas plásticas com no máximo 5 animais/caixa, em ambiente controlado (temperatura 20-24°C, umidade relativa do ar 40-60% e sistemas de exaustão de ar) com ciclos de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, alimentação comercial padrão para a espécie e água ad libitum.

Os animais utilizados no estudo foram genotipados no vigésimo primeiro dia de vida. Para tanto, os animais foram anestesiados com isoflurano inalatório 2% (figura 9) e parte da orelha foi removida com um furador de orelhas (figura 10) para identificação e genotipagem. Camundongos que dividiam a mesma caixa tiveram marcações diferentes nas orelhas para identificação.



Figura 9: Animais sendo anestesiados com isoflurano inalatório 2%.

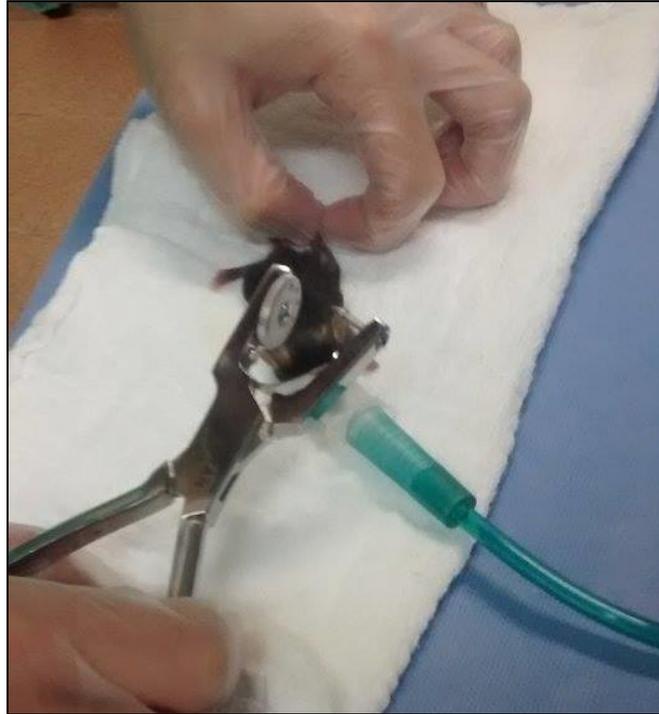


Figura 10: Coleta de parte da orelha com furador.

Após a coleta foi feita a extração de DNA do tecido (cerca de 3mm) dos camundongos com protocolo de extração padrão do Centro de Terapia Gênica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, a seguir o DNA das amostras era quantificado em Nano Drop e eram feitas diluições até a obtenção de amostras com 50ng/uL de DNA. A genotipagem foi feita através da identificação molecular do transgene, realizada pela técnica de PCR (padronizada pela pesquisadora durante o período que os animais estavam em processo de importação) através da amplificação da região inserida ou da ausência de amplificação da região inserida utilizando os primers *IDS* Reverso Normal 5'- CCC ATC AAA GCA ATC ACT AAA GA -3', *IDS* Reverso Mutado 5'- AAG AGG ACT GCG TGT GG -3' e *IDS* Comum 5'- TCT GTT TCT TAT AGA TCG CCC ACT T-3'. Utilizando estes primers, nos animais normais foi esperada a amplificação de um fragmento de 435 pb, enquanto nos MPS II o

fragmento foi de 318 pb. Os fragmentos foram então analisados em gel de agarose 1.5%.

3.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Foi caracterizado um grupo de animais machos MPS II e outro grupo composto por animais machos hemizigotos para o gene da IDS (normais), que foram utilizados como controle normal. Os animais foram pesados em diferentes tempos, e sacrificados aos 2, 4, 6 ou 8 meses de idade.

Ao final de cada tempo os animais foram eutanasiados por sobredose anestésica do agente inalatório Isoflurano 9-12% até a promoção de parada cardiorrespiratória e, após, deslocamento cervical. Coração, fígado, sangue, baço, pulmões, rins, aorta ascendente, testículos, cérebro, e olhos foram coletados e armazenados em -80°C e em formalina tamponada para serem utilizados em estudos futuros. Em relação às patas, uma foi mantida em formalina tamponada e subsequentemente descalcificada com EDTA 14% para confecção de lâmina histológica, enquanto que a carcaça do animal com a outra pata foi armazenada em -80°C para posterior realização do raio-X. Embora o “n” inicial de animais tenha sido previsto em 8 animais/grupo a cada tempo, variações nesse número em cada teste aconteceram por coleta inadequada da amostra ou razões orçamentárias. O número de animais em cada teste foi indicado ao longo do texto.

3.3 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

O joelho de uma das patas traseiras de cada camundongo foi coletado, após a eutanásia, e armazenado em formalina tamponada, descalcificado com EDTA para haver remoção dos sais de cálcio que se encontram depositados nos tecidos orgânicos sem alteração da sua estrutura celular e emblocado em parafina. Secções (7µm de espessura) foram coradas com hematoxilina/eosina (HE) e alcian blue (AB) onde foi possível observar a arquitetura articular.

A extensão da doença articular foi marcada identificando as seguintes anormalidades analisadas com a coloração HE: presença de infiltrado inflamatório (0 – ausente, 1 – presente); reabsorção óssea (0 – ausente, 1 – leve, 2 – moderado, 3 – grave); reabsorção cartilaginosa (0 – ausente, 1 – leve, 2 – moderado, 3 – grave); e proliferação fibrocartilaginosa (0 – ausente, 1 – leve, 2 – moderado, 3 – grave) baseando-se num escore histológico desenvolvido pelo grupo para animais com MPS I (OLIVEIRA et al., 2013). A avaliação do escore foi realizada por um patologista que desconhecia os grupos e mesmo a idade dos animais.

3.4 ALTERAÇÕES NA PLACA DE CRESCIMENTO

O comprimento da placa de crescimento foi medido através do programa de computador Photoshop em cortes histológicos. Esta medida é importante, pois pacientes com MPS possuem baixa estatura, e isso pode ser devido a alterações na placa. Além disso, um patologista treinado mediu o tamanho de cada zona da placa de crescimento, sem conhecimento dos grupos de estudo.

Fotografias da placa de crescimento tibial (lâminas coradas por H-E) foram tiradas em aumento de 20X, que posteriormente formaram uma única imagem. O comprimento de cada placa de crescimento foi medido em cinco pontos distintos

localizados em toda sua extensão. Foi obtido um comprimento médio para cada animal.

3.5 AVALIAÇÃO DE ANORMALIDADES ÓSSEAS

Os ossos fêmur e zigomático dos animais eutanasiados foram congelados para armazenamento e, após descongelamento, foram submetidos ao exame de imagem por Raio-X, com objetivo de identificar alterações no tamanho e na espessura do fêmur e diâmetro do zigomático (GARCIA et al., 2007). As imagens foram obtidas e gravadas em computador. A análise da espessura dos ossos foi baseada por uma medida realizada no ponto médio do comprimento do osso.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados por teste T de student. O nível de significância utilizado foi de 5%. O número de animais por grupo por tempo foi estimado baseando-se nos resultados encontrados nos animais com MPS I previamente publicados pelo grupo (OLIVEIRA et al., 2013), utilizando como desfecho principal as diferenças no escore histológico. Neste estudo prévio, o escore dos animais MPS I aos 6 meses foi de 2.3 ± 1.4 contra 0.1 ± 0.3 nos animais normais.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA COLÔNIA

A colônia de camundongos nocaute foi mantida na Unidade de Experimentação Animal (UEA), no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Dos primeiros 50 nascimentos, 13 animais (26%) eram MPS II, o que é muito próximo do esperado (25%), sugerindo distribuição genotípica mendeliana, sem vantagens seletivas pré-natais nos animais MPS ou normais. O número de animais em cada grupo para as diferentes análises realizadas não foi o mesmo em virtude de limitações encontradas no decorrer do trabalho, como por exemplo, emblocamento inadequado de amostras, impossibilitando a análise histológica pelo patologista, ou número limitado de animais por placa de raio-x. O n utilizado em cada análise é apresentado na forma de tabela (análise histológica) ou na legenda de cada figura dos resultados.

No momento do nascimento, não é possível discernir visualmente os animais normais e MPS. As diferenças fenotípicas começam a ser notadas a partir de 2-3 meses de idade, com a principal diferença sendo um focinho menos afilado (mais arredondado) nos animais afetados. Além disso, nota-se que a pele dos animais MPS II parece ficar progressivamente mais “enrugada” (com dobras), o que pode ser devido ao acúmulo de GAG na pele. Outras anormalidades encontradas na colônia incluem falhas no pelo, além de que 2 animais pertencentes ao grupo MPS II de 8 meses tiveram sarna (foram devidamente tratados e curados). Com relação a estes últimos achados, acredita-se que não esteja relacionado com a doença.

Os animais foram pesados antes de serem eutanasiados, sendo que o grupo normal aos 2 meses apresentou média de 24,3g (desvio padrão 1,7g); o grupo MPS II aos 2 meses apresentou média de 24,5g ($\pm 2,9$ g); o grupo normal aos 4 meses apresentou média de 28,2g ($\pm 1,9$ g); o grupo MPS II aos 4 meses apresentou média de 31,4g ($\pm 1,9$ g); aos 6 meses os camundongos normais pesaram 31,2g ($\pm 2,8$ g) e o grupo MPS II 31,4g ($\pm 1,9$ g); o grupo normal aos 8 meses apresentou média de 29,4g ($\pm 2,7$ g), enquanto o grupo MPS II pesou 36,1g ($\pm 2,1$ g) (figura 11). Conforme os animais foram envelhecendo, pode-se perceber que o peso do grupo MPS II a partir dos 4 meses passou a ser significativamente maior ($p=0,004$) do que o peso dos animais normais da mesma idade. Aos 6 meses não houve diferença no peso entre os grupos MPS II e normal e aos 8 meses foi observado novamente aumento significativo ($p=0,008$) do peso dos animais do grupo MPS II em relação aos animais normais desta idade. Esta diferença mostrou-se mais acentuada aos 8 meses, com os animais MPS II apresentando um aumento de 29,7% no peso, comparado aos normais (Figura 11).

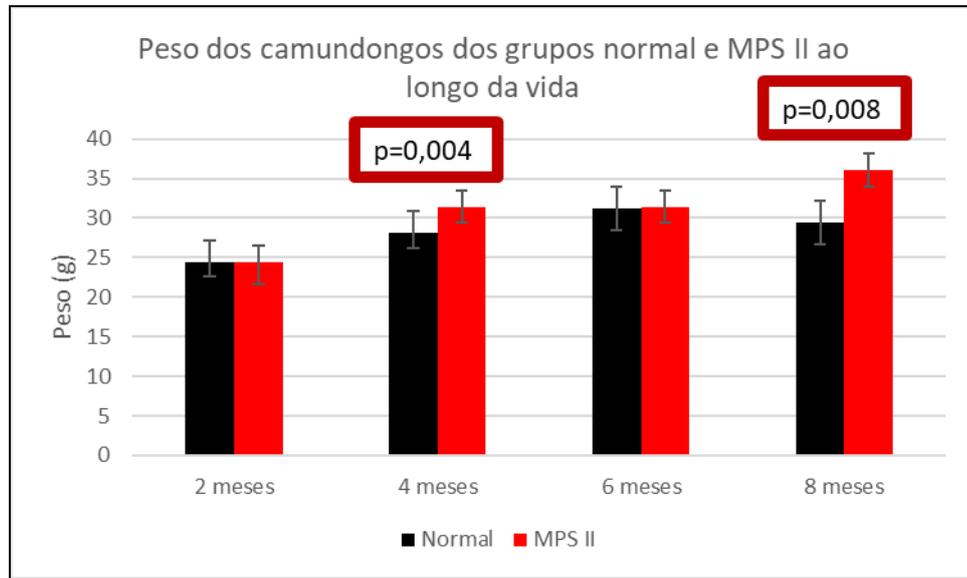


Figura 11: Peso dos camundongos dos grupos normal e MPS II ao longo da vida. Grupo normal 2 meses N=10; grupo MPS II 2 meses N=12; grupo normal 4 meses N=8; grupo MPS II 4 meses N=9; grupo normal 6 meses N=7; grupo MPS II 6 meses N=7; grupo normal 8 meses N=6; grupo MPS II 8 meses N=6. Significâncias foram obtidas pelo Teste t de Student.

4.2 ESCORE HISTOLÓGICO

Devido a limitações (morte de animais, problemas na coleta de articulações), o número final de animais em cada grupo que pertenceram à análise histológica está representado na tabela 1:

Tabela 1. Número de animais por grupo que fizeram parte da análise histológica.

Grupo	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses	Total
Normal	8	5	7	6	26
MPS II	8	4	7	5	24

A patologista marcou a extensão da doença articular identificando as seguintes anormalidades analisadas com a coloração HE: presença de infiltrado inflamatório (0 – ausente, 1 – presente); reabsorção óssea (0 – ausente, 1 – leve, 2 – moderado, 3 – grave); reabsorção cartilaginosa (0 – ausente, 1 – leve, 2 – moderado, 3 – grave); e proliferação fibrocartilaginosa (0 – ausente, 1 – leve, 2 – moderado, 3 – grave). Os resultados do escore histológico para inflamação, reabsorção óssea, reabsorção cartilaginosa e proliferação fibrocartilaginosa, estão demonstrados respectivamente nas figuras 12, 13, 14, 15. Através deste escore, pudemos observar que os animais com MPS II desenvolvem uma doença articular apenas tardiamente, sendo a principal característica a presença de reabsorção cartilaginosa, presente em 80% (4/5) dos animais aos 8 meses. Outras anormalidades encontradas neste tempo foram presença de infiltrado inflamatório (2/5 aos 8 meses) e proliferação fibrocartilaginosa (1/5).

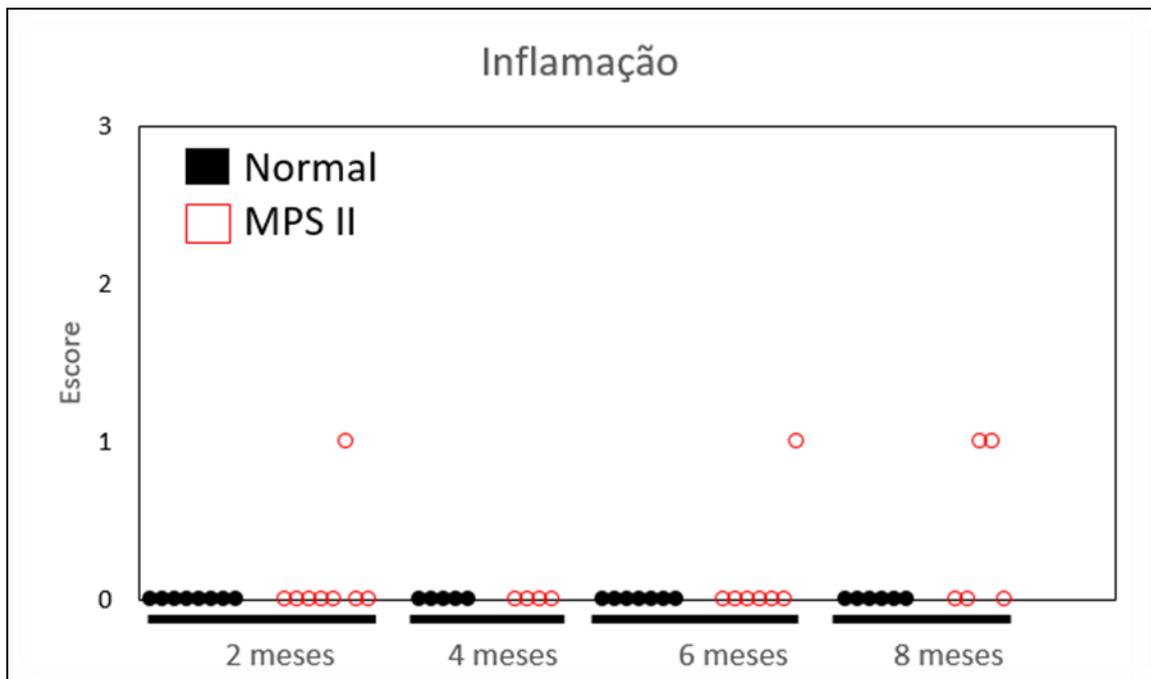


Figura 12: Resultado do escore histológico – Inflamação (avaliada como presente ou ausente). Cada ponto representa o escore de um animal.

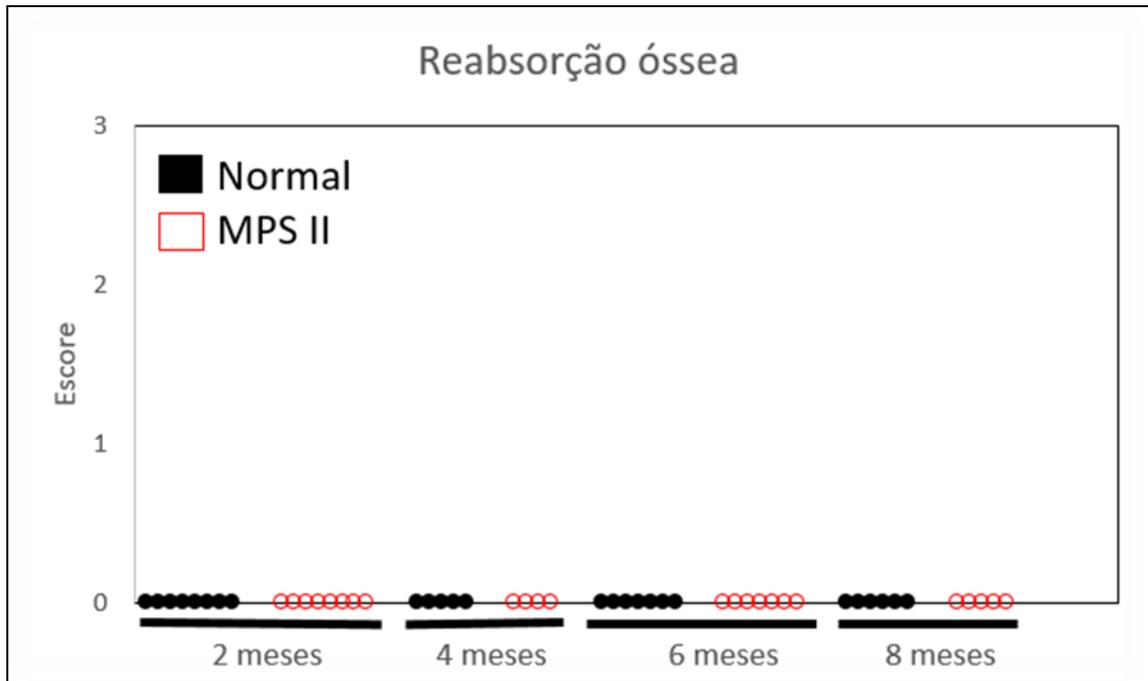


Figura 13: Resultado do escore histológico – Reabsorção óssea (avaliada de 0 a 3). Cada ponto representa um animal.

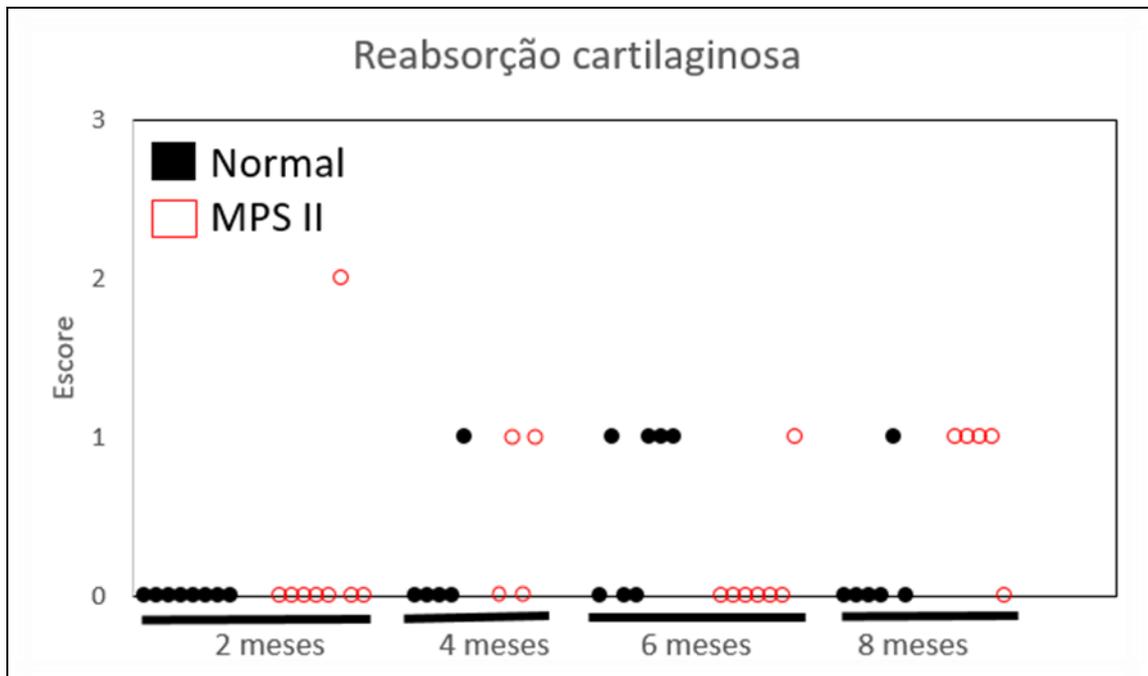


Figura 14: Resultado do escore histológico – Reabsorção cartilaginosa (avaliada de 0 a 3).

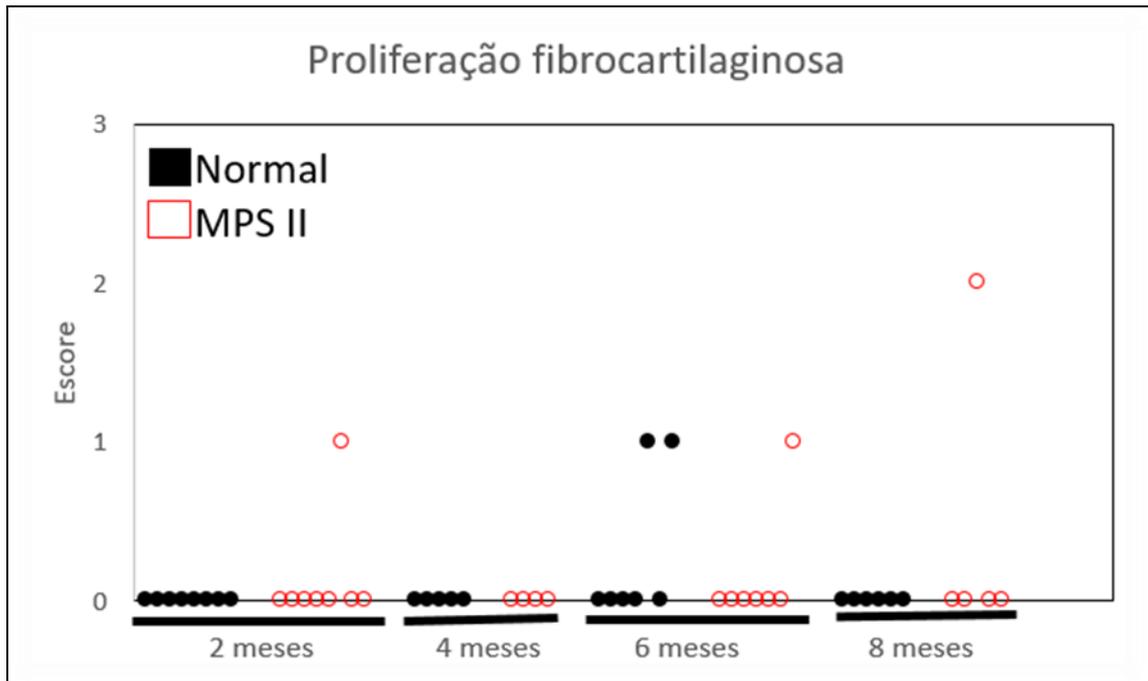


Figura 15: Resultado do escore histológico – Proliferação fibrocartilaginosa, avaliada de 0 a 3. Cada ponto representa um animal.

Já na figura 16 é apresentado o escore final, onde foram somados todos os pontos atribuídos pela patologista em cada anormalidade (inflamação, reabsorção óssea, reabsorção cartilaginosa e proliferação fibrocartilaginosa) e foi observada diferença significativa ($p=0,035$) entre o grupo normal 8 meses e o grupo MPS II 8 meses.

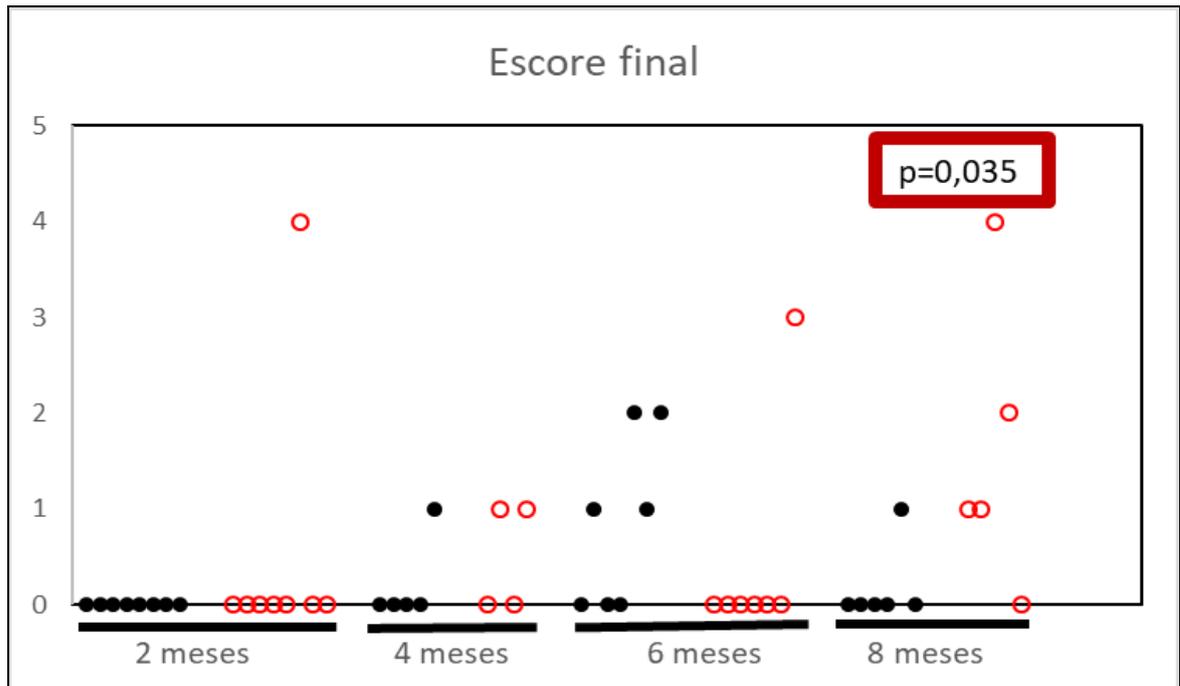


Figura 16: Resultado do escore histológico final. Houve diferença significativa apenas aos 8 meses.

A seguir são apresentadas imagens microscópicas (coloração HE e AB) da arquitetura da articulação do joelho de um animal normal com 8 meses (figura 17), de um animal MPS II com 2 meses (figura 18) e de um animal MPS II com 8 meses (figura 19). Na figura 19 as setas indicam áreas de reabsorção intensa da cartilagem com início de reabsorção óssea, o asterisco sinaliza proliferação fibrocartilaginosa e a ponta da seta indica presença de resposta inflamatória na área sinovial.

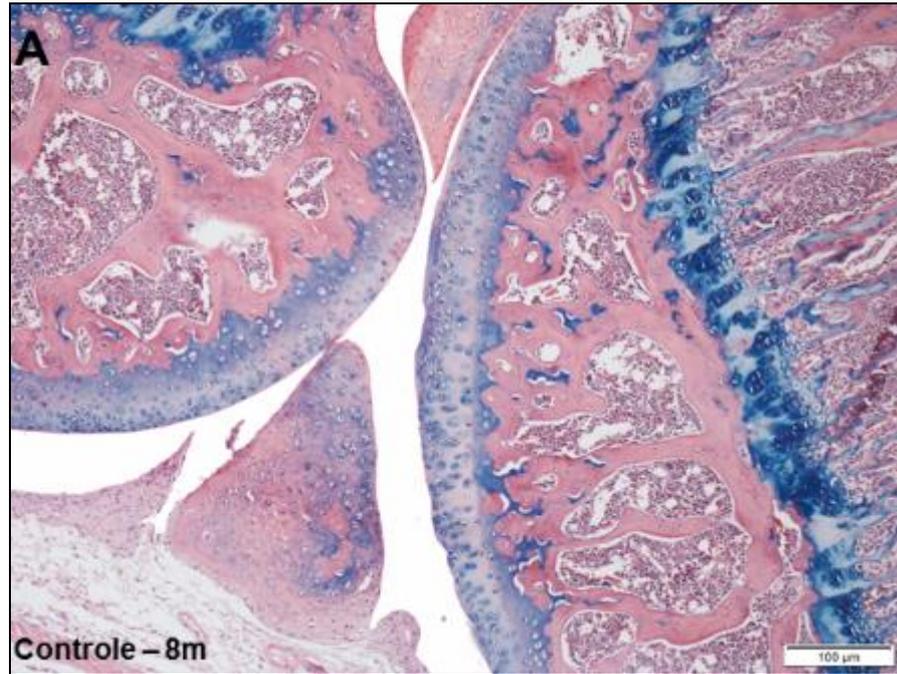


Figura 17: Microscopia HE e Alcian Blue animal normal 8 meses.

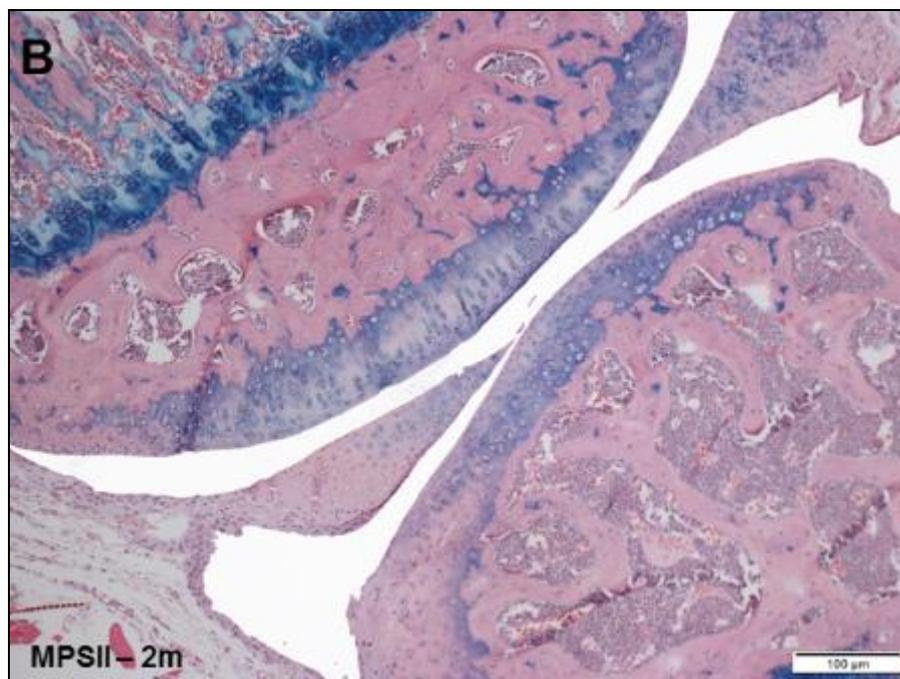


Figura 18: Microscopia HE e Alcian Blue animal MPS II com 2 meses.

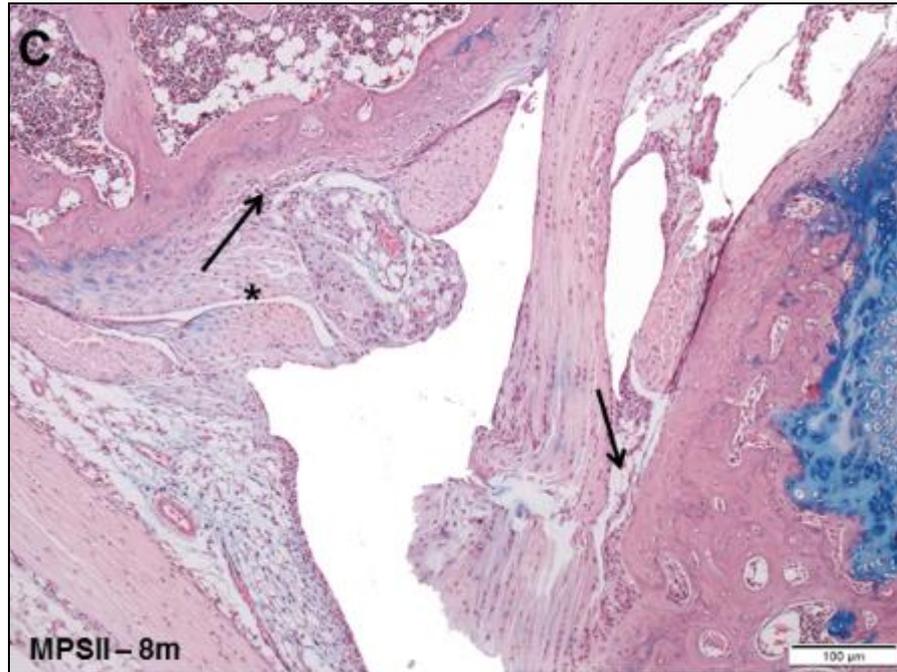


Figura 19: Microscopia HE e Alcian Blue animal MPS II 8 meses. As setas indicam áreas de reabsorção intensa da cartilagem com início de reabsorção óssea, o asterisco sinaliza proliferação fibrocartilaginosa e a ponta da seta indica presença de resposta inflamatória na área sinovial.

4.3 TAMANHO DAS ZONAS DE CARTILAGEM DA PLACA DE CRESCIMENTO ÓSSEO

As diferentes zonas da placa de crescimento foram analisadas em cada tempo. Os resultados foram analisados como porcentagem de cada zona, levando-se em conta o somatório das zonas como sendo o total. A hipótese é de que as alterações ósseas e principalmente no crescimento pudessem ser causadas por uma falha na diferenciação entre as camadas, não permitindo a conversão de cartilagem a osso.

Não houve diferença significativa na medida do tamanho das zonas de cartilagem da placa de crescimento ósseo entre os animais normais e os animais

MPS II em tempos diferentes (2 meses, 4 meses, 6 meses e 8 meses). Esses dados estão representados respectivamente nas figuras 20 a 23.

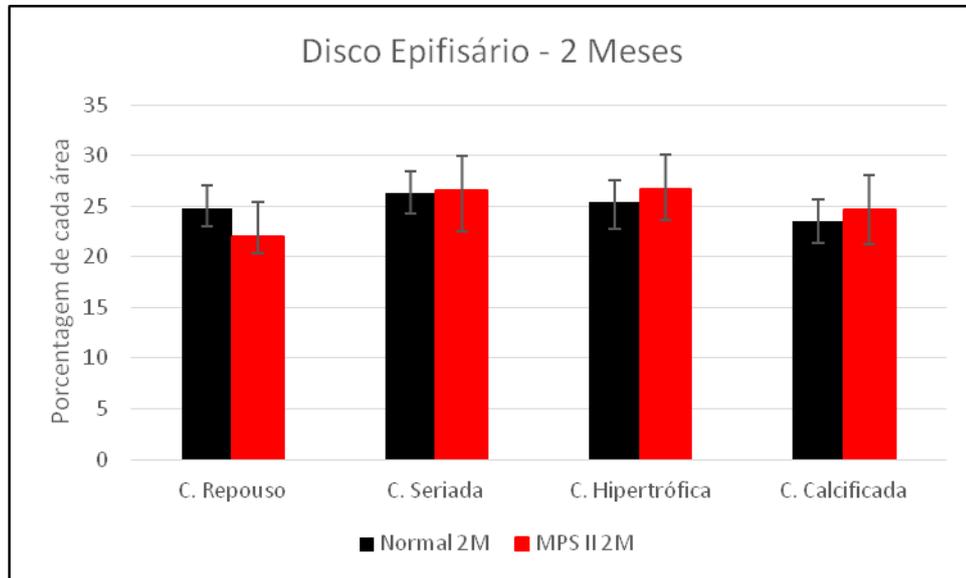


Figura 20: Medida das zonas do disco epifisário dos animais de 2 meses. N=8 por grupo.

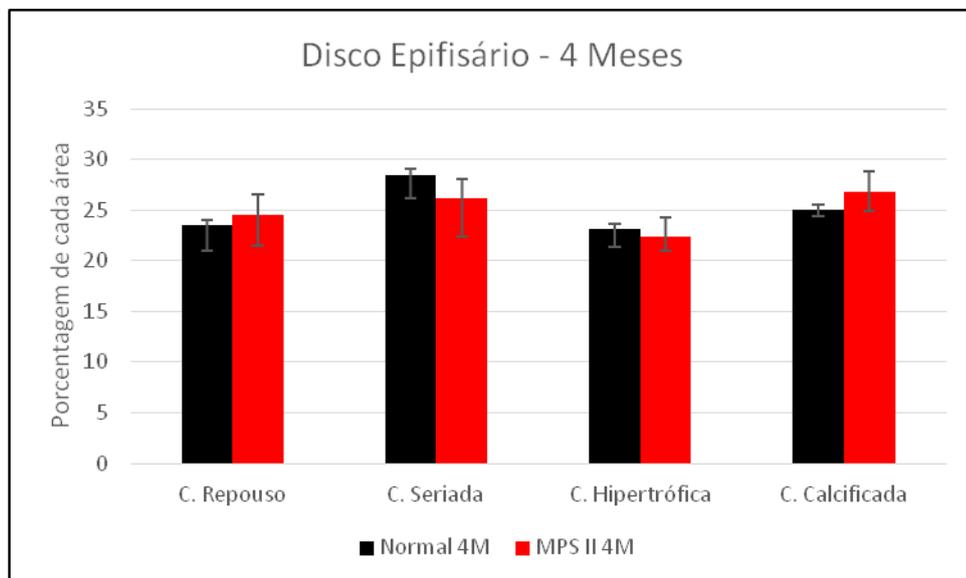


Figura 21: Medidas das camadas do disco epifisário dos animais de 4 meses. N=4 por grupo.

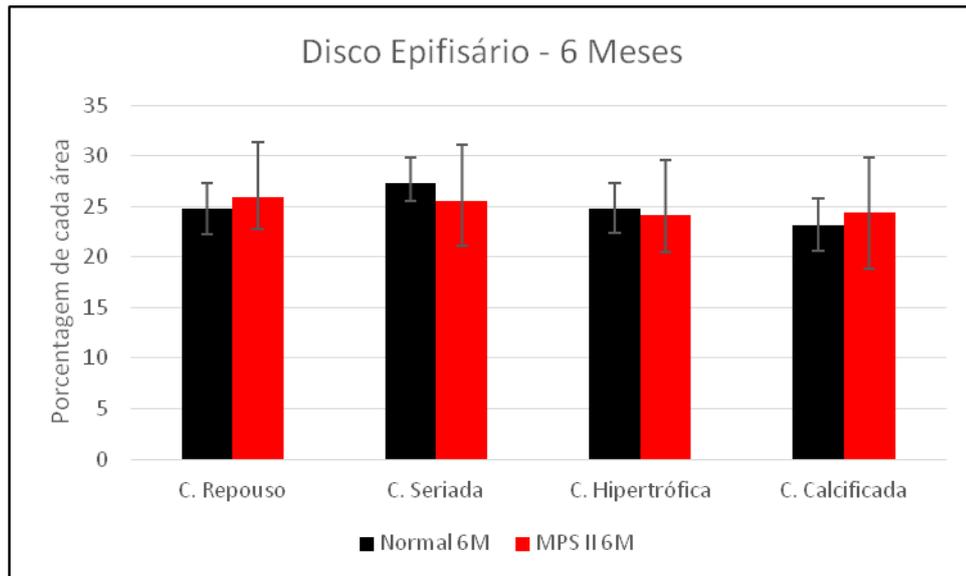


Figura 22: Medidas das camadas do disco epifisário dos animais de 6 meses. N=7-8 por grupo.

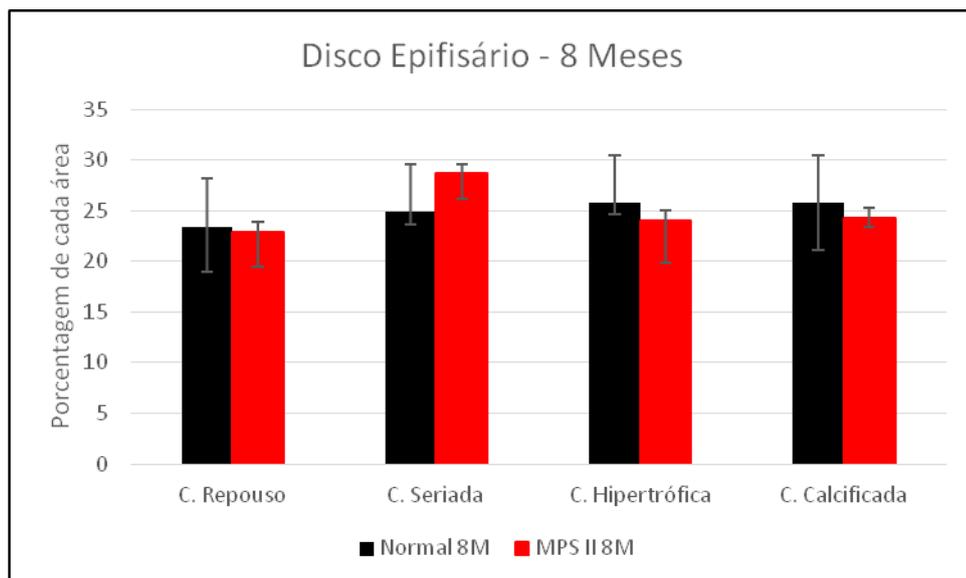


Figura 23: Medidas das camadas do disco epifisário dos animais de 8 meses. N=4 por grupo.

4.4 ANORMALIDADES OBSERVADAS NOS RAIOS-X

Os ossos fêmur e zigomático dos animais eutanasiados foram submetidos ao exame de imagem por Raio-X. Estes ossos foram escolhidos devido a presença

de alterações visíveis na face (zigomático), e por representar um osso longo (fêmur). A partir das imagens do raio-X identificamos possíveis alterações no tamanho e na espessura do fêmur e diâmetro do zigomático, sendo tais medidas expressas em milímetros. Todas as carcaças dos animais foram descongeladas ao mesmo tempo e as radiografias foram realizadas no mesmo dia, as análises foram realizadas por um pesquisador cego e calibrado e o software utilizado para a análise foi o Image Pro Plus 6.

As medidas em diâmetro do osso zigomático (figura 24) apresentaram-se significativamente superiores ($p \leq 0,01$) nos animais MPS II aos 4 meses, 6 meses e 8 meses. Em relação à medida de comprimento do fêmur (figura 25) houve diferença significativa ($p \leq 0,01$) entre os grupos apenas aos 8 meses, com os animais MPS II apresentando tamanho do fêmur aumentado. Cabe ressaltar que o número de animais com raio-x neste tempo ($n= 2$) é muito pequeno, sendo considerado um achado incidental, ou no mínimo inconclusivo. Já, quanto à espessura do fêmur (figura 26), apenas os animais do grupo de 6 meses de idade mostraram diferença significativa ($p \leq 0,01$) comparados aos MPS II, sendo que os animais MPS II aos 8 meses possuem clara tendência a possuírem espessura do fêmur maior, mostrando o caráter progressivo das alterações encontradas aos 6 meses. No entanto, novamente limitações com relação ao “n” não permitiram que o resultado fosse significativo.

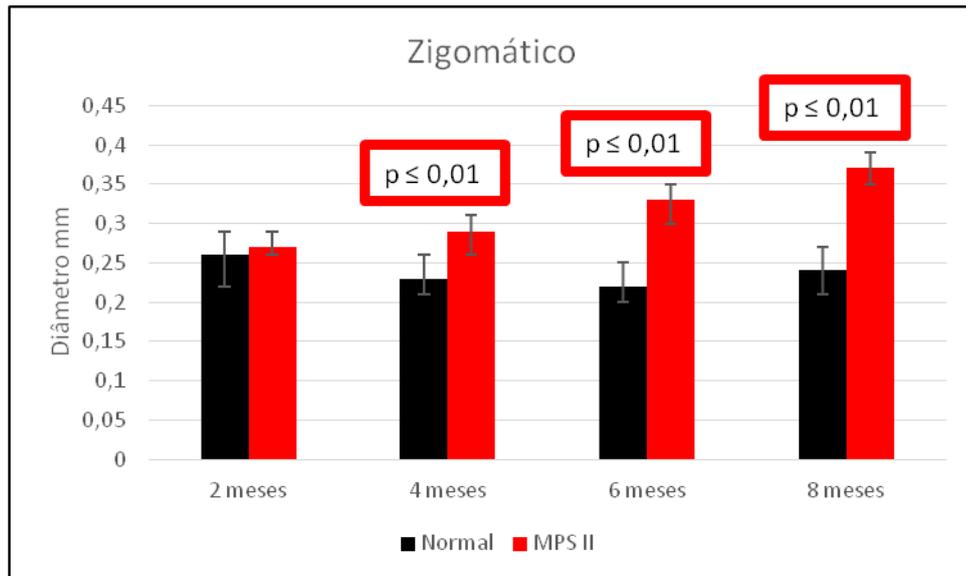


Figura 24: Diâmetro em mm do Zigomático ao longo do tempo analisado por raio-X. Grupo normal 2 meses N=4; grupo MPS II 2 meses N=5; grupo normal 4 meses N=5; grupo MPS II 4 meses N=5; grupo normal 6 meses N=6; grupo MPS II 6 meses N=3; grupo normal 8 meses N=2; grupo MPS II 8 meses N=5 (o mesmo n foi utilizado para as análises de comprimento e espessura do fêmur).

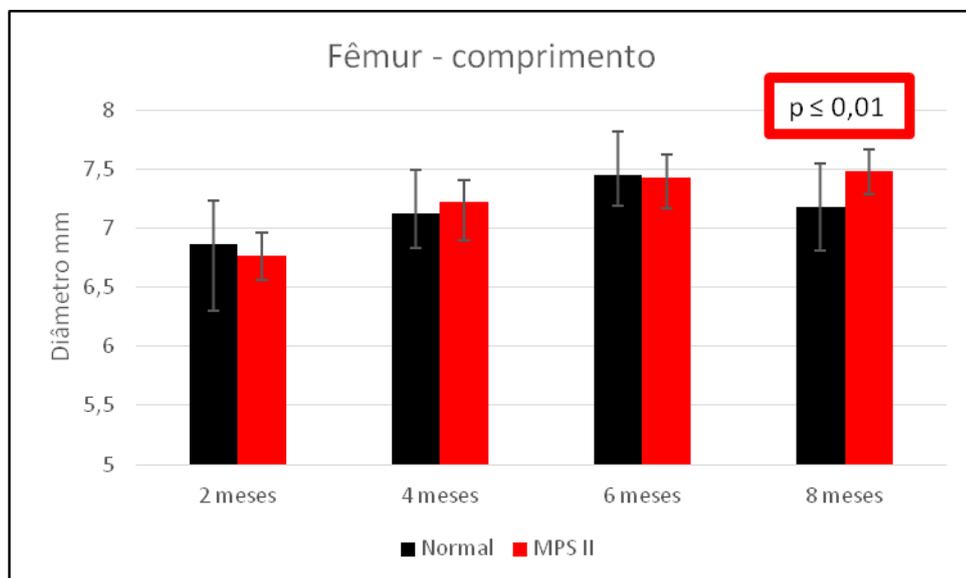


Figura 25: Comprimento do Fêmur em mm analisado por raio-X. O N de animais segue o da figura 24.

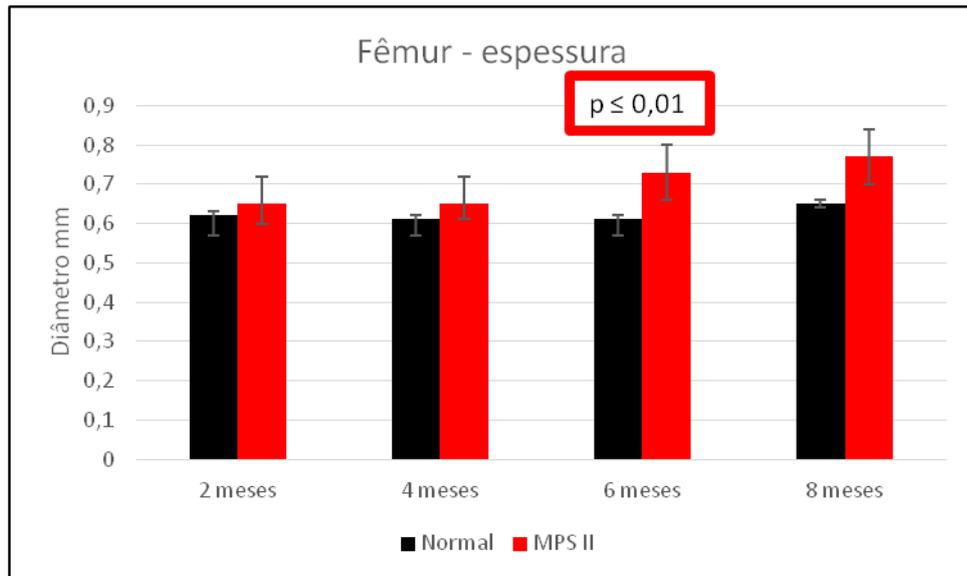


Figura 26: Espessura do Fêmur em mm analisado por raio-X. O N de animais segue os da figura 24.

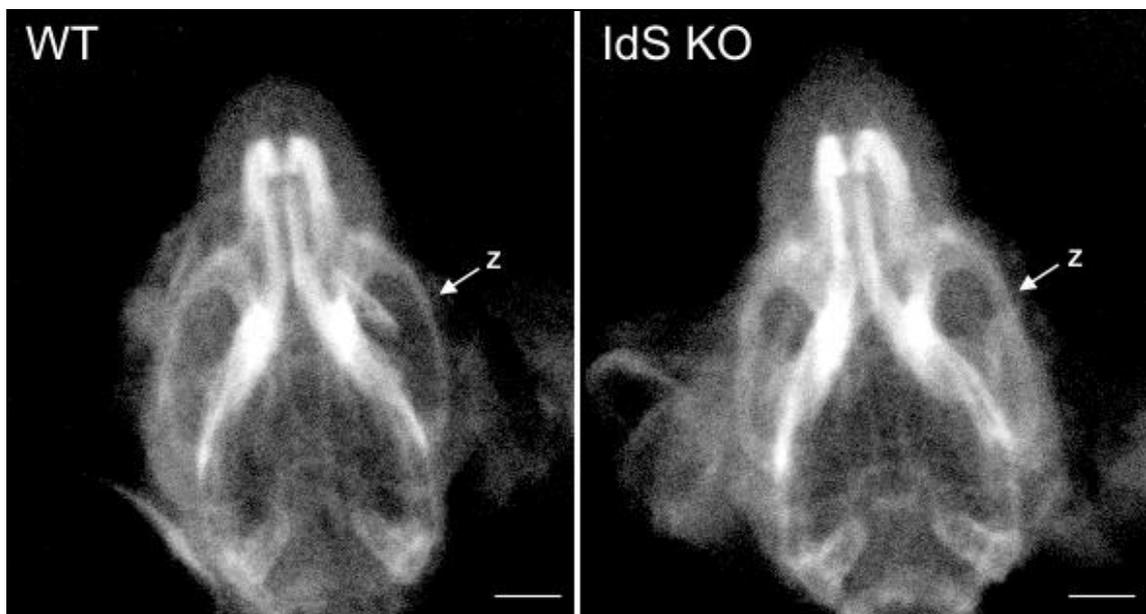


Figura 27: Exemplo do zigomático de um animal normal e MPS II. Na esquerda imagem radiológica de um animal de 8 meses normal (WT). Na imagem da direita, radiografia de um animal de 8 meses MPS II (IdS KO). As setas indicam o osso zigomático onde é possível observar a diferença na espessura do osso de um animal normal com 8 meses em relação à espessura do osso de um animal MPS II da mesma idade. A escala das imagens corresponde a 2 milímetros.

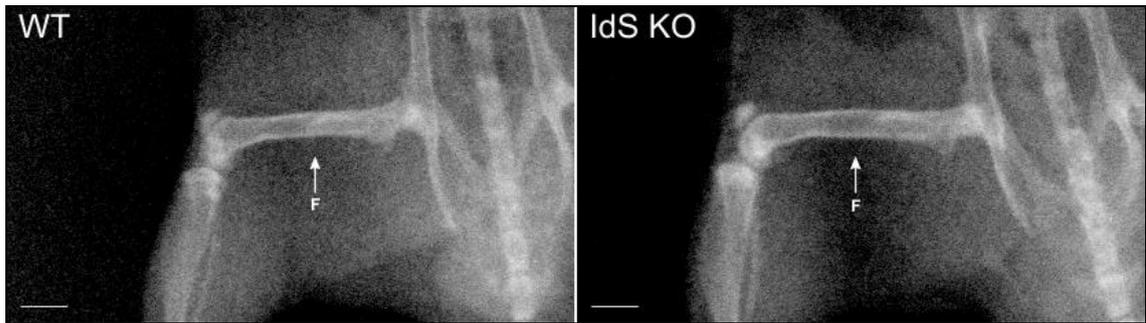


Figura 28: Análise do fêmur. Na esquerda, imagem radiológica de um animal de 8 meses normal (WT, wild type), já na imagem da direita é apresentada a radiografia de um animal de 8 meses MPS II (IdS KO). As setas indicam o osso fêmur, sendo possível observar a diferença na espessura do osso de um animal normal com 8 meses em relação à espessura do osso de um animal MPS II da mesma idade. A escala das imagens corresponde a 2 milímetros.

5 DISCUSSÃO

Uma vez que os tratamentos existentes para a doença articular e óssea em pacientes com MPS II apresentam poucos resultados na correção de distúrbios já estabelecidos, é de suma importância que sejam realizados estudos com enfoque na patogênese da doença, buscando elucidar os mecanismos envolvidos neste processo patológico (KUBASKI et al., 2017). As fases iniciais do desenvolvimento de novos tratamentos impreterivelmente passam por estudos em modelos animais, e nesse sentido, é essencial conhecer como a doença progride no animal estudado.

Foi utilizado então, neste estudo, um modelo animal de MPS II no qual camundongos da linhagem C57/BL6 tiveram o gene da IDS nocauteado. No vigésimo primeiro dia de vida dos animais era realizada coleta de parte da orelha com um furador, para extração de DNA e posterior identificação destes através da técnica de PCR que garantia a genotipagem correta de cada camundongo para que houvesse a separação dos grupos em controles normais e MPS II. Durante o desenvolvimento desses animais, algumas características macroscópicas foram observadas na colônia, como alterações no formato do focinho (mais arredondado) que podem estar diretamente relacionadas com alterações ósseas que foram encontradas nas análises radiológicas. Houve também, aumento do peso dos animais MPS II em comparação com os animais normais no decorrer do tempo. Aos 6 meses os animais MPS II não apresentaram aumento significativo do peso em relação aos animais controles normais, mas como foi observado aumento significativo do peso dos animais MPS II aos 4 e aos 8 meses de idade, não

devemos descartar a hipótese de que os animais normais do grupo de 6 tenham sido pesados de forma inacurada.

O fato dos animais MPS II apresentarem aumento de peso em relação aos animais normais durante seu desenvolvimento pode estar diretamente ligado a alterações do metabolismo. Uma vez que a MPS II se trata de uma doença genética relacionada a um erro inato do metabolismo, suas consequências no organismo devido ao acúmulo de substrato (GAGs) nas células, podem gerar desordens dependendo da quantidade de acúmulo do substrato, alterando processos celulares envolvidos, como por exemplo, tráfego intracelular, autofagia e a transdução de sinal (FACCHIN, 2012). Outros trabalhos já demonstraram que uma série de adaptações metabólicas precisam ocorrer nos animais com MPS, devido à interrupção na degradação de GAG, causando, por exemplo, maior catabolismo proteico em outros modelos de MPS (WOLOSZYNEK et al., 2009). Para investigar os processos envolvidos no ganho de peso dos animais MPS II, em virtude de alterações celulares causadas pela doença, em estudos futuros pretendemos identificar o padrão de deposição de gordura nesses animais, bem como outras alterações metabólicas.

Outra hipótese para o aumento de peso em animais MPS II pode estar associada ao comprometimento do sistema articular e ósseo (discutido a seguir), pois reduzindo a amplitude, quantidade e intensidade de movimentos, o gasto energético também pode se tornar menor, facilitando o aumento de peso. Entretanto, estudo realizado para identificar o gasto energético na marcha de pacientes com MPS mostrou que este gasto é duas vezes mais alto em pacientes MPS do que em pacientes assintomáticos, logo, pelos resultados apresentados nesse estudo, essa hipótese não justificaria o aumento de peso desses animais (MATOS et al., 2013).

Após as análises de alterações fenotípicas visuais na colônia, objetivamos neste trabalho avaliar se os animais com MPS II apresentam alterações nas articulações, que pudessem ser detectadas através de um escore desenvolvido pelo nosso grupo para a MPS I (OLIVEIRA et al., 2013). A MPS I é uma doença que também se caracteriza pelo acúmulo de dermatan e heparan sulfato, e as enzimas deficientes são sequenciais na via de degradação destes compostos. Uma vez que as características clínicas da MPS I e II são muito similares, nos pareceu lógico que as alterações histológicas também pudessem ser avaliadas da mesma forma.

Diferentemente da MPS I, quando alterações já puderam ser detectadas através do escore aos 6 meses de idade, no presente trabalho, demonstramos que estas alterações na MPS II apenas aparecem mais tarde, aos 8 meses. Ainda assim, elas foram muito discretas, caracterizadas por uma leve inflamação e por uma reabsorção da cartilagem, sem outros processos detectados, como reabsorção óssea. De forma interessante, o processo apresentado pelos animais com MPS II lembra o de uma osteoartrite leve (PRITZKER et al., 2006). Por este motivo, nossos próximos passos serão tentar utilizar nestas amostras outros escores histológicos já estabelecidos para osteoartrite, tentando diferenciar os grupos mais cedo. Como exemplo de escore a ser testado, podemos citar o escore de Mankin, que considera, além do H-E, resultados de outras colorações, como a Safranina -O (MANKIN et al., 1971). Uma diminuição na marcação de Safranina-O também já foi demonstrada na MPS I (OLIVEIRA et al., 2013), o que nos faz crer que possivelmente este outro escore possa ser mais adequado para detectar alterações mais precoces.

Ainda referente aos dados obtidos no escore histológico, pode-se observar que os camundongos MPS II iniciam a vida normais e desenvolvem as alterações de forma tardia, o que reforça a hipótese de que seja realmente um processo

degenerativo articular que ocorre neste modelo, e não um defeito de má-formação, por exemplo. A presença de reabsorção cartilaginosa presente em 80% dos animais MPS II aos 8 meses pode estar relacionada diretamente com dores articulares e com o desencadeamento de alterações ósseas (DANI; AZEVEDO, 2006) futuras, que foram observadas em animais com MPS I em estágios tardios (OLIVEIRA et al., 2013).

Outra característica clínica encontrada nos pacientes é a baixa estatura. Um estudo recente tratando pacientes com hormônio de crescimento demonstrou que não existe deficiência deste em crianças com MPS I ou II, e que a suplementação com o hormônio não causa alteração significativa na estatura (POLGREEN et al., 2014). Portanto, outros mecanismos devem ser os responsáveis por este achado clínico.

Nossa principal hipótese era de que a baixa estatura poderia estar relacionada com alterações na placa de crescimento ósseo. Portanto, buscamos identificar essas supostas alterações em cada região da placa (cartilagem de repouso, seriada, hipertrófica e calcificada). No entanto, os camundongos MPS II não apresentaram diferença no tamanho das zonas de cartilagem da placa de crescimento ósseo, quando comparados aos animais controles da mesma idade. Estudo realizado com animais MPS I mostrou também que haviam pouquíssimas alterações na placa de crescimento ósseo dos animais pertencentes à pesquisa em questão (OLIVEIRA et al., 2013). Já animais com outros tipos de MPS, como a MPS VII, apresentam claramente uma diminuição no tamanho dos ossos (XING et al., 2015). A MPS VII acumula também condroitin sulfato além dos GAGs que se acumulam na MPS I e II. Portanto, é possível que vias ou processos alterados em razão do acúmulo de condroitin sulfato também tenham que estar presentes para

este achado clínico ser reprodutível nos animais. De qualquer forma, estes resultados nos permitem concluir que os animais MPS II não reproduzem uma das características comum aos pacientes, que é a baixa estatura (PARINI et al., 2016).

Alterações ósseas em camundongos MPS II tornaram-se evidentes nos resultados das análises de imagens radiológicas e confirmaram algumas das alterações observadas a olho nu. A maior espessura dos ossos em animais MPS II quando comparados a animais controle sugere que possa haver uma espécie de acondroplasia (anormalidade na ossificação das cartilagens), uma das causas de nanismo, característica que é observada nos pacientes MPS II (SANTOS, 1975).

As principais causas de processos acondroplásicos são mutações no gene FGFR3, que codifica um receptor celular controlador da maturação da cartilagem óssea e, portanto, participa no crescimento e formação correta dos ossos. No entanto, estudo em animais com MPS VII nocautes também para este gene revelou que o mecanismo de anormalidades ósseas nesta doença ocorre independente da via ativada pelo FGFR3. Este mesmo estudo sugere que uma alteração na fosforilação de outra proteína, a STAT-3, poderia ter um papel na redução de tamanho de ossos longos (METCALF et al., 2009), mas como este achado não foi encontrado neste modelo animal, outras vias de sinalização terão que ser estudadas. Uma hipótese levantada pelo grupo a partir destes dados e do conhecimento da literatura seria de que o acúmulo de GAG nestes tecidos possa ter influência sobre osteoclastos e osteoblastos e cause um desbalanço na atividade destas células. Trabalhos futuros do grupo tentarão investigar este tópico.

Com os dados obtidos a partir desta pesquisa, pudemos observar que a doença articular e óssea presente nos camundongos com MPS II se apresentou de forma tardia e em virtude de todos os resultados obtidos através desse trabalho,

tornou-se possível caracterizar a progressão da doença articular e óssea em camundongos com MPS II até os 8 meses de idade. A partir dessa caracterização, os estudos devem continuar em busca de alternativas eficazes para o tratamento da doença articular e óssea em pacientes com Síndrome de Hunter, na tentativa de melhorar a qualidade de vida desses indivíduos.

6 CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho nos permitem concluir que:

- As anormalidades na articulação tíbio-femural dos animais pode ser analisada através do escore histológico previamente publicado pelo grupo para MPS I, tendo sido detectadas diferenças aos 8 meses de idade.

- Não foram detectadas anormalidade óbvias na estrutura da placa de crescimento. O tamanho total da placa ou de suas zonas não foi diferente entre os animais normais e MPS II.

- Foi observado um aumento na espessura do fêmur e do zigomático nos animais MPS II ao longo da vida, mas sem alterações no comprimento do fêmur.

REFERÊNCIAS

ALEGRA, T. et al. Eficácia e segurança da terapia com idursulfase em pacientes com mucopolissacaridose tipo II, com e sem comparação com placebo: revisão sistemática e metanálise. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 29, supl. 1, p. s45-s58, nov. 2013.

BALDO, G. et al. Bone marrow cells reduce collagen deposition in the rat model of common bile duct ligation. *Cell. Sci. Ther.*, v. 2 ,p. 1–6, 2011.

BOND, C. S. et al. Structure of a human Lysosomal sulfatase. *Structure*, v. 5, p. 277-89, 1997.

BONDESON, M. L. et al. Presence of an IDS-related locus (IDS2) in Xq28 complicates the mutational analysis of Hunter syndrome. *Europ J Hum Genet.* v. 3, p.219-27, 1995.

BROOKS, D.A. et al. Significance of immune response to enzyme-replacement therapy for patients with a lysosomal storage disorder. *Trends Mol Med.*, v. 9, n. 10, p. 450-3, 2003.

BRUSIUS-FACCHIN, A.C. et al. Extension of the molecular analysis to the promoter region of the iduronate 2-sulfatase gene reveals genomic alterations in mucopolysaccharidosis type II patients with normal coding sequence. *Gene*, v. 526, n. 2, p. 150-4, 2013.

DANI, W. S.; AZEVEDO, E. Osteoartrose do quadril. *Temas de Reumatologia Clínica*, v. 7, n. 2, p. 38-45, abr. 2006.

FACCHIN, A. C. B. *Análise molecular de pacientes com Mucopolissacaridose tipo II*. Tese de doutorado pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2012.

FERNÁNDEZ, E.G. *Análisis genético molecular del Síndrome de Maroteaus-Lamy*. Tese de Doutorado pela Universidade de Barcelona. 2012.

GARCIA, A.R. et al. The characterization of a murine model of mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome). *J Inherit Metab. Dis.*, v.30, p. 924-934, 2007.

GIULIANI, R. et al. Mucopolysaccharidosis I, II, and VI: Brief review and guidelines for treatment.. *Genetics and Molecular Biology*, v. 33, p. 589-604, 2010.

GOKDOĞAN, Ç. et al . Avaliação audiológica em crianças com mucopolissacaridose. *Braz. j. otorhinolaryngol.*, São Paulo, v. 82, n. 3, p. 281-284, jun. 2016.

GRUNERT, S.; NURCOMBE, V.; COOL, S. M. Stem cell fate decisions: the role of heparan sulfate in the control of autocrine and paracrine signals. *Curr stem cell res ther*, v. 3, p. 1-8, 2008.

HANSON, S. R., BEST, M. D., WONG, C. H. Sulfatases: structure, mechanism, biological activity, inhibition, and synthetic utility. *Angew Chem Int Ed Engl*. v. 43, n. 43, p. 5736-63, nov. 2004.

HOPWOOD, J. J., MORRIS, C. P. The Mucopolysaccharidoses. *Diagnosis, Molecular Genetics and Treatment. Mol. Biol. Med.* v. 7, p. 381-404, 1990.

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS – USP. Disponível em: <www.icb.usp.br>
Acesso em: 20 ago. 2017.

KAKKIS, E. D. et al. Enzyme replacement therapy in feline mucopolysaccharidosis I. *Mol Genet Metab* v. 72, p. 199–208, 2001.

KIERSZENBAUM, A. L.; TRES, L. L. *Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia*. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

KUBASKI, F. et al. Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Patients with Mucopolysaccharidosis II. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, v. 23, n. 10, p. 1795-1803, oct. 2017.

MATOS, M. A. et al. Gasto energético na marcha em pacientes com mucopolissacaridose. *Acta ortop. bras.*, São Paulo, v. 21, n. 2, p. 116-119, apr. 2013.

MANKIN H. J. et al. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. II Correlation of morpholog with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg*, v. 53, p. 523-537, 1971.

METCALF, J. A. et al. Mechanism of shortened bones in mucopolysaccharidosis VII. *Mol Genet Metab*, v. 97, n. 3, p.202-11, jul. 2009.

NEUFELD, E. F.; MEUNZER, J. The mucopolysaccharidoses. In Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S and Valle D. Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease. McGraw-Hill: New York. p. 3421-3452, 2001.

OLIVEIRA, P. G., et al. Characterization of joint disease in mucopolysaccharidosis type I mice. *Int. J. Exp. Path.*, v. 94, p. 305-311, 2013.

PARINI, R. et al. The natural history of growth in patients with Hunter syndrome: Data from the Hunter Outcome Survey (HOS). *Mol Genet Metab*, v. 117, n. 4, p. 438-446, abr. 2016.

PASTORES, G. M.; MEERE, P. A. Musculoskeletal complications associated with lysosomal storage disorders: Gaucher disease and Hurler-Scheie syndrome (mucopolysaccharidosis type I). *Curr. Opin. Rheumatol.*, v. 17, p. 70-78, 2005.

PERETTI, T. et al. Heparanase-2, syndecan-1, and extracellular matrix remodeling in colorectal carcinoma. *Eur j Gastroenterol hepatol.*, v. 20, p. 756-765, 2008.

POLGREEN, L. E. et al. Effect of recombinant human growth hormone on changes in height, bone mineral density, and body composition over 1-2 years in children with Hurler or Hunter syndrome. *Mol Genet Metab.*, v. 111, n. 2, p. 101-106, fev. 2014.

PRITZKER, K. P. et al. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Cartilage*, v. 14, n. 1, p. 13-29, jan. 2006.

RAMAN, R.; SASISEKHARAN, V.; SASISEKHARAM, R. Structural insights into biological roles of proteoglycosaminoglycan interactions. *Chem boil*, v. 12, p. 267-277, 2005.

SANTOS, J. A. *Patologia especial dos animais domésticos (mamíferos e aves)*. Instituto Interamericano de Ciências Agrícolas, Rio de Janeiro, p. 291 e 292, 1975.

THE JACKSON'S LABORATORY– Disponível em: <www.jax.org>. Acesso em 25 ago. 2017.

VELOSA, A. P. P.; TEODORO, W. R.; YOSHINARI, N. H. Colágeno na cartilagem osteoartrótica. *Rev. Bras. Reumatol.*, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 160-166, jun. 2003.

WILSON, P. J. et al. Hunter syndrome: isolation of an iduronate-2-sulfatase cDNA clone and analysis of patient DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 87, n. 21, p. 8531-5, nov.1990.

WOLOSZYNEK, J. C. et al. Metabolic adaptations to interrupted glycosaminoglycan recycling. *J Biol Chem.*, v.284, n. 43, p. 29684-91, out. 2009.

WRAITH, J. E. Mucopolysaccharidoses and mucopolipidoses. *Handb Clin Neurol.*, v. 113, p. 17723-9, 2013.

XING, E. M.; WU, S.; PONDER, K. P. The effect of Tlr4 and/or C3 deficiency and of neonatal gene therapy on skeletal disease in mucopolysaccharidosis VII mice. *Mol Genet Metab.*, v. 114, n. 2, p. 209-16, fev. 2015.