

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

**INVESTIGAÇÃO DE BIOMARCADORES EM MODELOS DE CAMUNDONGOS  
COM MUCOPOLISSACARIDOSE I E II**

Isabelly Maria Barros De Lima

Porto Alegre,

Junho, 2021.

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

**INVESTIGAÇÃO DE BIOMARCADORES EM MODELOS DE CAMUNDONGOS  
COM MUCOPOLISSACARIDOSE I E II**

Isabelly Maria Barros De Lima

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Dr. Guilherme Baldo.

Co-orientadora: Dra. Francyne Kubaski

Porto Alegre,

Junho, 2021.

Esse trabalho foi desenvolvido no Hospital das Clínicas de Porto Alegre (HCPA), no laboratório CTG (Células, Tecidos e Genes) vinculado à Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Essa dissertação é resultado de um projeto aprovado pela Comissão Científica do HCPA com base nos pareceres do Comitê de Ética em Pesquisa e Serviço de Gestão em Pesquisa do HCPA. O projeto foi financiado com recursos do Fundo de Incentivo à Pesquisa do HCPA (projeto de número 2019-0611). Além disso, a aluna recebeu bolsa de mestrado do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeira e principalmente à minha mãe, Marta Barros, por sempre estar ao meu lado, mesmo estando fisicamente separadas quase pelo Brasil inteiro. Te amo muito, mamãe. Obrigada por ser a melhor mãe que poderia existir. Sem seu apoio eu não teria concluído esse mestrado.

Agradeço também aos meus orientadores Dr. Guilherme Baldo e Dra. Francyne Kubaski por terem acreditado em mim e em nosso trabalho, assim como por terem me ensinado milhares de coisas nesses dois anos.

Impossível deixar de agradecer a cada participante do antigo Centro de Terapia Gênica (CTG). Obrigada por serem minha família em Porto Alegre e me ajudarem com questões acadêmicas e pessoais. Deixo aqui meu agradecimento especial para as quase doutoras Luisa Pimentel e Hallana Souza, por serem os meus suportes emocionais e por terem me ensinado tanto. Sem vocês eu também não teria chegado até aqui, vou sentir muita saudade.

Outras personagens essenciais desse trabalho foram as funcionárias da Unidade de Experimentação Animal (UEA): Marta Cioato, Dra. Daniela Campagnol e Dra. Tuane Garcez. Muito obrigada pela enorme ajuda com a logística das experimentações animais.

Agradeço à minha família que continuou me apoiando e sentindo orgulho de mim lá de Fortaleza. Obrigada pai, avós, tios, primos e minha irmã. Assim como agradeço aos amigos que sempre trouxeram um sorriso ao meu rosto mesmo nos momentos mais difíceis. Agradeço em especial à minha avó Terezinha (Mainha) que não está mais aqui, obrigada por me mostrar a força verdadeira que uma mulher tem, se a senhora estivesse aqui tenho certeza de que choraria de tanto rir com orgulho de mim.

Agradeço à UFRGS, ao HCPA e ao CNPq por terem me permitido estudar um assunto pelo qual sou realmente apaixonada.

Por fim, agradeço ao Professor Chico (Dr. Francisco Campos) e à Manu (Dra. Emanoella Soares) por acenderam minha paixão pela genética e biologia molecular.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>8</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>10</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>12</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
1.1 Doenças lisossômicas .....	13
1.2 Mucopolissacaridoses .....	14
1.3 Mucopolissacaridose tipo I .....	17
1.4 Mucopolissacaridose tipo II .....	18
1.5 Diagnóstico.....	19
1.6 Tratamento .....	24
1.7 Biomarcadores para MPS .....	25
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>29</b>
<b>2.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>29</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos .....</b>	<b>29</b>
<b>3. CAPÍTULOS.....</b>	<b>30</b>
3.1 Capítulo 1. Elevation of glycosaminoglycans levels and $\alpha$ -galactosidase A activity in Mucopolysaccharidosis I mouse model. ....	30
3.2 Capítulo 2. Glycosaminoglycan accumulation in tissues and fluids from the Mucopolysaccharidosis II mouse model.....	41
<b>4. DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>64</b>
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>75</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>77</b>

<b>7. APÊNDICES.....</b>	<b>86</b>
7.1 Parecer do Comitê de Ética Institucional do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) para o projeto de número 140306. ....	86
7.2 Parecer do Comitê de Ética Institucional do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) para o projeto de número 190611. ....	87

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABG:  $\beta$ -glucocerebrosidase.

AH: Ácido hialurônico.

ASM: Esfingomielinase ácida.

CS: Condroitin sulfato.

DL: Doença lisossômica.

DMMB: Azul de dimetilmetileno.

DS: Dermatan sulfato.

GAA:  $\alpha$ -glucosidase.

GAG: Glicosaminoglicano.

Gb3: Globotriaosilceramida.

GBA:  $\beta$ -glucocerebrosidase.

GLA:  $\alpha$ -galactosidase A.

HS: Heparan sulfato.

IDS: Iduronato-2-sulfatase.

IDUA:  $\alpha$ -L-iduronidase.

LCR: Líquido Cefalorraquidiano.

LC-MS/MS: Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem.

LDs: *Lysosomal disorders*.

LysoGb3: Globotriaosilsfingosina.

MAPT: Proteína tau associada a microtúbulos.

MEC: Matriz Extracelular.

MPS: Mucopolissacaridose.

MS: Espectrometria de massas (do inglês – *mass spectrometry*).

NRE: *non-reducing ends* (ou extremidades não redutoras).

PKU: Fenilcetonúria.

QS: Queratan sulfato.

SIPF: Sangue impregnado em papel filtro.

SNC: Sistema nervoso central.

TCTH: Transplante de células tronco hematopoiéticas.

TFEB: Fator de transcrição EB.

TG: Terapia gênica.

TRE: Terapia de reposição enzimática.

WT: Controles normais (do inglês - *Wild Type*).

## RESUMO

As mucopolissacaridoses (MPS) são doenças herdáveis causadas pela ausência ou deficiência das enzimas lisossômicas responsáveis pelo catabolismo de glicosaminoglicanos (GAGs). A MPS I, ou síndrome de Hurler/Scheie, é caracterizada pela deficiência da enzima  $\alpha$ -L-iduronidase (IDUA), já MPS II, ou síndrome de Hunter, pela deficiência da enzima iduronato-2-sulfatase (IDS). Ambas acumulam os GAGs Dermatan Sulfato (DS) e Heparan Sulfato (HS), e ambas são de herança recessiva, sendo a MPS II ligada ao X. O diagnóstico bioquímico dessas doenças pode ser realizado através de ensaios de atividade enzimática, sequenciamento de DNA ou por quantificação de GAGs. A quantificação de GAGs, por sua vez, pode ser feita através de várias técnicas, dentre elas, a mais recente e que foi utilizada nesse trabalho é a cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas em tandem (LC/MS/MS). Embora diversas amostras possam ser utilizadas para essa quantificação, aqui foram utilizadas amostras de sangue impregnado em papel filtro para quantificação de GAG e atividade enzimática em MPS I. Já em MPS II foram usadas amostras de soro, urina, órgãos e saliva para quantificação de GAGs. Os camundongos com MPS I, cujas amostras foram coletadas em torno de 2 meses, apresentaram níveis elevados de GAGs no sangue, ao serem comparados com controles não afetados. Além disso, camundongos com MPS I tiveram a já esperada baixa atividade enzimática de IDUA, mas também apresentaram uma atividade elevada da enzima lisossômica  $\alpha$ -galactosidase A (GLA), possivelmente causada pela ativação do Fator de Transcrição EB (TFEB) após armazenamento lisossomal de moléculas não degradadas. Esse foi o primeiro relato de atividade enzimática de GLA aumentada em MPS I. Para MPS II, aos 6 meses foi observado que não havia diferença significativa entre os níveis de GAG do soro entre os grupos, já para a urina na mesma idade se observou níveis elevados de DS e HS em camundongos com MPS II. Foram constatados níveis elevados de GAGs em todos os órgãos dos animais com MPS II aos 6 meses, se comparados aos controles não afetados. Especificamente para as partes do cérebro, não se observou diferenças significativas no nível de GAG no cerebelo. Já no córtex frontal e total, observou-se níveis elevados de HS nos camundongos com MPS II, ajudando a confirmar a

proposição de que as células do sistema nervoso central têm acúmulo unicamente desse GAG. Finalmente, observou-se diferenças significativas aos 6 meses, com os valores de GAG elevados nos camundongos com MPS II. Esse foi o primeiro relato de níveis de GAG na saliva como possível ferramenta auxiliar para o diagnóstico de MPS II. Esses achados podem ajudar a estabelecer biomarcadores em diferentes tecidos ou fluidos fisiológicos, ajudando a melhor caracterizar e monitorar essas doenças.

**Palavras-chave:** Diagnóstico; Doenças de depósito lisossômico; Espectrometria de massas; Saliva.

## ABSTRACT

Mucopolysaccharidosis (MPS) are heritable diseases caused by absence or deficiency of lysosomal enzymes responsible for the catabolism of glycosaminoglycans (GAG). MPS I, or Hurler/Scheie syndrome, is characterized by the deficiency of the  $\alpha$ -L-iduronidase (IDUA) enzyme, whereas MPS II, or Hunter syndrome, by the deficiency of the iduronato-2-sulfatase (IDS) enzyme. Both accumulate the GAGs dermatan sulfate (DS) and heparan sulfate (HS), and both present a recessive inheritance, being MPS II a X linked condition. The biochemical diagnosis of these diseases can be performed by enzyme activity assays, DNA sequencing, or GAG quantification. GAG quantification, specifically, can be performed by multiple techniques, among them, the most recent and used on this work is liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). Here blood samples in filter paper were used to quantify GAGs and enzyme activity in MPS I mice. For MPS II, we used samples of serum, urine, organs, and saliva to quantify GAGs. MPS I mice, whose samples were collected at about 2 months, showed high levels of GAGs in the blood, compared to Wild Type (WT). Moreover, MPS I mice had the already expected low enzymatic activity of IDUA, and an elevated enzymatic activity of the lysosomal enzyme  $\alpha$ -galactosidase A (GLA), possibly caused by the activation of the Transcription Factor EB (TFEB). This was the first report of an elevated activity of GLA in MPS I. For MPS II, at 6 months it was observed that there was no significant difference of GAG levels in the serum between the groups, but for urine at the same age it was observed higher levels of DS and HS in MPS II mice. Elevated GAG levels were found in all organs of MPS II mice at 6 months, when compared to WT. Specifically for brain areas, there was a lack of meaningful difference between the groups for the levels of GAG in the cerebellum, but we observed HS elevation in frontal and total cortexes. Finally, higher GAG levels were found in the saliva of MPS II mice at 6 months. This was the first report of elevated GAG levels in saliva in MPS II. These findings may help establish biomarkers in different physiological fluids and tissues, helping better characterize and monitor these diseases.

**Keywords:** Diagnosis; Lysosomal deposit disorders; Mass spectrometry; Saliva.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Doenças lisossômicas

A descoberta científica que desencadeou no entendimento da fisiologia básica das doenças lisossômicas se deu em 1955, com a identificação e caracterização pelo bioquímico Christian de Duve do lisossomo como uma organela subcelular responsável pela digestão e reciclagem de diferentes macromoléculas. Nessa época, já se discutia sobre os mecanismos de dano de tecidos através da liberação extracelular de enzimas lisossômicas (DUVE, 1975).

Hoje, as Doenças Lisossômicas (DL – ou, do inglês *Lysosomal Disorders*, LDs) são caracterizadas como um grupo de síndromes genéticas raras, sendo a maioria de herança autossômica recessiva, resultantes de deficiências nas hidrolases lisossomais ou de disfunções de proteínas envolvidas no transporte, biogênese, ou maturação proteica no lisossomo (NAGREE et al., 2019). De acordo com uma lista oficial sobre doenças lisossômicas, 66 condições relacionadas a 57 genes distintos são reconhecidas como DLs (WORLDSymposium, 2020). Sua prevalência como grupo varia de 1 em 5.000 a 1 em 7.000 nascidos vivos. Nessas doenças, as mutações em genes envolvidos na função lisossomal levam ao acúmulo de moléculas nessa organela em diferentes células do corpo humano (TOLEDANO-ZARAGOZA; LEDESMA, 2020). Mais comumente, os precursores de moléculas se acumulam, sendo a apresentação clínica das DLs muitas vezes um reflexo da atividade enzimática residual, variando de um desenvolvimento da doença ainda na infância (quando há pouca ou nenhuma atividade enzimática) até um desenvolvimento mais tardio na adolescência ou fase adulta (quando há função enzimática residual) (SCHULTZ et al., 2011).

Os sintomas dessas doenças são geralmente sistêmicos, isso porque o lisossomo é a organela primária para degradação em todas as células, incluindo nos neurônios (NEUFELD; MUENZER, 2001). Endocitose, fagocitose e autofagia são alguns dos mecanismos de entrega dos substratos aos lisossomos. A complexa rede de degradação dessas moléculas envolve proteínas lisossomais de membrana, hidrolases lisossomais solúveis, organelas relacionadas ao lisossomo e outros constituintes celulares. São muitos os passos onde um pequeno defeito na

enzima pode causar consequências enormes. Portanto, quando uma função lisossomal é deficiente, pode ocorrer, dentre outros sintomas, comprometimento neurológico (SCHULTZ et al., 2011).

## 1.2 Mucopolissacaridoses

As mucopolissacaridoses (MPS) são doenças herdáveis causadas por ausências ou deficiências das enzimas lisossômicas responsáveis pelo catabolismo dos glicosaminoglicanos (GAGs). GAGs parcialmente ou totalmente não-degradados são considerados a causa primária dos sintomas das MPS, já o armazenamento de GAGs nos lisossomos pode levar a efeitos secundários e terciários nas células, como alterações na autofagia, apoptose e disfunção mitocondrial (GAFFKE et al., 2020). Os sintomas surgem como consequência do depósito desses GAGs nas células de vários órgãos ao perturbar a homeostase, sendo o grau e a gravidade da condição dependente da taxa e do local de acúmulo (ANDERSON, 2018). À medida que os GAGs se acumulam, o lisossomo se expande e ocupa cada vez mais espaço no citoplasma. Como consequência, outras organelas celulares podem ser afetadas e o contorno celular pode ficar deformado. Com a continuação do processo, as células aumentadas levam à organomegalia (COUTINHO; LACERDA; ALVES, 2012).

As MPS são classificadas de acordo com a enzima deficiente e o substrato acumulado, sendo elas: MPS I, MPS II, MPS III, MPS IV, MPS VI, MPS VII e MPS IX (Tabela 1). De MPS I a VII a doença está individualmente correlacionada com a deficiência de 1 dentre 10 enzimas necessárias para o passo de degradação de um ou mais dos GAGs sulfatados. Já a MPS IX envolve deficiência de uma enzima para degradação de ácido hialurônico (AH). São doenças crônicas e progressivas com um espectro vasto de gravidade clínica de acordo com as deficiências enzimáticas (NEUFELD; MUENZER, 2001).

Tabela 1: Classificação de Mucopolissacaridoses

<b>MPS</b>	<b>GENE</b>	<b>NOME</b>	<b>PRINCIPAIS MANIFESTAÇÕES</b>	<b>ENZIMA DEFICIENTE</b>	<b>GAG ACUMULADO</b>
<b>MPS IH</b>	<i>IDUA</i>	Hurler/ Scheie	Opacidade de córnea, disostose múltipla, organomegalia, doença cardíaca, comprometimento neurológico (Hurler)	$\alpha$ -L-iduronidase	DS e HS
<b>MPS II</b>	<i>IDS</i>	Hunter	Deformidades esqueléticas, hepatoesplenomegalia, comprometimento cardiovascular, comprometimento neurológico	iduronato-2-sulfatase	DS e HS
<b>MPS IIIA</b>	<i>SGSH</i>	Sanfillipo A	Deterioração mental, hiperatividade, manifestações somáticas atenuadas	Heparan-N-sulfatase	HS
<b>MPS IIIB</b>	<i>NAGLU</i>	Sanfillipo B	Similar à MPS IIIA	$\alpha$ -N-acetilglucosamidase	HS
<b>MPS IIIC</b>	<i>HGSNAT</i>	Sanfillipo C	Similar à MPS IIIA	Acetil CoA- $\alpha$ -glucosamina	HS
<b>MPS IIID</b>	<i>GNS</i>	Sanfillipo D	Similar à MPS IIIA	N-acetilglucosamina 6-sulfatase	HS
<b>MPS IVA</b>	<i>GALNS</i>	Morquio A	Anormalidades esqueléticas, opacidade de córnea, hipoplasia odontóide	N-acetil-Galactosamina-6-sulfato sulfatase	CS e QS
<b>MPS IVB</b>	<i>GLB1</i>	Morquio B	Fenótipo similar à MPS IVA	$\beta$ -galactosidase	QS

<b>MPS VI</b>	<i>ARSB</i>	Maroteaux-Lamy	Disostose múltipla, opacidade de córnea, organomegalia	Arilsulfatase B	DS
<b>MPS VII</b>	<i>GUSB</i>	Sly	Disostose múltipla, hepatoesplenomegalia, inclui formas fetal e neonatal, comprometimento neurológico	$\beta$ -glucoronidase	CS, DS e HS
<b>MPS IX</b>	<i>HYAU</i>	Natowicz	Baixa estatura, alterações articulares, mudanças faciais	Hialuronidase	Ácido hialurônico

Fonte: Adaptado de Neufeld e Muenzer (2001). Abreviações: CS- condroitin sulfato; DS- dermatan sulfato; HS- heparan sulfato; QS- queratan sulfato

Além da atividade das enzimas específicas para cada MPS ser reduzida, outras enzimas lisossômicas podem ter sua atividade elevada. Um exemplo, dentre as doenças lisossômicas, é a doença de Gaucher. Ela é causada primariamente pela deficiência da enzima  $\beta$ -glucocerebrosidase (GBA). Nessa condição, é bem estabelecido que há um aumento de atividade da enzima quitotriosidase, chegando a uma elevação plasmática de até 1000 vezes acima de valores normais. Essa enzima vem sendo usada como biomarcador secundário, principalmente para acompanhamento de tratamentos (TYLKI-SZYMAŃSKA et al., 2018). Uma hipótese que explica isso é a de que isso seja uma resposta fisiológica ao estresse celular, servindo como uma melhora do sistema de degradação lisossomal, já que está ocorrendo grandes acúmulos de moléculas não degradadas pela falha de uma enzima lisossomal. Portanto o sistema tenta balancear esse desequilíbrio através do aumento das atividades de outras enzimas lisossômicas (SARDIELLO et al., 2009). É possível que algum mecanismo semelhante esteja presente em MPS, pela disfunção lisossomal.

### 1.3 Mucopolissacaridose tipo I

Dentre as mucopolissacaridoses, a MPS tipo I é a doença autossômica recessiva causada por mutações no gene *IDUA* que, por consequência, gera deficiência da enzima  $\alpha$ -L-iduronidase (NEUFELD; MUENZER, 2001). Ela foi descrita pela primeira vez em 1919 pela Dra. Gertrud Hurler, por isso também ficou conhecida como síndrome de Hurler. Muitos anos depois, uma forma atenuada da doença foi descrita, sendo referida como síndrome de Scheie, mas posteriormente foi reconhecida como parte do espectro da MPS I (SCHEIE et al., 1962). Hoje, considera-se que diferentes mutações causam diferentes fenótipos, sendo classificados como três síndromes: Hurler (MPS IH), Hurler-Scheie (MPS IHS) e Scheie (MPS IS); respectivamente as formas grave, intermediária e moderada (GIUGLIANI et al., 2010). Entretanto, essa denominação vem sendo questionada, por se tratar de um espectro contínuo, e já que até a forma dita moderada pode ter imensas implicações no bem-estar do paciente.

Funcionalmente, a  $\alpha$ -L-iduronidase é essencial para o metabolismo correto de Dermatan Sulfato (DS) e Heparan Sulfato (HS), já que hidrolisa seus resíduos terminais de ácido  $\alpha$ -L-idurônico (NEUFELD; MUENZER, 2001). As manifestações clínicas mais comuns da MPS I incluem características faciais grosseiras, opacificação da córnea, macroglossia, perda auditiva, hidrocefalia, cardiopatia, problemas respiratórios, hepatoesplenomegalia, hérnia inguinal e umbilical, disostose múltipla, mobilidade articular limitada, comprometimento cognitivo e, por consequência do acúmulo de GAGs em estruturas rígidas e ligamentos paraespinhais, há elevado potencial de morbidade, resultando em grandes riscos para a coluna cervical. Na síndrome de Hurler há o comprometimento do sistema nervoso central (SNC), prejudicando o desenvolvimento cognitivo (BECK et al., 2014). Tem uma prevalência mundial de 1 a cada 100.000 nascidos vivos. Já no Brasil, a prevalência estimada é de 1,25 a cada 100.000 nascidos vivos (FEDERHEN et al., 2020).

#### 1.4 Mucopolissacaridose tipo II

Já a MPS tipo II foi descrita pela primeira vez em 1917 pelo Dr. Charles Hunter, daí seu nome síndrome de Hunter (HUNTER, 1917). É herdada como uma característica ligada ao X, e tem uma incidência mundial de 1 em 100.000 nascidos vivos e 0,38 em 100.000 no Brasil (D'AVANZO et al., 2020). É encontrada quase exclusivamente em homens; ainda assim algumas mulheres foram registradas com síndrome de Hunter bem definida, sendo elas heterozigotas para o gene defeituoso, mas com algum evento genético adicional que impediu a expressão do alelo não-mutado (inativação não aleatória do cromossomo X) (NEUFELD; MUENZER, 2001). MPS II é causada por deficiência na atividade da iduronato-2-sulfatase (IDS), uma enzima lisossomal envolvida no primeiro passo da degradação de HS e DS (KOBOLÁK et al., 2019). Os sintomas dessa doença incluem características faciais grosseiras, deformidades esqueléticas, hepatoesplenomegalia, infecções do trato respiratório e comprometimento cardiovascular. Há graus variados de envolvimento do SNC, desde tipos graves até moderados. O tipo moderado é caracterizado pela preservação da inteligência, enquanto o tipo grave é caracterizado por retardo

mental e morte antes da idade adulta, principalmente devido à doença obstrutiva das vias aéreas e insuficiência cardíaca (D'AVANZO et al., 2020). O mecanismo responsável pela neurodegeneração não é conhecido, mas uma hipótese de Azambuja e colaboradores (2020) é que as substâncias não degradadas no cérebro em MPS II poderiam ser reconhecidas como padrões moleculares associados a danos (DAMPS), o que leva à ativação de inflamassomos, colaborando para explicar o comprometimento neurológico em alguns pacientes.

Os diversos sintomas clínicos, apesar de não darem certeza quanto ao diagnóstico, podem ser usados para sugeri-lo e indicar uma avaliação específica. Eles podem ser usados para distinguir entre os subtipos de MPS, mas precisam ser confirmados com testes bioquímicos/moleculares. Além disso, os pacientes geralmente aparentam serem normais ao nascer, apresentando sintomas iniciais entre 2 e 4 anos de idade, e até mais cedo nas formas graves. Isso muitas vezes resulta em um diagnóstico errado ou tardio, que conseqüentemente leva a um tratamento tardio e menos efetivo (D'AVANZO et al., 2020). A importância de um diagnóstico rápido e bem estabelecido se dá pela efetividade do tratamento depender da idade de início, sendo alguns considerados como opção apenas nos primeiros anos de vida do paciente (STAPLETON et al., 2018).

### 1.5 Diagnóstico

É essencial, para MPS, que o tratamento tenha início precocemente, evidenciando a necessidade de diagnósticos rápidos. A Triagem Neonatal é o método diagnóstico mais próximo do nascimento, portanto é muito eficaz para identificar bebês que podem receber um tratamento precoce (antes do estabelecimento de manifestações irreversíveis da doença). O primeiro teste de triagem neonatal foi desenvolvido em 1961 para a fenilcetonúria (PKU), pelo Dr. Robert Guthrie, ao formular um teste de inibição bacteriana para estimar a concentração da fenilalanina em uma amostra de sangue impregnado em papel-filtro (SIPF) (CAMARGO NETO, 2015). Guthrie começou um estudo sobre triagem neonatal para PKU e, já em 1965, 27 estados dos Estados Unidos tinham triagem

neonatal de PKU obrigatória. Desde então, foram desenvolvidos testes de triagem neonatal para diversas doenças metabólicas hereditárias (DONATI et al., 2018).

Para MPS, o primeiro teste de triagem neonatal desenvolvido foi azul de dimetilmetileno (DMMB), que servia para medir qualitativa e semiquantitativamente os GAGs urinários. Entretanto o DMMB cria uma grande quantidade de resultados falso positivos e não pode ser usado para amostras de sangue impregnado em papel-filtro (ARUNKUMAR et al., 2020). Apesar da manifestação dos sintomas de MPS serem graves e progressivos, os bebês geralmente nascem sem sintomas clínicos identificáveis; mesmo assim, hoje é possível diagnosticar essas condições ao nascimento, medindo a atividade enzimática e o nível do acúmulo de GAGs. Esses testes também são realizados através de SIPF obtido do calcanhar dos bebês (STAPLETON et al., 2020).

Apesar de a triagem neonatal para certas MPS já ser obrigatória em alguns países como partes dos Estados Unidos, Itália e Japão (ARUNKUMAR et al., 2020), no Brasil elas continuam não fazendo parte do painel nacional para o teste do pezinho (que inclui Fenilcetonúria, Hipotireoidismo Congênito, Fibrose Cística, Anemia Falciforme e demais Hemoglobinopatias, Hiperplasia Adrenal Congênita e Deficiência de Biotinidase) (SILVA-PINTO et al., 2019). Essa não inclusão é uma possível consequência dessas doenças não se encaixarem em todos os critérios de Wilson e Jungner (1968), que existem para selecionar as doenças para a triagem neonatal que seriam exequíveis pelo governo e que mais beneficiariam a população. Dentre esses critérios está um tratamento aprovado, o que não existe para todas MPS. Portanto, o método de diagnóstico bioquímico é, em sua maioria, usado apenas após observação de algum sintoma clínico de MPS, ou quando há histórico familiar.

Segundo Chuang e colaboradores (2014), um diagnóstico bioquímico acurado é alcançado com três testes sequenciais: a quantificação de GAGs, análise qualitativa por eletroforese bidimensional e ensaio de atividade enzimática, sendo este último o padrão-ouro. A eletroforese de GAGs é informativa, mas o método pode ser ambíguo, pois gera resultados muito parecidos para MPS I, II e VI. Além disso é demorado, levando no mínimo dois dias para ser completo, e tem uma

interpretação subjetiva, o que pode tornar o resultado pouco confiável. Já o ensaio de atividade enzimática é muito confiável, principalmente quando realizado através de espectrometria de massas (MS – do inglês *mass spectrometry*), e é bem complementado pela quantificação de GAGs através da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS) para um diagnóstico completo e um bom estabelecimento do plano de tratamento.

As técnicas de quantificação de GAGs são muitas, dentre elas destacam-se: DMMB, ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) e MS. O teste DMMB não diferencia os tipos de GAGs, portanto é uma análise de GAGs totais, dificultando a identificação da MPS específica. Além disso, resultados falsos negativos são comumente gerados pelo sulfato presente no corante. Já o teste ELISA é muito utilizado na prática clínica, entretanto apresenta um elevado custo, uma vez que cada subtipo de GAG requer uma análise individual (KUBASKI et al., 2017 – a).

A espectrometria de massas é uma técnica analítica de aplicação extremamente variada, em que os compostos são medidos baseando-se em sua razão massa ( $m$ ) sobre carga ( $z$ ),  $m/z$ . Primeiramente, a fonte de ionização do equipamento converte as moléculas de uma amostra em íons em fase gasosa; em seguida esses íons passam por fragmentação gerando moléculas que, por sua vez, serão fragmentadas novamente. Subsequentemente, essas moléculas são separadas de acordo com sua razão  $m/z$ , a partir da abundância (intensidade) relativa de cada íon. O resultado é um gráfico que mostra essa abundância que aparece como picos com  $m/z$  definidos; informação essa que permite identificar os compostos precursores (HOFFMAN; STROOBANT, 2007). Para detecção de subtipos de GAGs, é uma técnica precisa e sensível, sendo possível discriminar a maioria das amostras de MPS dos controles não afetados. Os materiais tradicionalmente utilizados para essa medição são: fluido amniótico, para testes pré-natais; SIFP, para triagem neonatal; sangue e urina, para diagnósticos em qualquer idade; e líquido cefalorraquidiano (Líquor ou LCR) (KUBASKI, 2017 – b).

Nesse sentido, para diagnóstico de MPS I e II, a dosagem de DS e HS por LC-MS/MS pode ser mais informativa, pois combina a separação física gerada pela cromatografia líquida com a análise em tandem da espectrometria de massas,

oferecendo um método altamente sensível e específico para detectar os subtipos de GAGs (SILVA et al., 2020). Um método desenvolvido recentemente para o diagnóstico é a detecção de *non-reducing ends* (NRE – ou extremidades não redutoras) dos GAGs, que envolve a despolimerização de suas cadeias com enzimas endolíticas, permitindo a quantificação das assinaturas de GAGs que são únicos para cada MPS, já que cada enzima deficiente deveria quebrar a cadeia em um local específico, como exemplificado com o HS, GAG acumulado mais comum às MPS, mostrado na figura 1 (LAWRENCE et al., 2012). Entretanto, esse método, mesmo sendo rápido e replicável só pode ser utilizado em urina e LCR. No presente trabalho, foi utilizada a LC-MS/MS para a detecção de dissacarídeos de heparan sulfato com sulfatação na posição N (HS-NS) ou O (HS-OS) e dermatan sulfato (DS), sendo as amostras digeridas com as enzimas chondroitinase B, heparitinase e keratanase II (KUBASKI et al., 2017 – b).

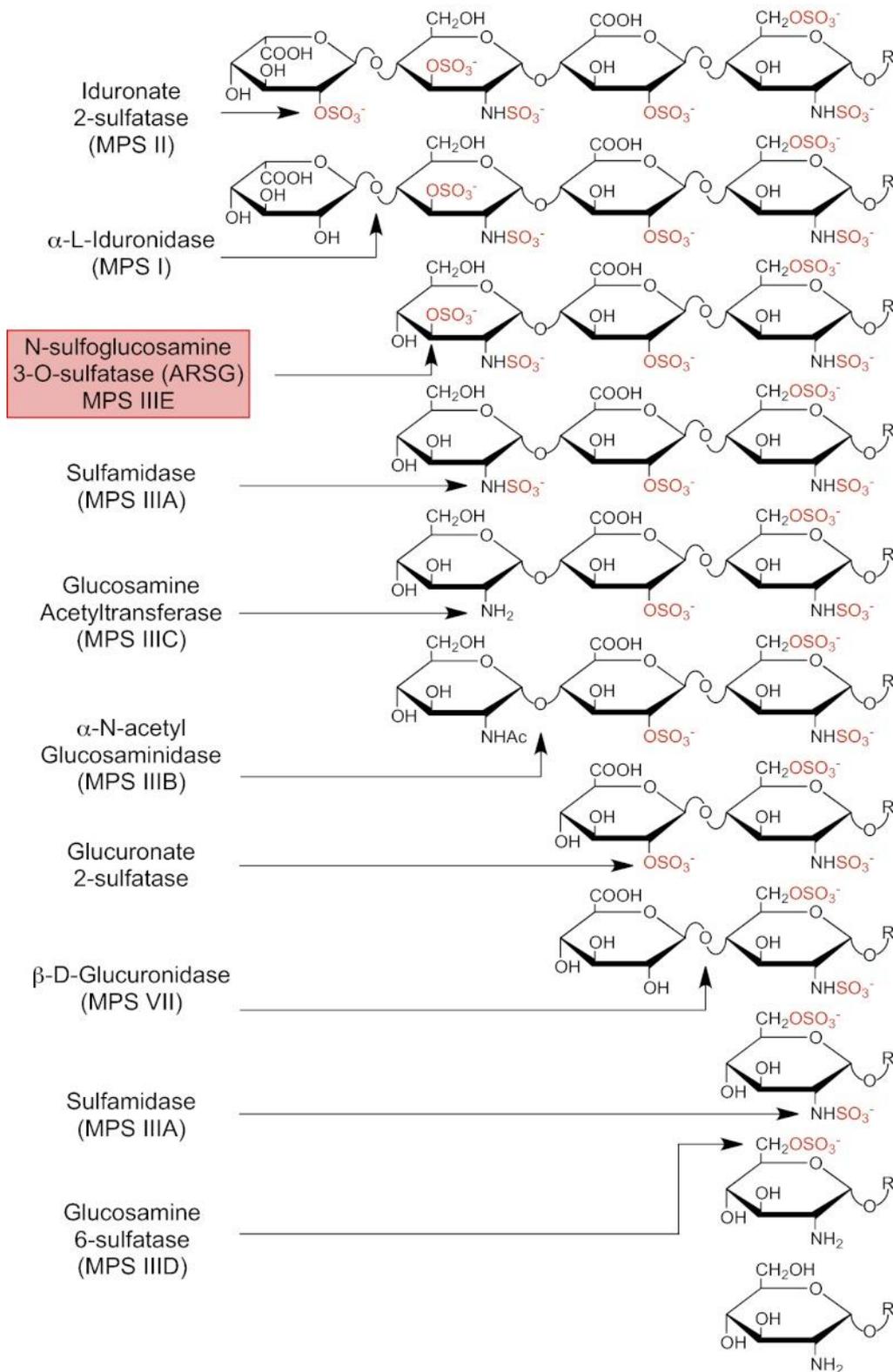


Figura 1: Locais de quebra do Heparan Sulfato por cada enzima lisossômica deficiente em 9 MPS distintas. *Fonte: Kowalewski et al. (2012).*

## 1.6 Tratamento

As alternativas de tratamento para MPS aprovadas para uso são a terapia de reposição enzimática (TRE) e o transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) (STAPLETON et al., 2018). Além disso, dada a grande variedade de sintomas, o tratamento dos pacientes requer um time multidisciplinar, incluindo profissionais de cuidados primários, cardiologia, pneumologia, gastroenterologia, neurologia, especialistas em ouvido, nariz e garganta, audiologia, oftalmologia, ortopedia, fisioterapia, odontologia, e especialistas do desenvolvimento (MUENZER; WRAITH; CLARKE, 2009).

Para a TRE, sua primeira aplicação efetiva foi realizada em um paciente com doença de Gaucher, outro tipo de doença lisossômica (BARTON et al., 1990). Porém nas últimas duas décadas vem sendo muito utilizada para o tratamento de MPS, consistindo em infusões intravenosas semanais da enzima recombinante. A maior parte dessa infusão alcança os órgãos viscerais como baço, fígado e rins, mas tem uma meia-vida curta na circulação, o que faz com que os níveis séricos da enzima não sejam utilizados como biomarcador de efetividade da terapia (CONCOLINO; DEODATO; PARINI, 2018). Além disso, por não ultrapassar a barreira hematoencefálica (BHE), não promove benefícios para o sistema nervoso central (ANSON; MCINTYRE; BYERS, 2011).

O TCTH é uma alternativa viável para pacientes muito jovens. Nesse tratamento, células saudáveis são transplantadas, e então a enzima secretada pelas células doadoras é incorporada pelo corpo do paciente por correção cruzada (NOH; LEE, 2014). Uma das vantagens desse tratamento é o fato de as células doadoras circularem na corrente sanguínea conseguindo cruzar a BHE e se diferenciar, podendo amenizar os sintomas no SNC. Além disso, em geral o TCTH é um procedimento único, permitindo uma contínua fonte de enzimas para a degradação de GAGs (TAYLOR et al., 2019 – b). Apesar dessas vantagens, o risco é elevado, havendo uma alta taxa de mortalidade após a realização do procedimento (TOMATSU et al., 2015).

Por fim, novas terapias, como a terapia gênica (TG), vêm sendo estudadas. A TG é a entrega de material genético para células e tecidos do indivíduo para tratar

doenças herdadas ou adquiridas (KAY; GLORIOSO; NALDINI, 2001). As MPS são alvos ideais para esse tipo de terapia, já que são doenças monogênicas, sendo, portanto, possível entregar diretamente uma cópia saudável do gene defeituoso ao núcleo da célula alvo, podendo reparar o defeito genético, com a intenção de curar ou amenizar os sintomas clínicos (KUMAR et al., 2016). Em 2000 ocorreu o primeiro ensaio clínico de terapia gênica para uma doença de depósito lisossômico (doença de Fabry) e, nos últimos anos, esse é o tratamento que vem ganhando maior espaço nas pesquisas clínicas, fornecendo esperança aos pacientes (PENATI et al., 2017). No entanto, para a avaliação da eficácia de novos tratamentos em estudos clínicos, faz-se necessário que existam biomarcadores confiáveis e robustos.

### 1.7 Biomarcadores para MPS

Os GAGs, um dos principais biomarcadores para MPS, são polissacarídeos longos e lineares, formados por unidades repetidas de dissacarídeos, ligados a proteínas centrais ou de forma livre na matriz extracelular (MEC) em todos os organismos multicelulares (KISELOVA et al., 2014). Quando ligados a proteínas são denominados proteoglicanos, sendo encontrados na superfície da célula e estando envolvidos em muitos processos biológicos. Dentre eles: crescimento, diferenciação, adesão e mobilidade celular através da interação com vários receptores, como fatores de crescimento, enzimas e citocinas (LIU et al., 2014). Eles são compostos por aproximadamente até 100 dissacarídeos, sua biossíntese permite uma grande variabilidade estrutural, incluindo sulfatação diferencial, acetilação e epimerização (KISELOVA et al., 2014).

Baseado nessa estrutura de dissacarídeos repetidos, GAGs são divididos em cinco classes: DS, HS, queratan sulfato (QS) e condroitin sulfato (CS); e o GAG não sulfatado, AH. As cadeias de GAGs de regiões repetitivas de dissacarídeos são compostas por porções de açúcar amino acetiladas (N-acetilgalactosamina ou N-acetil-glicosamina) e principalmente ácido urônico (ácido D-glucurônico ou ácido L-idurônico) (LIU et al., 2014). Os GAGs, além de estarem acumulados nas MPS, também são associados com outras condições patológicas como: osteoartrite,

inflamação, diabetes mellitus, lesão da medula espinal e câncer (KUBASKI et al., 2017 – a). Aqui, como o foco foi MPS I e II, os GAGs estudados foram DS e HS, demonstrados estruturalmente na figura 2.

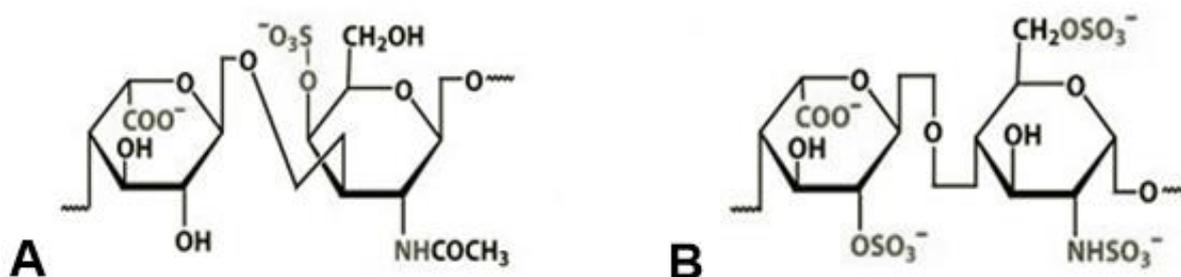


Figura 2: Estrutura dos GAGs DS e HS. **A:** Dermatan Sulfato. **B:** Heparan Sulfato. *Fonte: Adaptado de Sepuru e Rajarathnam (2019).*

Dentre os diversos tipos de amostras usadas para dosagem de GAGs, destaca-se a urina, sendo muito usada na prática clínica. Quando medidos através de LC-MS/MS é bem confiável para o diagnóstico de MPS, entretanto os níveis de GAGs urinários medidos por DMMB não diferem pacientes graves de atenuados, e não são 100% confiáveis no acompanhamento do tratamento, por gerarem resultados variáveis (HARMATZ, 2008). Além disso, a origem dos GAGs urinários não é bem estabelecida, não havendo consenso se a excreção de GAGs observada na urina vem do rim ou de diversos órgãos, a partir do sangue.

Outra amostra utilizada para dosagem de GAGs é o líquido cefalorraquidiano (LCR), tendo surgido para diferenciar as pessoas com a forma grave da doença (com comprometimento cognitivo) das pessoas com a forma atenuada, ou até mesmo dos controles, como demonstrado num estudo de Hendriksz e colaboradores (2015). Além disso, indica a eficácia do tratamento das pessoas com MPS, pois reflete se está atingindo o SNC, ultrapassando a BHE (estrutura de permeabilidade altamente seletiva que protege o SNC de substâncias potencialmente neurotóxicas presentes no sangue); ou seja, se está sendo eficaz contra os sintomas neurológicos da doença (ZHANG et al., 2011). Entretanto, o

procedimento para a coleta de LCR de uma pessoa exige uma punção lombar, um método difícil e invasivo que geralmente resulta em desconforto, dor e efeitos colaterais; e levando a muitas desistências do procedimento (BABAPOUR MOFRAD et al., 2019). Portanto fica claro a necessidade de métodos de diagnóstico e acompanhamento de tratamento precisos e menos invasivos.

Estudos recentes revelam que a saliva pode ser uma fonte valiosa de biomarcadores para facilitar diagnósticos de doenças neurológicas (WALTON, 2018). Novas pesquisas mostram descobertas quanto à aplicação de biomarcadores na saliva para diversas condições patológicas, como por exemplo: compostos de peroxidação lipídica salivar como biomarcador neurodegenerativo em doenças de estresse oxidativo (PEÑA-BAUTISTA et al., 2019); cadeias leves livre de hemoglobinas na saliva como biomarcador para acompanhamento do progresso e remissão de esclerose múltipla (LOTAN et al., 2020); diferentes biomarcadores salivares para a doença de Alzheimer (REALE; GONZALES-PORTILLO; BORLONGAN, 2020); usa-se até mesmo proteína tau associada a microtúbulos (MAPT) na saliva como biomarcador para traumatismo craniano em autópsias (OLCZAK, 2019); entre outras aplicações. É possível que exista uma composição diferente na saliva de pessoas afetadas com alguma condição, porque o sistema nervoso simpático, quando ativado por algum estresse corporal, pode causar mudanças na concentração de proteínas na saliva serosa (CASWELL et al., 2015).

Apesar da aplicação de diagnósticos baseados na composição da saliva em humanos ser um campo promissor, é necessário primeiramente testar a aplicabilidade de um novo método em modelos animais. Em camundongos, o uso da saliva para diagnóstico de patologias é bem estabelecido, especialmente para doenças orais, como câncer de boca (GHIZONI et al., 2019) e herpes (YAP et al., 2020). Além disso, a saliva também vem sendo usada para outros tipos de patologia, por exemplo: para a pesquisa de biomarcadores em câncer de cabeça e pescoço, tendo melhores resultados com a saliva do que com o plasma de camundongos (EUN et al., 2019); e para distrofia muscular de Duchenne, baseando-se na identificação de concentrações elevadas de certas peptidases na

saliva de camundongos (MURPHY et al., 2019); e até para o diagnóstico do vírus da dengue pela detecção do RNA viral neste fluido (RASINHAS et al., 2018).

A saliva se caracteriza como uma amostra com um grande potencial para descoberta de biomarcadores de doenças neurodegenerativas por causa da estreita relação entre as glândulas salivares e o sistema nervoso (SHI et al., 2011). A saliva é um fluido fisiológico composto por secreções mucosas e serosas que contém proteínas e diferentes íons. As proteínas secretadas incluem  $\alpha$ -amilase, mucoglicoproteínas (mucinas) e outras, como proteínas ricas em prolina, aglutininas, histatinas, cistatinas, lisozimas e glicoproteínas. São diversas as funções exercidas por ela, incluindo: digestão de nutrientes e proteção dos dentes e tecidos orais, lubrificação, mineralização, homeostase e proteção microbiana (ROBLEGG; COUGHRAN; SIRJANI, 2019). A secreção da saliva se dá na boca pelas glândulas salivares principais: sublingual, submandibular e parótida, todas estão sob inervação parassimpática direta dos nervos cranianos VII (glossofaríngeo) e IX (facial). O nervo facial inerva as glândulas sublingual e submandibular através do gânglio submandibular, enquanto a glândula parótida está sob inervação glossofaríngea através do gânglio ótico (FARAH et al., 2018). O que, de novo, explica a aplicabilidade da saliva como fluido que contém biomarcadores tanto de condições fisiológicas normais, como de condições patológicas importantes.

No presente trabalho buscou-se, através do uso de modelos de camundongos com MPS I e II, desenvolver novas estratégias para diagnóstico e acompanhamento de tratamento. Com base nisso, o foco foi estabelecer a dosagem de GAGs em saliva de camundongos como um biomarcador de MPS II, ao diferenciar controles não afetados de fenótipos doentes; prospectando essa dosagem como uma forma de avaliar a eficácia de tratamentos futuros. Além disso, usou-se os níveis de GAGs e de atividade de quatro enzimas lisossômicas:  $\beta$ -glucocerebrosidase (ABG), esfingomielinase ácida (ASM),  $\alpha$ -glucosidase (GAA) e  $\alpha$ -galactosidase A (GLA) em SIPF, para diferenciar controles normais de camundongos com MPS I, cuja atividade da enzima IDUA, também medida aqui, é reduzida.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

- Analisar biomarcadores em animais com MPS I e II através de espectrometria de massas em tandem.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Quantificar GAG em sangue impregnado em papel filtro de camundongos com MPS I.
- Diferenciar a atividade enzimática de enzimas lisossômicas de camundongos com MPS I de controles não afetados.
- Utilizar dados da quantificação de GAGs em urina e soro de camundongos com MPS II e controles não afetados para identificar animais doentes.
- Diferenciar quantificação de GAGs nos órgãos de camundongos com MPS II de controles não afetados.
- Validar a análise de GAGs em saliva como biomarcador para MPS II a fim de diferenciar camundongos afetados de controles não afetados.
- Correlacionar nível de GAGs nas partes do cérebro (cerebelo, córtex frontal e córtex total) com o comportamento observado em camundongos com MPS II.
- Correlacionar nível de GAGs na saliva com o nível de GAGs nas partes do cérebro de camundongos com MPS II.
- Correlacionar quantificação de GAGs em saliva com o comportamento observado em camundongos com MPS II.

### 3. CAPÍTULOS

3.1 Capítulo 1. Situação: Em preparação.

#### **Elevation of glycosaminoglycans levels and $\alpha$ -galactosidase A activity in Mucopolysaccharidosis I mouse model**

**Isabelly Maria Barros de Lima<sup>1</sup>, Francyne Kubaski<sup>2</sup>, Luisa Natalia Pimentel Vera<sup>3</sup>, Guilherme Baldo<sup>4, \*</sup>.**

<sup>1</sup> Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Centro de Terapia Gênica, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Rua Ramiro Barcelos, 2350, Santana, 90035903 - Porto Alegre, RS – Brazil. Orcid: 0000-0002-5831-6601.

<sup>2</sup> Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Serviço de Genética Médica, PPGBM – UFRGS. Ramiro Barcelos 2350, Santana, 90035903 - Porto Alegre, RS – Brazil. Orcid: 0000-0002-9330-0154.

<sup>3</sup> Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Centro de Terapia Gênica, PPGBM – UFRGS. Rua Ramiro Barcelos, 2350, Santana, 90035903 - Porto Alegre, RS – Brazil. Orcid: 0000-0002-7178-3853.

<sup>4</sup> Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Centro de Terapia Gênica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Ramiro Barcelos, 2350, Santana, 90035903 - Porto Alegre, RS – Brazil. Orcid: 0000-0003-1598-5861.

**Keywords:** Glycosaminoglycan (GAG), Lysosomal Storage Disease (LSD), Transcription Factor EB (TFEB),  $\alpha$ -L-iduronidase (IDUA).

\* Corresponding Author: Dr. Guilherme Baldo. Address: 2350 Ramiro Barcelos, 90035-903, Porto Alegre, RS - Brazil. Phone Number: +55 51 3359-8838. E-mail: gbaldo@hcpa.edu.br.

Word count: 1378

Number of figures: 02

## **Abstract**

Mucopolysaccharidosis type I (MPS I) is a rare hereditary disease, caused by mutations in the *IDUA* gene, leading to the deficiency of the enzyme  $\alpha$ -L-iduronidase (IDUA). As this enzyme is needed to catabolize dermatan and heparan sulfate (DS and HS), it causes the storage of such compounds, which leads to cell, tissue, or organ dysfunction. The Transcription Factor EB (TFEB) signaling pathway is activated after the lysosomal storage of undegraded molecules. The activation of TFEB can lead to an increase in the activity of other lysosomal enzymes, which then could be used as secondary biomarkers. This study aimed to determine if this occurs in MPS I, by analyzing the blood enzyme activity of several lysosomal enzymes in MPS I mice, compared to wild type mice. Dried blood spots were collected, and GAG levels and enzyme activities were assessed by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). We found elevated levels of heparan and dermatan sulphate in MPS I samples, as well as a decreased activity of IDUA, which was expected. We also found a 2-fold increase in the activity of  $\alpha$ -galactosidase A (GLA). This study is the first report of increased activity of GLA in MPS I, suggesting that this enzyme could be more active due to the TFEB pathway, and could serve as a potential biomarker for MPS I.

**Keywords:** Transcription Factor EB (TFEB); Lysosomal Storage Disease (LSD);  $\alpha$ -L-iduronidase (IDUA); Glycosaminoglycan (GAG).

## Introduction

Mucopolysaccharidosis type I (MPS I) is a rare recessive hereditary disease, characterized by different mutations in the *IDUA* gene, which leads to the deficiency of the  $\alpha$ -L-iduronidase enzyme (IDUA). IDUA is a lysosomal hydrolase needed to catabolize the terminal residues of the glycosaminoglycans (GAGs): dermatan sulfate (DS) and heparan sulfate (HS) (Neufeld & Muenzer, 2001). Partially or completely non-degraded GAGs are stored in the lysosomes, eventually leading to cell, tissue, or organ dysfunction. The disease symptoms arise from GAG accumulation and the degree of severity depends on the type of mutation and residual activity (Coutinho, Lacerda, & Alves, 2012).

The laboratory diagnosis of MPS is performed by the enzyme (IDUA) activity. Other analyses such as GAG quantification and DNA sequencing are used to confirm the diagnosis (Kubaski et al., 2020). Analysis of GAG levels in urine has been used since the '50s, however more recent technologies such as tandem mass spectrometry (MS/MS) have greatly aided in the quantification of GAGs in urine, blood, tissues and other sample matrices (Kiselova et al., 2014). Enzyme assay estimates the residual activity of IDUA. These assays can also be performed by MS/MS (the current golden standard) for the MPS diagnosis (Blanchard et al., 2008). Lastly, molecular diagnosis is usually performed as a confirmatory test after biochemical diagnosis, by complete sequencing of the *IDUA* gene (Kubaski et al., 2020).

In 2009, while investigating the gene network that regulates lysosomal function, Sardiello et al. discovered that the Transcription Factor EB (TFEB) was predominantly located in the nucleus of fibroblasts from mouse models of three different lysosomal storage disorders (LSDs) (including MPS II and IIIA), which was suggested to be due to the TFEB signaling pathway being activated after lysosomal storage of undegraded molecules. This is an indicator of a physiological response to lysosomal stress, serving as an enhancement of the lysosomal degradation system since there is a disbalance cause by the defect in other lisosomal enzymes. TFEB promotes the transcription of several lysosomal genes by direct binding to specific E-box sites at their promoters, meaning that some lysosomal enzymes

might be upregulated on lysosomal diseases (Palmieri et al., 2011). Thus, activity of such enzymes could then be used as secondary biomarkers.

This study aimed to determine whether the GAG levels and the activity of four lysosomal enzymes:  $\beta$ -glucocerebrosidase (ABG), acid sphingomyelinase (ASM),  $\alpha$ -glucosidase (GAA), and  $\alpha$ -galactosidase A (GLA) are altered in dried blood spots (DBS) of the MPS I mouse model, whose IDUA activity is severely reduced.

## **Material and methods**

The mice used on this project were C57BL/6 from the MPS I colony. These animals were generated and kindly donated by Dr. Elizabeth Neufeld (UCLA, EUA). The mice have an insertion of a neomycin resistant gene within the IDUA gene, knocking out its activity. The colony was kept at the Animal Experimentation Unity (UEA – Unidade de Experimentação Animal) at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Animals were housed in groups of 2-5, in individually ventilated plastic cages, under controlled temperatures of 20-24°C, and air humidity of 40-60%. Mice had access to food and water ad libitum and were kept under a 12-hour light/dark cycle. This study was approved by our ethics committee (project ID: 2014-0306).

The animals were genotyped and separated into two groups: Wild Type mice (WT) who were heterozygous for the IDUA gene, or MPS I (IDUA<sup>-/-</sup>) knockout for the IDUA gene. Genotyping was performed by PCR amplification using genomic DNA extracted from tissue samples of small ears punches as previously reported (Baldo et al, 2013). Samples were collected from animals between 21 and 90 days of age. Blood was collected in filter paper by cheek puncture.

Glycosaminoglycans (GAG) disaccharides Heparan sulphate with sulfation at N (HS-NS) or O positions (HS-OS) and dermatan sulphate (DS) were analyzed by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) as previously described (Kubaski et al., 2017). Briefly, two 3.2 mm disks were digested with chondroitinase B, heparitinase and keratanase II (Seikagaku Co, Tokyo). The samples were incubated with all three enzymes overnight at 37°C, afterward being

centrifuged again, and finally the filtrate was analyzed by LC/MS/MS (Kubaski et al., 2017). GAGs were expressed in ng/mL.

Enzyme activity assay for  $\beta$ -glucocerebrosidase (ABG), acid sphingomyelinase (ASM),  $\alpha$ -glucosidase (GAA),  $\alpha$ -galactosidase A (GLA), and  $\alpha$ -L-iduronidase (IDUA) was performed using the NeoLSD™ MS/MS kit (Perkin Elmer, Turku, Finland) as previously described (Scott et al., 2013; Elliott et al., 2016; Burlina et al., 2018) by MS/MS. Enzyme assays were expressed in nmol/h/mL.

Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism v6.0 software. GAG levels of MPS I and WT mice were compared using Mann Whitney test for non-parametric data. Enzyme activities were compared using Student's t-test. Both tests were performed at the level of significance of 0.05.

## **Results and Discussion**

All samples used in this study were obtained from young adult animals, aged from 21 to 90 days. According to the genotype, GAG analysis was performed in 4 MPS I and 44 WT (heterozygous) mice. Enzyme activity was performed in 3 MPS I and 11 WT mice.

Mean levels of HS-NS, HS-OS, and DS were significantly higher ( $p < 0.0001$ ) in MPS I mice compared to WT (Fig. 1). There were no overlapping values between MPS I and WT, allowing a clear separation of the groups.

The activity of IDUA was significantly reduced in MPS I mice, as expected (Fig. 2). These data suggest that both GAG levels and IDUA activity levels can be used along with genotype analysis in MPS I mice. To our knowledge, blood GAG levels have not been reported in MPS I mice, and it is interesting to observe that even young mice already have very elevated levels of these molecules, which can then be used as a secondary biomarker.

The level of enzyme activity for ABG, ASM, and GAA showed no statistical difference between groups. It is important to mention that neither of these enzymes were found to be differentially expressed following TFEB overexpression (Sardiello

et al., 2009). However, the activity of GLA was elevated in MPS I animals (Fig. 2). Sardiello et al. observed a 2.9-fold elevation in GLA activity in cell cultures of lysosomal diseases (Sardiello et al., 2009). Here, we observed an approximate 2-fold increase of GLA activity in MPS I mouse blood. Since GLA is a sex-linked gene, it is necessary to inform that the animals used for this analysis were distributed between male and female for both groups (2 males and 1 female MPS I; 5 males and 6 females WT). Furthermore, comparing all males with all females from both genotypes in a single analysis yielded no statistical difference between the groups (data not shown, but  $p > 0.9$ ), indicating that the sex doesn't influence GLA activity here.

Increase in GLA activity was previously observed in the brain of MPS VII mice models by Sferra et al. (2004). The increased activity of GLA may be triggered by the activation of the TFEB pathway, which occurs in lysosomal storage disorders. Because TFEB is a master regulator of lysosomal biogenesis and autophagy, its overexpression may cause an increase in the activity of several lysosomal enzymes. However, more studies are required to elucidate if TFEB is truly responsible for the higher activity of GLA in MPS I mice.

## **Conclusion**

IDUA activity, as expected, was severely reduced in MPS I mice. Besides, elevated GAG levels of HS-OS, HS-NS, and DS were observed in DBS of young MPS I mice. Enzyme activity levels for ABG, ASM, and GAA are not different for MPS I and WT samples.

This paper was the first to report an increased GLA activity in the blood of the MPS I mouse model. Further studies involving the overexpression of TFEB could lead to the determination of a new therapeutic target. Furthermore, elevated blood GAG levels and GLA activity could be established as secondary biomarkers, helping better characterize and diagnose this disease.

## **Acknowledgments**

I.L. conducted this work as part of her master's degree supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brazil). F.K. conducted this work as a postdoctoral fellow supported by Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil. L.V. is a recipient of a doctoral scholarship from CAPES, Brazil. G.B. is a recipient of a research scholarship from CNPq-Brazil. We would like to thank FIPE-HCPA (project ID: 2014-0306) for the support.

## References

BALDO, G.; MAYER, F. Q.; MARTINELLI, B.; DILDA, A.; MEYER, F.; PONDER, K. P.; GIUGLIANI, R.; MATTE, U. Evidence of a progressive motor dysfunction in Mucopolysaccharidosis type I mice. **Behavioural Brain Research**, vol. 233, no. 1, p. 169–175, Jul. 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2012.04.051>.

BLANCHARD, S.; SADILEK, M.; SCOTT, C. R.; TURECEK, F.; GELB, M. H. Tandem Mass Spectrometry for the Direct Assay of Lysosomal Enzymes in Dried Blood Spots: Application to Screening Newborns for Mucopolysaccharidosis I. **Clinical Chemistry**, vol. 54, no. 12, p. 2067–2070, 1 Dec. 2008. <http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2008.115410>.

BURLINA, Alberto B.; POLO, Giulia; SALVIATI, Leonardo; DURO, Giovanni; ZIZZO, Carmela; DARDIS, Andrea; BEMBI, Bruno; CAZZORLA, Chiara; RUBERT, Laura; ZORDAN, Roberta; DESNICK, Robert J.; BURLINA, Alessandro P. Newborn screening for lysosomal storage disorders by tandem mass spectrometry in North East Italy. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, vol. 41, no. 2, p. 209–219, 15 Nov. 2017. <http://dx.doi.org/10.1007/s10545-017-0098-3>.

COUTINHO, M. F.; LACERDA, L.; ALVES, S. Glycosaminoglycan Storage Disorders: A Review. **Biochemistry Research International**, v. 2012, p.1-16. 2012. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/471325>.

ELLIOTT, S.; BUROKER, N.; COURNOYER, J. J.; POTIER, A. M.; TROMETER, J. D.; ELBIN, C.; SCHERMER, M. J.; KANTOLA, J.; BOYCE, A.; TURECEK, F.; GELB, M. H.; SCOTT, C. R. Pilot study of newborn screening for six lysosomal storage

diseases using Tandem Mass Spectrometry. **Molecular Genetics and Metabolism**, vol. 118, no. 4, p. 304–309, Aug. 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2016.05.015>.

KISELOVA, N.; DIERKER, T.; SPILLMANN, D.; RAMSTRÖM, M. An automated mass spectrometry-based screening method for analysis of sulfated glycosaminoglycans. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 450, no. 1, p. 598–603, Jul. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.06.011>.

KUBASKI, F. et al. Glycosaminoglycans detection methods: Applications of mass spectrometry. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 120, n. 1-2, p.67-77, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2016.09.005>.

KUBASKI, F.; DE OLIVEIRA POSWAR, F.; MICHELIN-TIRELLI, K.; MATTE, U. da S.; HOROVITZ, D. D.; BARTH, A. L.; BALDO, G.; VAIRO, F.; GIUGLIANI, R. Mucopolysaccharidosis Type I. **Diagnostics**, vol. 10, no. 3, p. 161, 16 Mar. 2020. <http://dx.doi.org/10.3390/diagnostics10030161>.

NEUFELD E. F.; MUENZER J. The mucopolysaccharidosis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS and Valle D (eds) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill Co, New York, p. 3421-3452. 2001.

PALMIERI, M.; IMPEY, S.; KANG, H.; DI RONZA, A.; PELZ, C.; SARDIELLO, M.; BALLABIO, A. Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways. **Human Molecular Genetics**, vol. 20, no. 19, p. 3852–3866, 13 Jul. 2011. <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddr306>.

SARDIELLO, M.; PALMIERI, M.; DI RONZA, A.; MEDINA, D. L.; VALENZA, M.; GENNARINO, V. A.; DI MALTA, C.; DONAUDY, F.; EMBRIONE, V.; POLISHCHUK, R. S.; BANFI, S.; PARENTI, G.; CATTANEO, E.; BALLABIO, A. A Gene Network Regulating Lysosomal Biogenesis and Function. **Science**, vol. 325, no. 5939, p. 473–477, 25 Jun. 2009. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1174447>

SCOTT, C. R.; ELLIOTT, S.; BUROKER, N.; THOMAS, L. I.; KEUTZER, J.; GLASS, M.; GELB, M. H.; TURECEK, F. Identification of Infants at Risk for Developing Fabry, Pompe, or Mucopolysaccharidosis-I from Newborn Blood Spots by Tandem Mass Spectrometry. **The Journal of Pediatrics**, vol. 163, no. 2, p. 498–503, Aug. 2013.

DOI 10.1016/j.jpeds.2013.01.031. Available at:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpeds.2013.01.031>.

SFERRA, Thomas J.; BACKSTROM, Kristin; WANG, Chuansong; RENNARD, Rachel; MILLER, Matt; HU, Yan. Widespread Correction of Lysosomal Storage Following Intrahepatic Injection of a Recombinant Adeno-associated Virus in the Adult MPS VII Mouse. **Molecular Therapy**, vol. 10, no. 3, p. 478–491, Sep. 2004. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.05.029>.

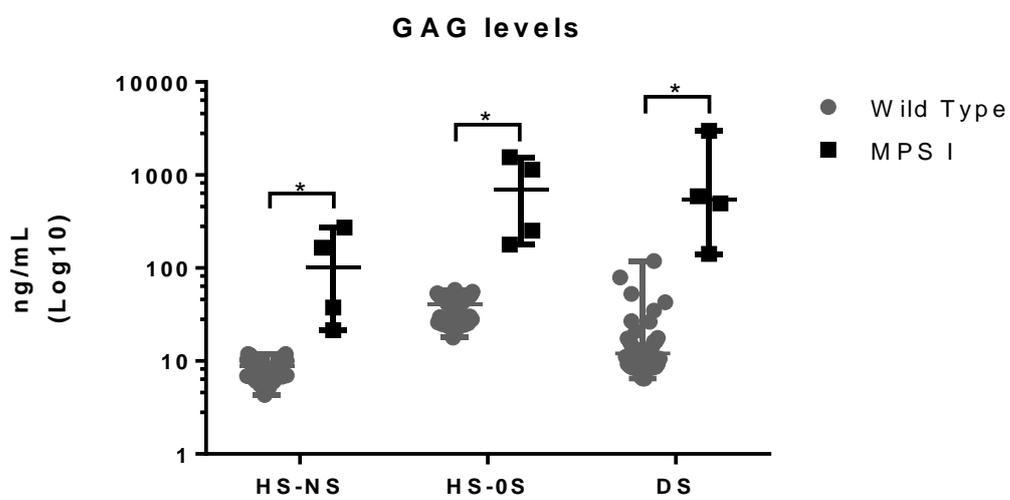


Figure 1: **GAG levels for HS-NS (heparan sulfate N-sulfated), HS-OS (heparan sulfate O-sulfated), and DS (dermatan sulfate) in Log10 scale: MPS I mice were compared with Wild Type. Values were significantly increased in MPS I for all GAGs measured,  $p < 0.001$ .**

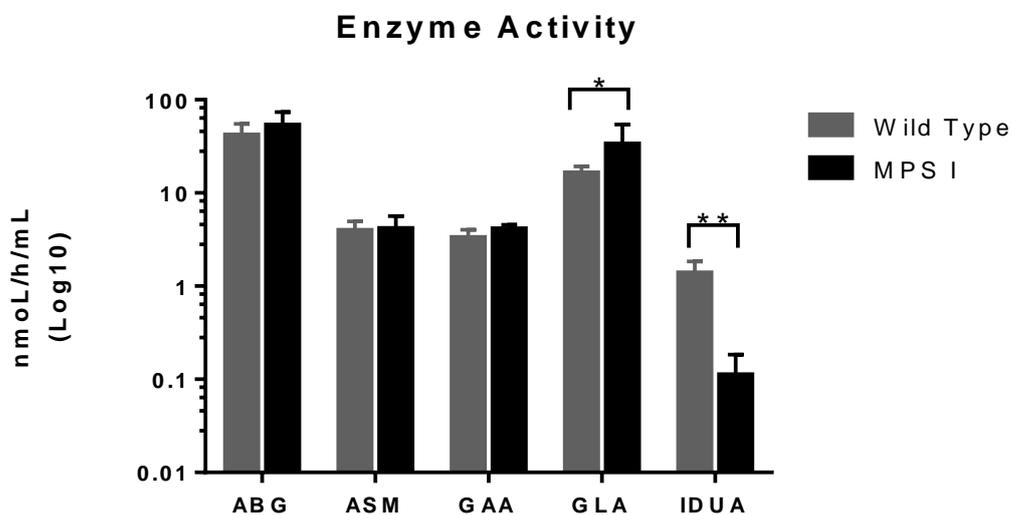


Figure 2: **Enzyme Activities of ABG ( $\beta$ -glucocerebrosidase), ASM (acid sphingomyelinase), GAA ( $\alpha$ -glucosidase), GLA ( $\alpha$ -galactosidase A), and IDUA ( $\alpha$ -L-iduronidase) in Log10 scale:** MPS I mice were compared with Wild Type (heterozygous for *Idua*). Values of ABG, ASM, and GAA showed no statistical difference. GLA activity was increased in MPS I mice. IDUA activity was reduced in MPS I mice. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.001$ .

3.2 Capítulo 2. Situação: Em preparação.

**Glycosaminoglycan accumulation in tissues and fluids from the  
Mucopolysaccharidosis II mouse model**

**Isabelly Maria Barros de Lima<sup>1</sup>, Francyne Kubaski<sup>2</sup>, Guilherme Baldo<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Centro de Terapia Gênica, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Rua Ramiro Barcelos, 2350, Santana, 90035903 - Porto Alegre, RS – Brazil. Orcid: 0000-0002-5831-6601.

<sup>2</sup> Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Serviço de Genética Médica, PPGBM – UFRGS. Ramiro Barcelos 2350, Santana, 90035903 - Porto Alegre, RS – Brazil. Orcid: 0000-0002-9330-0154.

<sup>3</sup> Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Centro de Terapia Gênica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Ramiro Barcelos, 2350, Santana, 90035903 - Porto Alegre, RS – Brazil. Orcid: 0000-0003-1598-5861.

\* Corresponding Author: Dr. Guilherme Baldo. Address: 2350 Ramiro Barcelos, 90035-903, Porto Alegre, RS - Brazil. Phone Number: +55 51 3359-8838. E-mail: gbaldo@hcpa.edu.br.

Word count: 3059

Number of figures: 9

## **Abstract**

MPS II is a lysosomal storage disease caused by a deficiency of the IDS enzyme, resulting in the accumulation of the glycosaminoglycans (GAGs) dermatan sulfate (DS) and heparan sulfate (HS). Laboratory diagnosis for this disease can be performed by GAG quantification, mostly done by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) in recent years. This technique opens several possibilities, including the ability to assess GAG levels in fluids never tested before, such as the saliva, as well as quantify GAG in tissues such as the brain. Therefore, this study aimed to investigate if alterations in GAG levels can be detected in tissues and fluids of MPS II mice, including saliva, and if these alterations correlate with behavioral changes. GAG levels were assessed by LC/MS/MS in serum, urine, tissues, and saliva. At 6 months serum samples yielded no difference in GAG levels between wild type (WT) and MPS II mice. On the other hand, MPS II urine samples presented higher levels of HS and DS. Tissues presented higher levels of both HS and DS for MPS II samples. Specifically, in the brain, cerebellum did not present significant difference between the groups, but frontal and total cortexes had elevated levels of HS in MPS II samples, providing more evidence that cells from the CNS accumulate specifically this GAG. Saliva samples at 4 months showed no significant difference between MPS II and WT, but at 6 months we found elevated levels of HS and DS in MPS II samples. Behavioral tests evidenced in cognitive impairment of MPS II mice at 6 months. These findings can help establish biomarkers in different biological fluids or tissues, helping better characterize and monitor this disease. This is the first report of GAG levels in saliva as a possible diagnostic/biomarker tool for MPS II.

**Keywords:** Biomarker; Diagnosis; Saliva.

## Introduction

Hunter syndrome, or mucopolysaccharidosis type II (MPS II), is an X-linked recessive lysosomal storage disease caused by a deficiency of the enzyme iduronate-2-sulfatase (IDS), having a worldwide incidence of 1 in 100,000 live births (D'AVANZO et al., 2020). Since IDS has a crucial role in the first step of the catabolism of the glycosaminoglycans (GAG) dermatan sulfate (DS) and heparan sulfate (HS), the symptoms of the deficiency arise from their accumulation in the lysosome (NEUFELD; MUENZER, 2001).

GAGs are long and linear polysaccharides, that can be free in the extracellular matrix (ECM) or linked to central proteins (KISELOVA et al., 2014). These molecules are involved in cell growth, differentiation, adhesion, and mobility (LIU et al., 2014). In MPS II, they accumulate in the lysosomes of cells, which increases in size and number, causing dysfunction in affected tissues. Disease symptoms include coarse facial features, skeletal deformities, hepatosplenomegaly, respiratory tract infections, cardiovascular involvement, and in severe cases, cognitive decline (D'AVANZO et al., 2020).

The laboratory diagnosis of MPS is performed by enzyme (IDS) activity, but other methods such as GAG quantification and DNA sequencing can be used to both confirm the diagnosis and monitor treatment effectiveness (KUBASKI et al., 2020). Analysis of GAG levels has been used for a long time to aid MPS diagnosis, but the relatively recent use of tandem mass spectrometry (MS/MS) has improved greatly their quantification in fluids and several tissues (KISELOVA et al., 2014). In previous studies, it was shown that traditional techniques used in GAG quantification fail to distinguish between MPS and wild-type (WT) animals in important tissues such as the brain (TOMATSU et al., 2014). The MS/MS technique offers several advantages, including the possibility of quantifying specific GAG with greater sensitivity (WANG et al., 2020).

The genotype/phenotype correlation in MPS II is not well established, being hard to differentiate patients that will present the neurological form of the disease from those who will not present neurological impairment. Furthermore, treatments that address the central nervous system would also greatly benefit from a good biomarker. The

cerebrospinal fluid (CSF) has been the main sample used for this purpose (HENDRIKSZ et al., 2015). However, because CSF collection is such an invasive and difficult procedure (BABAPOUR MOFRAD et al., 2019), it is important to establish a biomarker obtained from a non-invasive sample source that could reflect brain disease.

The mentioned limitations open several possibilities for GAG quantification using tandem mass spectrometry (TMS), including the ability to assess GAG levels in fluids never tested before, such as the saliva. Because of the close relationship between the salivary glands and the nervous system, saliva is a sample with great biomarker potential for neurodegenerative diseases (SHI et al., 2011; REALE; GONZALES-PORTILLO; BORLONGAN, 2020). Therefore, this study aimed to investigate if alterations in GAG levels can be detected using TMS in tissues and fluids of MPS II mice, including saliva, and if these alterations correlate with behavioral changes.

## **Material and Methods**

The MPS II mice were developed through the insertion of a gene resistant to neomycin in mouse embryonic stem-cells, by removing part of exons 4 and 5 of the murine *IDS* gene (CHO et al., 2015). These animals were purchased from the Jackson Lab ([www.jax.org/strain/024744](http://www.jax.org/strain/024744)). The colony was kept at the Animal Experimentation Unity (UEA – Unidade de Experimentação Animal) at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Animals were housed in groups of 2-5, in individually ventilated plastic cages, under controlled temperatures of 20-24°C, and air humidity of 40-60%. Mice had access to food and water ad libitum and were kept under a 12-hour light/dark cycle. This study was approved by our institutional review board (2019-0611). Mice were genotyped and male mice were separated into two groups: wild-type mice (WT, n=7), or MPS II (IDS knockout, n=7). Genotyping was performed by PCR amplification using genomic DNA extracted from tissue samples of small ears punches as previously reported (BALDO et al, 2015).

## *Samples*

Saliva samples were collected at 4 and 6 months. For such procedure, animals were suspended by the skin of the back at the height of the neck and the saliva was collected from the oral cavity with a swab (Fig. 1), composed of VPA (vinyl polyacetate) surgical sponge with a triangular end. The swab was cut and only the part of the sponge was stored in 0.5 mL tubes. The samples were stored at -20°C before processing.

Urine collection occurred at 6 months. The animals were also immobilized through suspension and urine was collected through a light massage on the mouse's bladder. The samples were preserved in liquid nitrogen, then stored at -20°C before processing.

For blood collection at 6 months, the animals received an overdose of the isoflurane anesthetic until reflexes were no longer detected. Then, approximately 1 mL of blood was collected by cardiac puncture. For organ collection, deep anesthetized animals were injected with 20 mL of cold saline through the heart, and a small cut was also made in the right atrium for the solution to leak (modified from GAGE; KIPKE; SHAIN, 2012). Soon after this procedure, the animal was decapitated to collect the brain, which was placed in cold saline to harden the tissues and assist in the anatomical separation of the cerebellum, frontal cortex, and total cortex; all were separated into 1.5 mL tubes and preserved in liquid nitrogen. The other organs (spleen, heart, liver, kidneys, and lungs) were also collected in 1.5 mL tubes and preserved in liquid nitrogen.

## *Sample processing*

For saliva, swab tips were placed overnight at 37°C with 100 µL of Milli-Q water, in 0.5 mL tubes. Then, small holes were drilled in the tubes, which were then placed inside 1.5 mL tubes for centrifugation at 10,000 rpm for 10 minutes. This centrifugation allows the water and saliva solution to escape from the sponge of the swab in the smaller tube and, through the hole, be stored in the larger tube. This protocol was modified from Bagavant (2018) for the needs of this study.

For blood, samples were processed soon after collection. The tubes were centrifuged at 6,000 rpm for 10 minutes at 4°C, to separate the blood phases. Only the serum was collected and stored at -20°C.

Saliva, serum, and urine do not need further processing before GAG quantification. For the quantification of GAGs in organs, it is necessary to first extract these molecules from the tissues. For this, a protocol previously described by Mochizuki et al. (2008) was used, in which between 10 and 15 mg of each organ is weighted and later used to normalize the quantification of GAGs.

Glycosaminoglycans were assessed using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). Enzymes chondroitinase B (DS) and heparitinase (HS) were used to digest GAG into disaccharides: the process allowed to quantify heparan sulfate N and O -sulfated (HS-NS and HS-OS) and dermatan sulfate (DS). Samples of saliva, serum, urine, and tissues (cerebellum, frontal and total cortex, heart, kidneys, liver, lungs, and spleen) were incubated with a mixture of these 2 enzymes overnight, after this process they were centrifuged with filter plates and the disaccharides were analyzed using LC/MS/MS (KUBASKI et al., 2017). The saliva results were normalized by protein quantification using the Lowry method, being expressed by ng of GAG per mg of protein. The urine results were normalized by the creatinine quantification, being expressed by ng of GAG per mg of creatinine. The tissue results were normalized by the weighted milligrams, being expressed by ng of GAG per mg of each tissue. The serum results are expressed by ng of GAG per mL of serum.

### *Behavioral tests*

Neurological impairment was assessed at 6 months, by open-field and inhibitory avoidance tests, as previously described (AZAMBUJA et al., 2017). The results were correlated with the levels of GAG by Pearson's correlation.

The open field test consists of a square area with 60 cm walls, with the floor divided by parallel and crossed lines in 16 squares of 13 cm<sup>2</sup> each, obtaining 4 central and 12 peripheral squares. Mice were placed in one corner of the open field and were

observed for (a) ambulation (total number of crossings), and (b) rearings, in a period of 5 minutes. The procedure was repeated after 30 minutes to evaluate non-aversive memory (repeated open field test).

The inhibitory avoidance test was performed in an acrylic box (50 x 25 x 25 cm), with a floor formed by parallel stainless-steel bars (1 mm in diameter) with 1 cm of separation. The animals were placed on the equipment platform and their latency to descend on the grid with four legs was recorded. In the training experiment, immediately after descending the platform, the animals received a shock of 0.5 A for 2 seconds. In the retention test sessions, which took place 24 hours after the training (long-term memory retention), no new shocks were administered, and a maximum of 5 minutes was waited for the descent. Differences between retention test and training test drop latencies were used as memory retention scores.

#### *Statistical analysis and ethics*

Data analysis was performed using the GraphPad Prism 6 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA), using Student's t-test (unpaired), nonparametric Mann-Whitney test, and Pearson's correlation. The level of statistical significance was set at  $p < 0.05$ . The study was approved by our Hospital's Ethics committee under the number 2019-0611.

## **Results and Discussion**

Serum and, more traditionally, urine samples, are often used to distinguish MPS II patients from age-matched controls, based on the degree of GAG accumulation assessed by LC/MS/MS (KHAN et al., 2018). Here, however, serum GAG levels in MPS II samples were not significantly higher than those of WT (Fig. 2A) possibly due to the variability observed within each group. On the other hand, urinary GAG levels were much higher in MPS II mice ( $p < 0.05$ ) compared to WT (Fig. 2B), confirming data from previous studies that used LC/MS/MS (KUBASKI et al., 2017).

It has been reported that MPS II mice are characterized by increased urine GAG excretion, as well as increased tissue GAG levels (GARCIA et al., 2007), both of which were observed in this study. Here, we quantified GAGs in several tissues (heart, liver, lungs, kidneys, and spleen), since those are vital organs affected by the disease, manifesting as cardiovascular impairment, hepatosplenomegaly, respiratory tract infection, abdominal hernias, and other symptoms (D'AVANZO et al., 2020).

MPS II mice presented elevated tissue GAG levels at 6 months (Fig. 3), except for HS-NS on the spleen (Fig. 3E), this exception was, again, probably caused by variations within each group. The elevation of GAG observed on these organs is caused by a lack of adequate IDS activity, causing GAGs to not be properly catabolized consequently being accumulated inside the lysosome (NEUFELD; MUENZER, 2001). This leads to an increase in organ size, some of which could be visually observed on organs collected from MPS II mice in this study. Among the organ abnormalities, it was observed a kidney with hydronephrosis and a heart with atrophied atria.

Besides thoracoabdominal organs, GAG levels were also assessed in the brain. For this procedure, anatomical separations of the cerebellum, frontal cortex, and total cortex were used. GAG levels on the cerebellum had no significant difference between MPS II and WT mice (Fig. 4A). This could be an indicator that neither DS nor HS have a high accumulation pattern for MPS II on this specific region of the brain.

GAG levels were also not significantly different between MPS II and WT for DS on the frontal and total cortex. However, HS-NS and HS-OS accumulation were evident for both cortex regions (Fig. 4B and C). This was somewhat expected since all MPSs that present cognitive impairment (MPS I, II, III, and VII) have HS as the predominant accumulated substance (MORIMOTO et al., 2021). Besides, since patients with MPS VI, in which only DS is accumulated, do not develop cognitive impairment, it is more probable that this GAG does not highly accumulate in the brain (HARMATZ, 2017). Therefore, it is safe to assume that MPS II neurological symptoms are related

to HS deposit in the central nervous system, initiating a series of pathologic processes.

GAG levels in saliva at 4 months were not significantly different between MPS II and WT (Fig. 5A). However, at 6 months (Fig. 5B), all GAG were elevated in MPS II mice ( $p < 0.05$ ). It is possible that the use of saliva is more viable for these proposes in older patients, when the accumulation of gags is considered significant.

A study was performed by Doorn et al. (2018), measuring enzymatic activity in saliva of MPS I patients. They found that the  $\alpha$ -Iduronidase (IDUA – enzyme affected in MPS I) activity was reduced in those patients, compared to healthy controls. This further elucidates the possibilities of saliva usage in MPSs, especially since this fluid has a nonhematological origin, is not enclosed by a barrier such as the brain-blood barrier (BBB), and derives from the oral cavity, a well-vascularized space (PROCTOR, 2015). Supporting this theory that saliva contains biomarkers for neurodegenerative diseases, studies indicate that biomarkers for Alzheimer's are expressed or produced by the salivary glands themselves (GLEERUP; HASSELBALCH; SIMONSEN, 2019). The possibility of using saliva for monitoring or diagnosing this type of disease is due to the close relationship between the salivary glands and the nervous system (SHI et al., 2011). The main salivary glands are under direct innervation of cranial nerves VII and IX (FARAH et al., 2018). Therefore, saliva could potentially provide the same or even more information than those provided by blood or urine samples about neurological impairment, and by consequence about treatments that try to improve such situations.

Behavioral tests at 6 months revealed no significant difference between MPS II and WT for the open field tests (Fig. 6A and B). However, MPS II mice showed cognitive impairment in the passive avoidance test (Fig. 6C). MPS II mice took less time to step down from the platform after the training day ( $p = 0.0373$ ). These results could indicate that GAG accumulation in the brain leads to loss of long-term memory, given that passive avoidance tests are performed 24 hours after training, but not of short-term memory, given that open field tests are performed in a span of 1 hour and 30 minutes. Additionally, with a sample size of 7 animals in each group, it is possible that any slight external or internal variable could greatly influence the

results, for instance, MPS II mice present difficulty in movement caused by the disease, something that could affect how data was shown here.

According to data gathered here, it was assumed that neurological symptoms of MPS II mice arose from HS deposit on the brain. Therefore, we sought to find out whether there was a correlation between this GAG accumulation and behavior of MPS II mice at 6 months (Fig. 7), since these tests are used to assess neurological impairment. Given that only the passive avoidance test presented a significant difference between WT and MPS II mice, it was the chosen test to be used for correlations.

Cerebellum levels of HS presented no correlation with behavior, which was somewhat expected given that there was no significant accumulation of GAGs in this region of MPS II mice. The pre-frontal cortex has a key role in guiding memory retrieval by using context information about 'where' and 'what' events occurred, particularly for strategies for solving spatial memory tasks (Preston; Eichenbaum, 2013), therefore it was expected a correlation between high levels of GAG on this region and poor memory, however frontal cortex levels also showed no significant correlation with behavior. Total cortex, on the other hand, had a high negative correlation with behavior, meaning that the mice who performed poorly in the long-term memory task had a higher level of both HSNS and HSOS on this region of the brain.

Since both saliva and cortex levels of HS were elevated in MPS II mice at 6 months, we hypothesized that a correlation between such levels could be present. However, after analysis (Fig. 8) it was verified that none of the combinations showed significant correlation. Correlations of saliva levels of HS and behavior of MPS II mice at 6 months were also evaluated (Fig. 9). However, there was an absence of correlation between all possible combinations. It is reasonable that the behavior tests used showed great variability and did not reflect the exact reality of MPS II for to be a conclusive correlation between them and saliva. Since this was the first time GAG levels were measured in saliva of MPS II mice, some adjustments might beneficiate new tests, leading to a greater correlation between GAG levels in saliva and GAG levels in the brain.

To the best of our knowledge, this is the first study to investigate the potential of salivary GAGs as a biomarker for MPS II. Furthermore, considering that the collection of saliva is a noninvasive alternative compared with the collection of cerebrospinal fluid (CSF) or serum, once confirmed as a viable option for diagnosis in MPS II, this technique could be expanded for other MPSs.

## **Conclusions**

Cognitive impairment was evident at 6 months in MPS II mice evidenced by poor performance in the aversive memory test. Serum GAG levels showed no statistical difference between MPS II and WT. Urinary GAG levels were higher in MPS II mice, as expected since urine is often used for MPS II diagnosis. DS and HS levels were elevated in the tissues, while only HS was elevated in the brain cortex.

Salivary GAG levels were different at 6 months, when MPS II had elevated DS and HS, compared to WT, indicating a gradual process of GAG accumulation. However, we could not find correlations between salivary and brain GAG levels nor with behavioral performance. These results suggest that salivary GAG levels can be used as a noninvasive biomarker in patients, but they might not directly reflect brain GAG levels. Future studies will focus on evaluating salivary GAG levels in patients from MPS disorders and their correlations with disease characteristics.

## **Acknowledgments**

I.L. conducted this work as part of her master's degree supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brazil). F.K. conducted this work as a postdoctoral fellow supported by Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil. G.B. is a recipient of a research scholarship from CNPq-Brazil. We would like to thank FIPE-HCPA (project ID: 2019-0611) for the support.

## **References**

AZAMBUJA, A.; CORREA, L.; GABIATTI, B.; MARTINS, G.; FRANCO, Á.; RIBEIRO, M.; BALDO, G. Aversive and non-aversive memory impairment in the mucopolysaccharidosis II mouse model. **Metabolic Brain Disease**, v. 33, n. 1, p. 343-345, 16 set. 2017. <http://dx.doi.org/10.1007/s11011-017-0110-5>.

BABAPOUR MOFRAD, R. et al. Cerebrospinal fluid collection: An informative animation video for patients and caregivers. **Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring**, v. 11, n. 1, p. 435–438, 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dadm.2019.04.005>.

BAGAVANT, H. et al. A Method for the Measurement of Salivary Gland Function in Mice. **Journal of Visualized Experiments**, n. 131, 25 jan. 2018. <http://dx.doi.org/10.3791/57203>.

BALDO G.; LORENZINI D.M.; SANTOS D.S.; MAYER F.Q.; VITRY S.; BIGOU S.; HEARD J.M.; MATTE U.; GIUGLIANI R. Shotgun proteomics reveals possible mechanisms for cognitive impairment in Mucopolysaccharidosis I mice. **Mol Genet Metab**, v. 114, n. 2, p. 138-45, feb. 2015.

CHO, S. Y. et al. Effect of systemic high dose enzyme replacement therapy on the improvement of CNS defects in a mouse model of mucopolysaccharidosis type II. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 10, n. 1, p.141-150, 31 out. 2015. <http://dx.doi.org/10.1186/s13023-015-0356-0>.

D'AVANZO, F.; RIGON, L.; ZANETTI, A.; TOMANIN, R. Mucopolysaccharidosis Type II: one hundred years of research, diagnosis, and treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 4, p. 1258, 13 fev. 2020. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21041258>.

FARAH, R; HARATY, H; SALAME, Z; FARES, Y; OJCIUS, D; SADIER, N. Salivary biomarkers for the diagnosis and monitoring of neurological diseases. **Biomedical Journal**, v. 41, n. 2, p. 63-87, abr. 2018. [Http://dx.doi.org/10.1016/j.bj.2018.03.004](http://dx.doi.org/10.1016/j.bj.2018.03.004).

GAGE, G. J.; KIPKE, D. R.; SHAIN, W. Whole Animal Perfusion Fixation for Rodents. **Journal of Visualized Experiments**, n. 65, 30 jul. 2012. <http://dx.doi.org/10.3791/3564>.

GARCIA, A. R.; PAN, J.; LAMSA, J. C.; MUENZER, J. The characterization of a murine model of mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome). **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 30, n. 6, p. 924-934, 16 set. 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1007/s10545-007-0641-8>.

GLEERUP, H. S.; HASSELBALCH, S. G.; SIMONSEN, A. H. Biomarkers for Alzheimer's Disease in Saliva: a systematic review. **Disease Markers**, v. 2019, p. 1-11, 2 maio 2019. <http://dx.doi.org/10.1155/2019/4761054>.

HARMATZ, P. Mucopolysaccharidosis VI pathophysiology diagnosis and treatment. **Frontiers in Bioscience**, v. 22, n. 3, p. 385-406, 2017. <http://dx.doi.org/10.2741/4490>.

HENDRIKSZ, C. J.; MUENZER, J.; VANDERVER, A.; DAVIS, J. M.; BURTON, B. K.; MENDELSON, N. J.; WANG, N.; PAN, L.; PANO, A.; BARBIER, A. J. Levels of glycosaminoglycans in the cerebrospinal fluid of healthy young adults, surrogate-normal children, and Hunter syndrome patients with and without cognitive impairment. **Molecular Genetics and Metabolism Reports**, vol. 5, p. 103–106, dez. 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgmr.2015.11.001>.

KHAN, S. A.; MASON, R. W.; GIUGLIANI, R.; ORII, K.; FUKAO, T.; SUZUKI, Y.; YAMAGUCHI, S.; KOBAYASHI, H.; ORII, T.; TOMATSU, S. Glycosaminoglycans analysis in blood and urine of patients with mucopolysaccharidosis. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 125, n. 1-2, p. 44-52, set. 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2018.04.011>.

KISELOVA, N.; DIERKER, T.; SPILLMANN, D.; RAMSTRÖM, M. An automated mass spectrometry-based screening method for analysis of sulfated glycosaminoglycans. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 450, n. 1, p. 598-603, jul. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.06.011>.

KUBASKI, F. **Diagnosis and Therapies for Mucopolysaccharidoses**. 2017. 320 f. Tese (Doutorado) - Curso de Philosophy in Biological Sciences, University of Delaware, Dalaware, 2017.

KUBASKI, F.; POSWAR, F. O.; MICHELIN-TIRELLI, K.; BURIN, M. G.; ROJAS-MÁLAGA, D.; BRUSIUS-FACCHIN, A. C.; LEISTNER-SEGAL, S.; GIUGLIANI, R. Diagnosis of Mucopolysaccharidoses. **Diagnostics**, v. 10, n. 3, p. 172, 22 mar. 2020. <http://dx.doi.org/10.3390/diagnostics10030172>.

LIU, Z.; ZHANG, F.; LI, L.; LI, G.; HE, W.; LINHARDT, R. J. Compositional analysis and structural elucidation of glycosaminoglycans in chicken eggs. **Glycoconjugate Journal**, v. 31, n. 8, p. 593-602, 14 set. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10719-014-9557-3>.

MOCHIZUKI, H.; YOSHIDA, K.; SHIBATA, Y.; KIMATA, K. Tetrasulfated Disaccharide Unit in Heparan Sulfate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 45, p. 31237-31245, nov. 2008. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m801586200>.

MORIMOTO, H. et al. Clearance of heparan sulfate in the brain prevents neurodegeneration and neurocognitive impairment in MPS II mice. **Molecular Therapy**, v. 29, n. 5, p. 1-9, jan. 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.01.027>.

NEUFELD E.F.; MUENZER J. The Mucopolysaccharidoses. In **The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Diseases**: C. Scriver; A. Beaudet; W. Sly; D. Vaele. New York: Mc Graw-Hill. pp. 3421-3452. 2001.

PRESTON, A. R.; EICHENBAUM, H. Interplay of Hippocampus and Prefrontal Cortex in Memory. **Current Biology**, v. 23, n. 17, p. 764-773, set. 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2013.05.041>.

PROCTOR, G. B. The physiology of salivary secretion. **Periodontology 2000**, v. 70, n. 1, p. 11-25, 10 dez. 2015. <http://dx.doi.org/10.1111/prd.12116>.

REALE, M.; GONZALES-PORTILLO, I.; BORLONGAN, C. V. Saliva, an Easily Accessible Fluid as Diagnostic Tool and Potent Stem Cell Source for Alzheimer's Disease: Present and Future Applications. **Brain Research**, v. 1727, p. 146535, jan. 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2019.146535>.

SHI, M. et al. Salivary Tau Species are Potential Biomarkers of Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 27, n. 2, p. 299–305, 18 nov. 2011. <http://doi.org/10.3233/JAD-2011-110731>.

TOMATSU, S.; SHIMADA, T.; MASON, R.; MONTAÑO, A.; KELLY, J.; LAMARR, W.; KUBASKI, F.; GIUGLIANI, R.; GUHA, A.; YASUDA, E. Establishment of Glycosaminoglycan Assays for Mucopolysaccharidoses. **Metabolites**, v. 4, n. 3, p. 655-679, 11 ago. 2014. <http://dx.doi.org/10.3390/metabo4030655>.

VAN DOORN, J. et al. Salivary  $\alpha$ -Iduronidase Activity as a Potential New Biomarker for the Diagnosis and Monitoring the Effect of Therapy in Mucopolysaccharidosis Type I. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 24, n. 9, p. 1808-1813, set. 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2018.06.001>.

WANG, J.; BHALLA, A.; ULLMAN, J.; FANG, M.; RAVI, R.; ARGUELLO, A.; THOMSEN, E.; TSOGTBAATAR, B.; GUO, J.; SKUJA, L. High-Throughput Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Quantification of Glycosaminoglycans as Biomarkers of Mucopolysaccharidosis II. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 15, p. 5449, 30 jul. 2020. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21155449>.



Figure 1: **Collection of mouse saliva:** Mice were restrained, and saliva was collected using a swab of VPA surgical sponge with a triangular end.

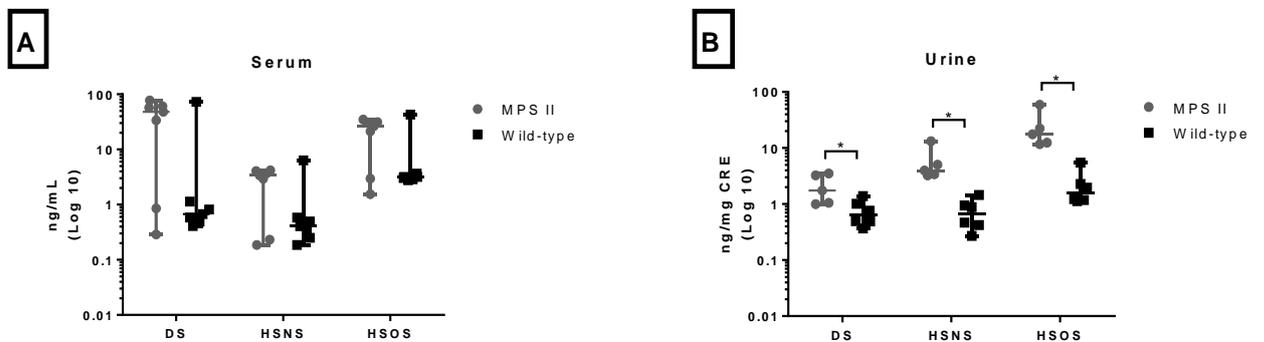


Figure 2: Serum and urinary GAGs at 6 months. **A: Serum GAG levels.** DS (dermatan sulfate), HS-NS (heparan sulfate N-sulfated), and HS-OS (heparan sulfate O-sulfated): MPS II mice were compared with WT. There was no statistically significant difference between the groups after nonparametric Mann-Whitney test. **B: GAG levels DS, HS-NS, and HS-OS in the urine:** values were significantly increased in MPS II for all GAGs measured,  $p < 0.05$ .

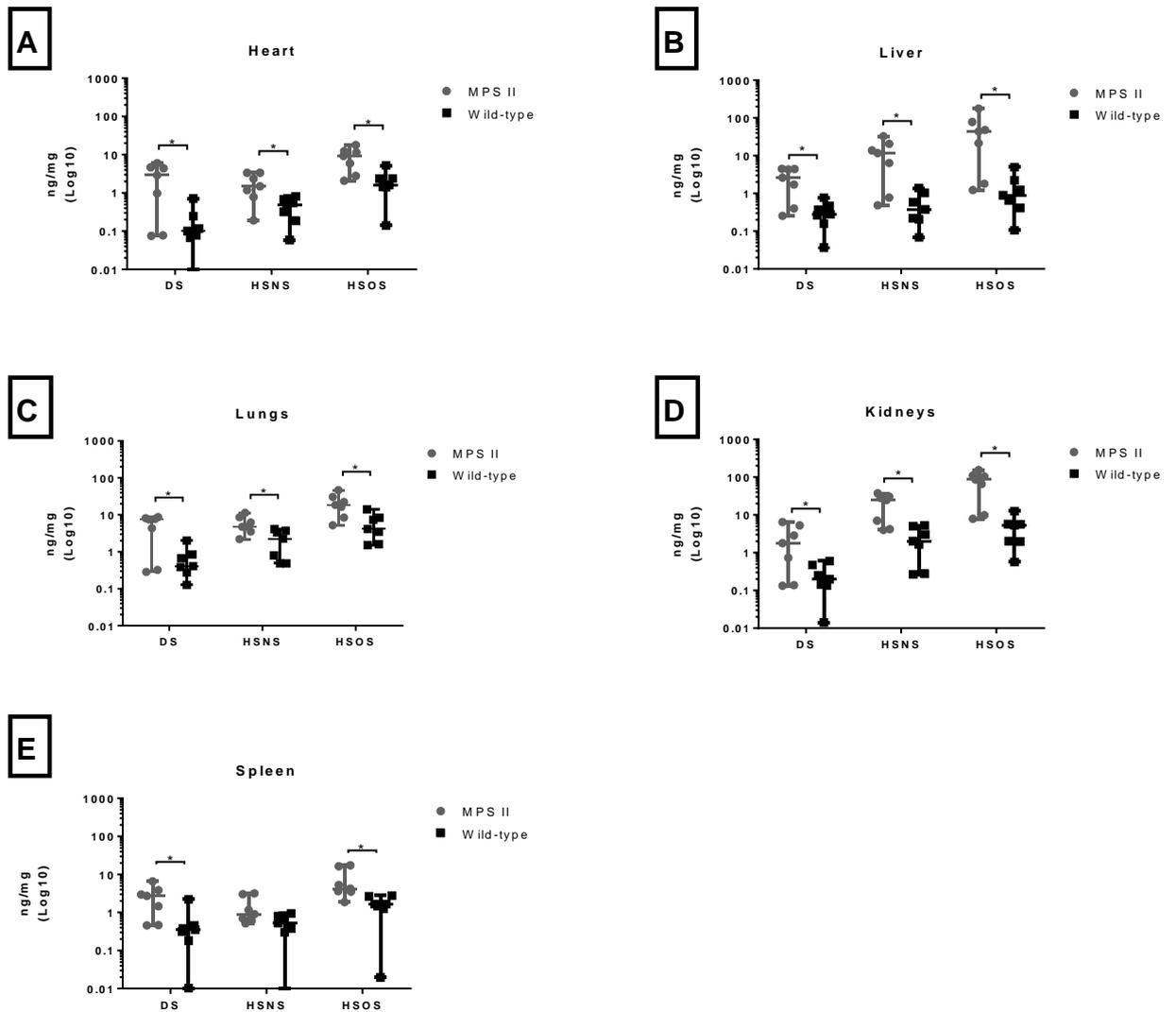


Figure 3: Tissue GAG levels at 6 months. **A: GAG levels of DS, HS-NS, and HS-OS in Heart. B: GAG levels in Liver. C: GAG levels in Lungs. D: GAG levels in Kidneys. E: GAG levels in Spleen.** Except for HS-NS on the Spleen, all other GAG levels were significantly higher in MPS II organ samples, compared to WT ( $p < 0.05$ ).

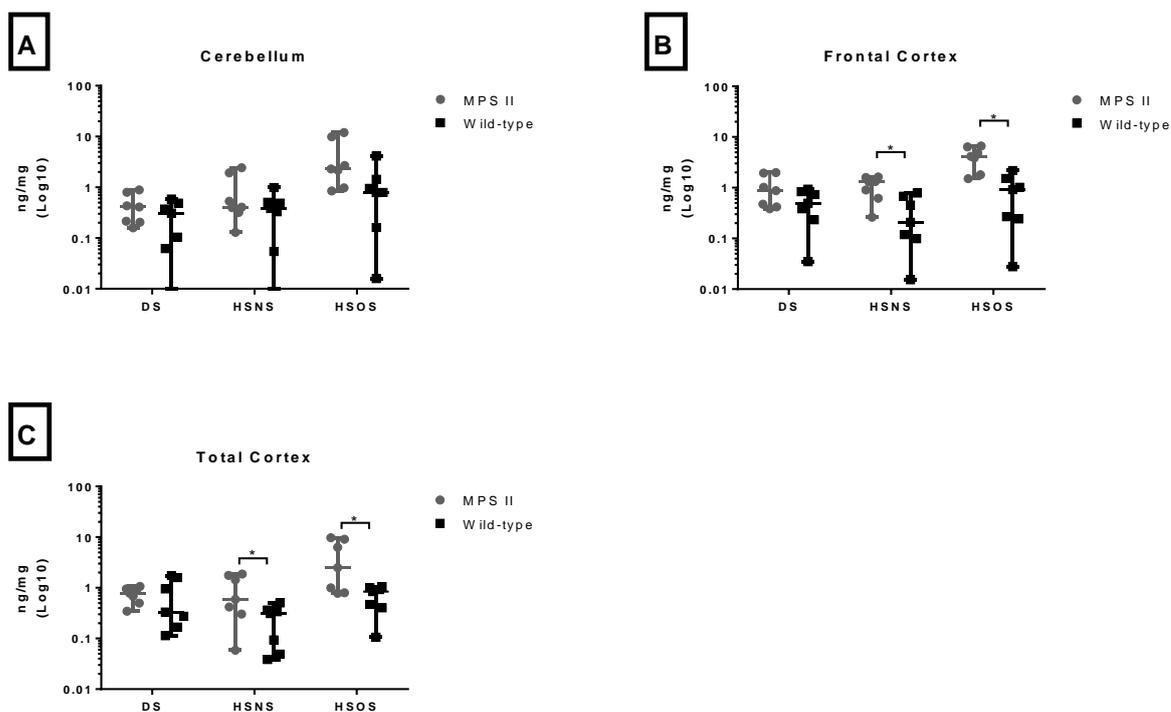


Figure 4: Brain GAG levels at 6 months. **A: GAG levels of DS, HS-NS, and HS-OS of the Cerebellum.** There was no significant difference in GAG levels between MPS II and WT mice. **B: GAG levels of Frontal Cortex.** **C: GAG levels of Total Cortex.** Only both HS levels were elevated in MPS II mice on Frontal and Total Cortex.  $p < 0.05$ .

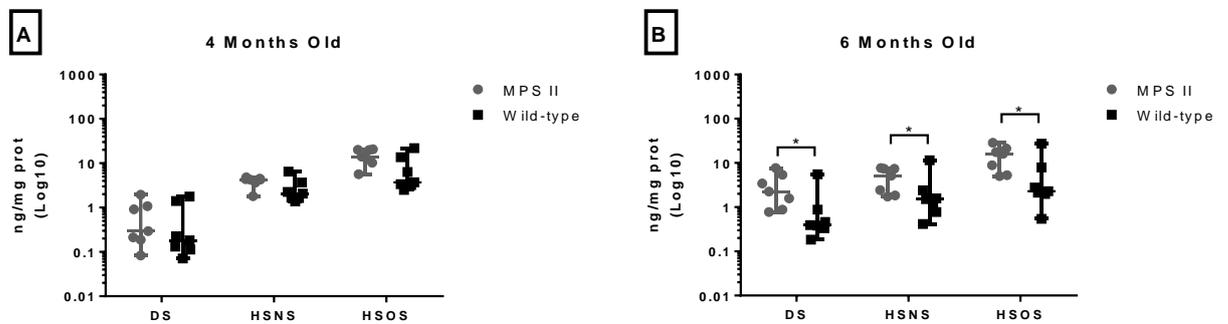


Figure 5: Salivary GAG levels at 4 and 6 months. **A: GAG levels of DS, HS-NS, and HS-OS of saliva at 4 months:** there was no significant difference of GAG levels between MPS II and WT. **B: GAG levels of saliva at 6 months:** GAG levels were significantly higher in the saliva of MPS II mice, compared to WT.  $p < 0.05$ .

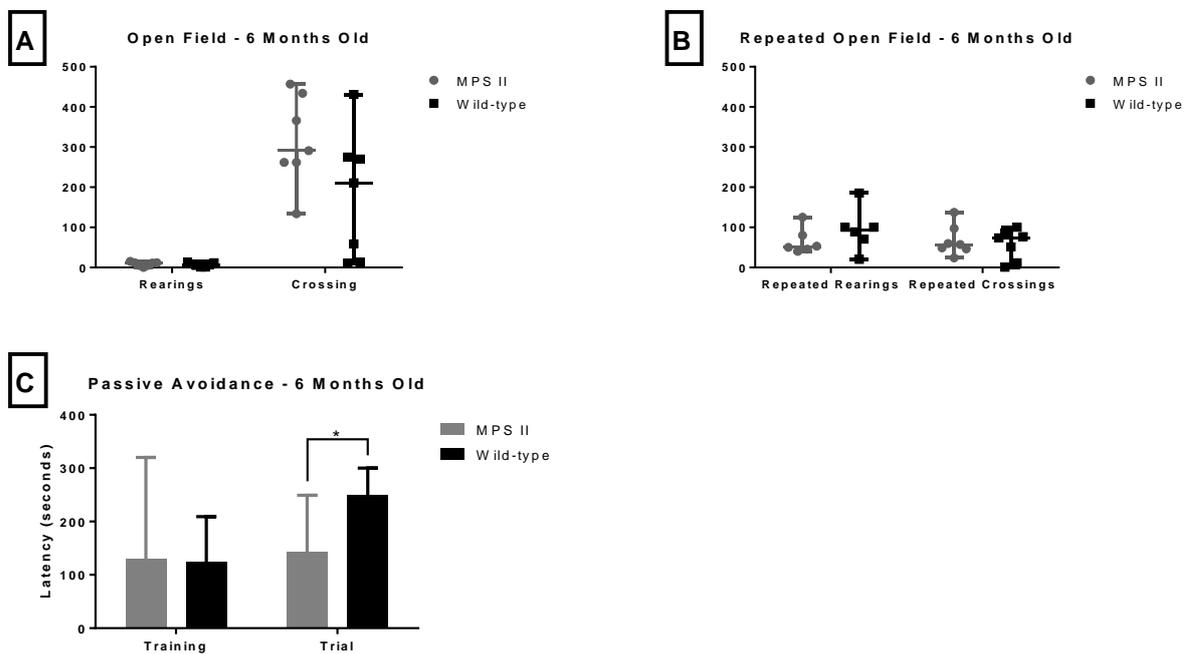
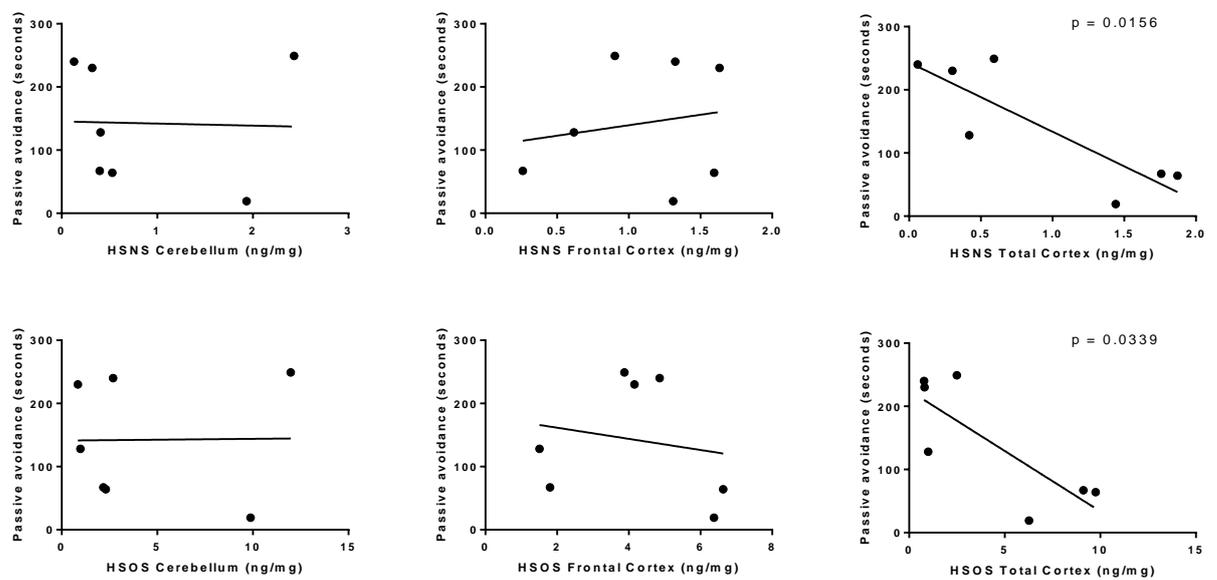


Figure 6: Behavioral analysis at 6 months. **A: Rearings and crossings for the open field test at 6 months. B: Repeated open field test at 6 months. C: Passive avoidance test at 6 months,  $p=0.0373$ .** Only the passive avoidance test had a significant difference between WT and MPS II mice, indicating possible neurological impairment.



**Figure 7: Correlation between HS levels in areas of the brain and behavior of MPS II mice at 6 months.** Both HSNS and HSOS levels on Total Cortex had a negative correlation with behavior, with p values 0.0156 and 0.0339, respectively. All other combinations presented no significant correlation.

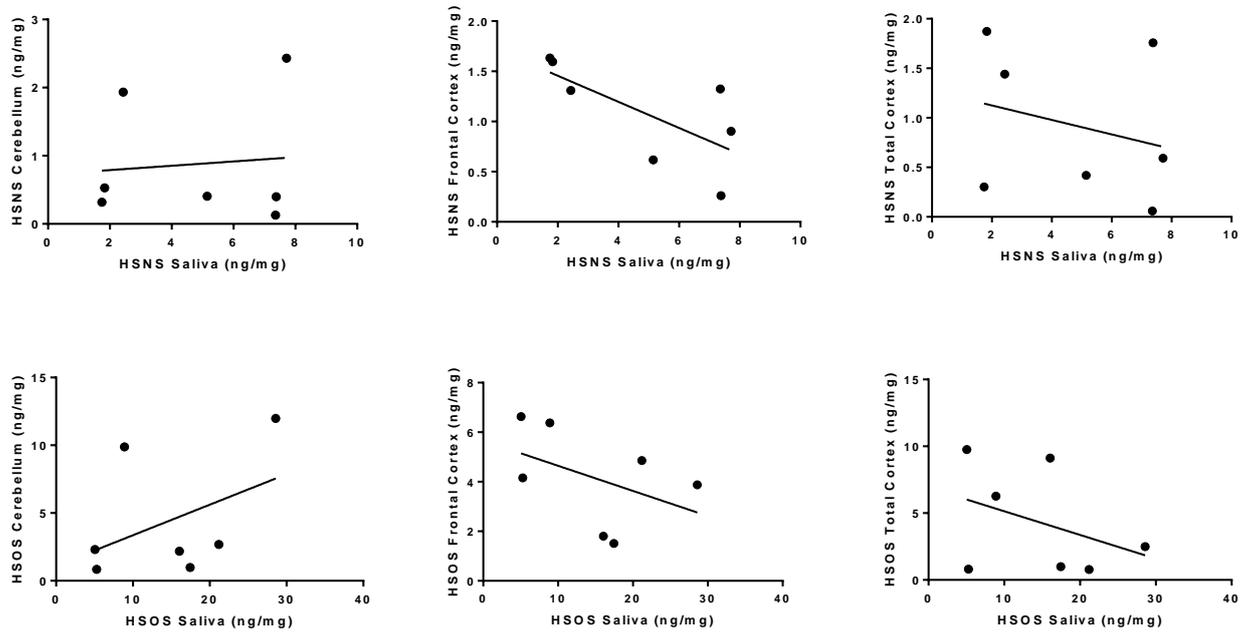


Figure 8: **Correlation between HS levels in areas of the brain and HS levels of saliva of MPS II mice at 6 months.** None of the combinations presented a significant correlation.

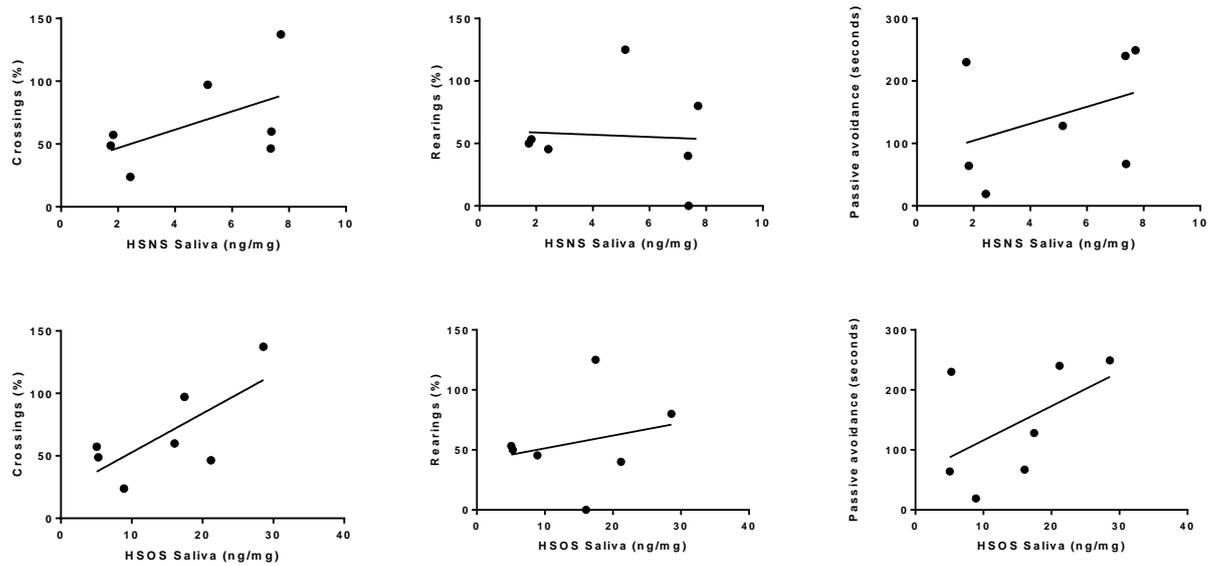


Figure 9: **Correlation between HS levels in saliva and behavior of MPS II mice at 6 months.** None of the combinations presented a significant correlation. Behavior tests used: Open field (crossing and rearing) and passive avoidance.

#### 4. DISCUSSÃO GERAL

Identificar certa diversidade de biomarcadores para uma mesma doença é considerado benéfico, tanto ao fornecer alvos terapêuticos mais informativos e precisos, quanto ao avaliar a progressão da doença e do resultado das intervenções, além de permitir relacionar os efeitos clínicos observados em pacientes com sua possível causa celular ou molecular (MASHIMA; OKUYAMA; OHIRA, 2020).

De acordo com *Biomarkers Definitions Working Group* (2001), biomarcadores são definidos como: “Uma característica que é objetivamente medida e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, processos patogênicos ou respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica”. Dessa forma, biomarcadores podem ser usados como ferramenta de diagnóstico, para avaliar a progressão da doença, como um indicador do prognóstico da doença, e como ferramenta de predição e monitoramento da resposta clínica a uma intervenção.

A investigação de biomarcadores para MPSs vem sendo realizada aproximadamente desde os anos 1950 (KOBAYASHI, 1959). Na década seguinte, pesquisas sobre a biologia e a bioquímica de polissacarídeos humanos fortaleceu essa busca, fornecendo informações sobre a mudança que essas moléculas sofrem na vida fetal e com a idade, permitindo identificar que existe um defeito na síntese do precursor de glicolípídios nessas doenças (NIELCHIOR; CLAUSEN; DYGGVE, 1965). Nos anos 1970, já era aceito a hipótese de que MPSs eram causadas por deficiências de enzimas lisossômicas responsáveis pela degradação de certas moléculas (LEVIN; JACOBY, 1972), incentivando futuras pesquisas que buscassem biomarcadores relacionados. Nos próximos anos, com o advento de novas tecnologias, as investigações tiveram maior embasamento prático, comprovando a deficiência de enzimas lisossômicas específicas para cada tipo de MPS, assim como identificando aumento de GAGs nos lisossomos dos pacientes (NEUFELD; MUENZER, 2001).

Nesse trabalho, a investigação de biomarcadores para MPS I e II teve a intenção de fornecer novas possibilidades de diagnóstico confirmatório, assim como de ferramentas de acompanhamento de tratamentos futuros. Em MPS II, foi dada uma

atenção especial para registrar se esses biomarcadores são capazes de refletir os sintomas neurológicos observados nessas doenças.

Foi consistente a observação de níveis elevados dos GAGs DS e HS tanto para os camundongos com MPS I como para os com MPS II. Especificamente para MPS I, esses biomarcadores nas amostras usadas aqui já são bem reconhecidos na literatura (KUBASKI et al., 2017 – a). Sangue impregnado em papel filtro, a amostra usada para medir GAGs em camundongos MPS I, é comumente usada na prática clínica, em especial para triagem neonatal (TAYLOR et al., 2019 – a). Uma nota importante é que mesmo camundongos com pouca idade, entre 21 e 90 dias de vida, considerados jovens adultos, já apresentaram níveis elevados de GAGs, sendo possível diferenciá-los estatisticamente dos camundongos não afetados pela doença. Isso indica que apesar do acúmulo de GAG ser progressivo (STAPLETON et al., 2020), esse acúmulo já é significativo em animais muito jovens com MPS I.

Ainda em amostras de camundongos com MPS I, testes de atividade enzimática provaram que a ação da  $\alpha$ -L-iduronidase estava reduzida. Historicamente, o diagnóstico de MPS I é realizado primeiramente ao observar níveis elevados de DS e/ou HS na urina, seguido pela coleta de sangue para avaliar a atividade da enzima IDUA, sendo o diagnóstico alcançado ao combinar altos níveis de GAG urinários a níveis baixos ou nulos da atividade enzimática (YU et al., 2020). Aqui, apesar de não terem sido realizados testes com amostras de urina, há indícios de que essa atividade extremamente reduzida da enzima IDUA em sangue possa ser mantida como o padrão ouro para diagnóstico.

Juntamente a 8 enzimas lisossômicas deficientes em diferentes MPSs, a atividade enzimática de IDUA foi medida pela primeira vez por ensaios fluorométricos em SIPF por Chamoles e colaboradores (2001). Esse foi um importante passo para o diagnóstico dessas doenças de maneira rápida e segura, já que esse tipo de amostra oferece vantagens quanto ao manuseio, armazenamento e transporte, quando comparada aos métodos tradicionais de coleta de sangue (BREIER et al., 2017). Particularmente para um país de longa extensão territorial e poucos recursos financeiros, como o Brasil, o uso de amostras de SIPF sobrepõe muitas dificuldades impostas por condições ambientais e de

recursos, sendo um método mais barato, que depende de equipamentos portáteis e que pode ser realizado com eficácia por pessoal minimamente treinado (SU et al., 2018).

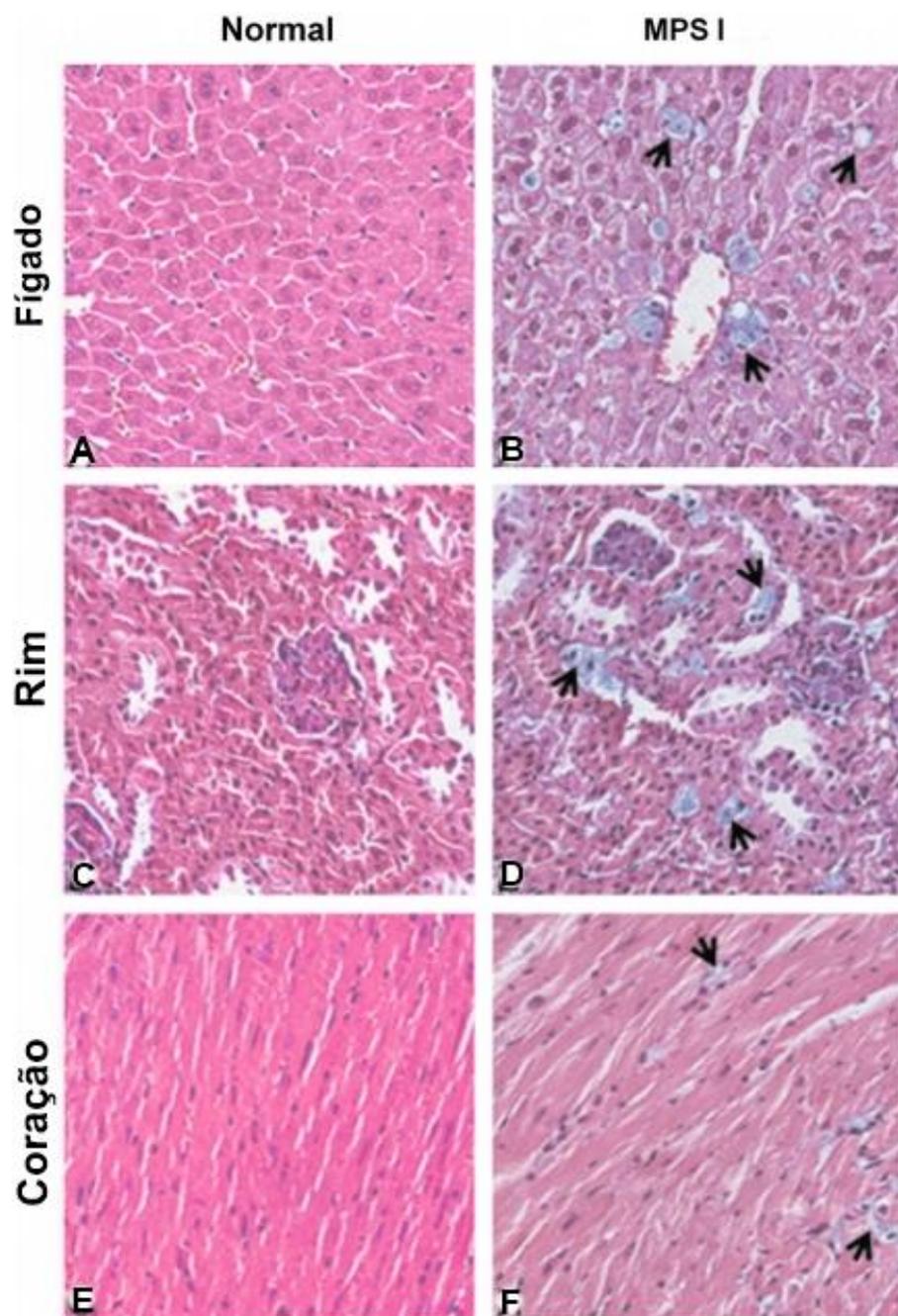


Figura 3: Visão histológica dos tecidos de órgãos de camundongos normais e MPS I. **A, C e E:** Camundongos normais. **B, D e F:** Camundongos com MPS I. *Fonte: Modificado de Lagranha et al. (2017).*

A atividade reduzida de IDUA observada aqui, era esperada e já bem estabelecida na literatura. Mas para o nosso conhecimento, o nível de GAG em amostras de SIPF não foi reportado anteriormente para camundongos com MPS I. É importante frisar que essa combinação de marcadores pode passar a ser usada juntamente à análise do genótipo em camundongos com MPS I. Isso pois a cascata de eventos parte do gene defeituoso, para a enzima defeituosa ou ausente, levando ao acúmulo de GAGs em diversos tecidos (Fig. 3), que finalmente causa todos os sintomas sistêmicos dessa doença (NEUFELD; MUENZER, 2001).

Ao avaliarmos, além da IDUA, o nível de atividade de diversas enzimas lisossômicas em camundongos com MPS I:  $\beta$ -glucocerebrosidase (ABG), esfingomielinase ácida (ASM),  $\alpha$ -glucosidase (GAA) e  $\alpha$ -galactosidase A (GLA), a amostra de sangue impregnado em papel filtro apontou um aumento da atividade de GLA de aproximadamente 2 vezes em MPS I, comparada aos camundongos normais. A deficiência dessa enzima é a responsável pela doença de Fabry, uma das mais prevalentes dentre as doenças de depósito lisossômico, levando ao acúmulo predominantemente dos substratos globotriaosilceramida (Gb3) e globotriaosilsfingosina (LysoGb3) (VEEN et al., 2020).

Atividades enzimáticas elevadas de GLA já foram reportadas no cérebro de camundongos com MPS VII, existindo a hipótese de que as elevações dessas atividades são secundárias a anormalidades lisossômicas induzidas por armazenamento (SFERRA et al., 2004). Entretanto, essa elevação nunca foi observada em amostras de sangue de camundongos com MPS I, sugerindo que realmente existe uma conexão entre o armazenamento progressivo de moléculas no lisossomo com uma resposta celular de ativação de outras enzimas de degradação, como uma tentativa de compensar o desequilíbrio que está se formando. Mesmo assim, esse aumento não é uma resposta observada em 100% dos casos, pois pode haver diminuição da atividade de GLA, mesmo quando outras enzimas lisossômicas continuam deficientes (SFERRA et al., 2004)

Como a degradação ocorrida no lisossomo pode ter requerimentos diferenciados dependendo do tipo de tecido, idade da célula e condições ambientais, Sardiello et al. (2009) sugeriram a presença de um programa celular que coordenasse a expressão das enzimas lisossomais. Esse programa seria regulado pelo fator de transcrição EB que coordenaria a expressão da enzima GLA, assim como de outras enzimas lisossômicas e de algumas enzimas não-lisossômicas ligadas a rotas de degradação celular. Foi observado, após armazenamento de moléculas não-degradadas no lisossomo, que realmente há uma ativação do fator EB. Especificamente em MPS I, com a presença de superexpressão de TFEB, a degradação de GAGs se deu numa velocidade maior quando comparado aos controles de expressão normal (SARDIELLO et al., 2009).

Como todas as outras enzimas medidas (ABG, ASM e GAA) apresentaram atividades similares em camundongos com MPS I e normais, é importante frisar que nenhuma delas foi identificada com expressão diferenciada após a superexpressão do TFEB, sugerindo que não são coordenadas por ele (SARDIELLO et al., 2009). Portanto, uma hipótese plausível é que em camundongos com MPS I, após acúmulo de GAG causado pela deficiência de IDUA, acontece a ativação da rota do TFEB, levando ao aumento da atividade de GLA como uma resposta fisiológica celular ao estresse lisossômico, na tentativa de aprimorar o sistema de degradação.

Uma limitação dessa hipótese é que aqui as expressões de TFEB não foram quantificadas para diferenciar amostras de camundongos com MPS I e normais. Portanto, mais estudos são necessários para confirmar se TFEB está realmente envolvido no aumento da atividade enzimática de GLA em MPS I, como medir a expressão desse fator. Além disso, esses estudos poderão elucidar o uso da superexpressão de TFEB como novos alvos terapêuticos, tanto para MPS I, como para possivelmente outras doenças de depósito lisossômico.

A segunda parte dessa pesquisa foi realizada envolvendo o modelo animal de MPS II. Para essa doença, a análise de GAGs urinários e no soro de pacientes é bem estabelecida como uma forma de diagnóstico, sendo usada junto a análise da atividade enzimática de IDS para confirmar a doença (KUBASKI et al., 2020). Aqui,

a análise da urina separou bem os grupos, com camundongos com MPS II apresentando altos níveis de GAGs e camundongos normais baixos níveis, confirmando sua capacidade de diagnóstico. Inesperadamente, a análise do soro não conseguiu distinguir os grupos, especialmente por causa de um camundongo normal que apresentou níveis muito elevados de GAGs, assim como dois camundongos com MPS II que apresentaram níveis baixos de GAGs. Para garantir que os resultados não estavam contaminados de alguma forma, as análises desses *outliers* foram repetidas, apresentando resultados muito similares aos anteriores. Além disso, a genotipagem a partir do DNA desses animais também foi repetida usando novas amostras, para confirmar que eram mesmo MPS II ou normais de acordo com os dados originais, confirmando que a primeira genotipagem estava correta. Vale salientar que as quantificações de GAGs na urina e no soro foram realizadas com amostras de camundongos com 6 meses de vida, quando o acúmulo de GAG já atingiu níveis significativos, gerando grandes consequências para os animais (COUTINHO; LACERDA; ALVES, 2012).

Mais quantificações de GAGs foram realizadas no baço, coração, fígado, pulmões e rins. Todas essas amostras foram coletadas aos 6 meses de vida dos camundongos, após eutanásia. Visualmente já era possível identificar algumas diferenças entre os camundongos normais e com MPS II, pois enquanto os órgãos dos camundongos normais não apresentaram nenhuma modificação, os de camundongos com MPS II se encontravam bem maiores, especialmente o fígado e o baço, além de apresentarem algumas anomalias, dentre elas um rim com hidronefrose e um coração com átrios atrofiados. Hidronefrose já foi observada, e tratada com terapia de reposição enzimática, em pacientes com MPS II (NISHIYAMA et al., 2017). Já anormalidades cardíacas são comuns em MPS II, dentre elas espessamento da válvula cardíaca, regurgitação e estenose valvular, hipertrofia cardíaca e dilatação da raiz aórtica (LIN et al., 2021).

Essas observações se devem ao acúmulo de GAGs nesses órgãos, comprovado aqui pelas análises realizadas através de LC-MS/MS que identificou níveis elevados de DS e HS em todos os órgãos, com exceção de HS-NS no baço que não apresentou diferença estatística entre os grupos. É bem estabelecido na literatura que existe esse acúmulo de GAGs na maioria dos órgãos sistêmicos,

assim como no cérebro, causado pela deficiência parcial ou total da atividade da enzima IDS (KOBOLÁK et al., 2019). Especificamente, para o modelo de camundongos com MPS II, já foi reportado que com 40 semanas de vida quase todos os órgãos apresentam peso aumentado (GARCIA; PAN; LAMSA; MUENZER, 2007). Além disso, nesse modelo é possível diferenciar animais MPS II de normais simplesmente ao comparar as características faciais como exemplificado na figura 4.

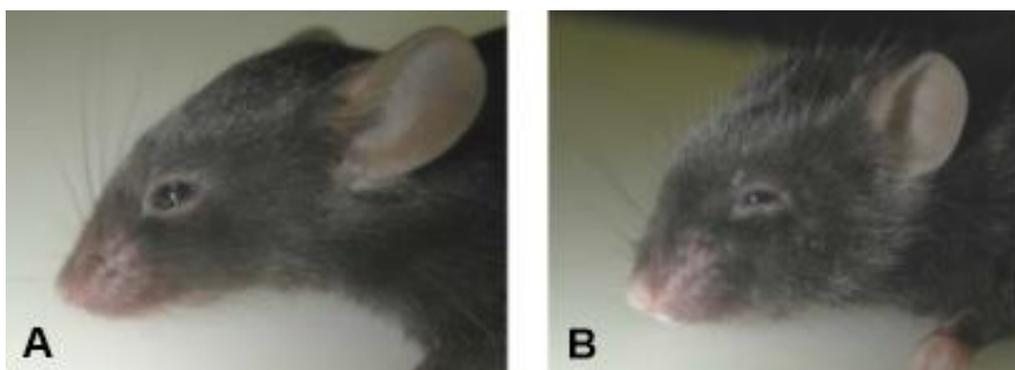


Figura 4: Observação das características faciais de camundongos aos 9 meses de idade. **A:** Camundongo normal. **B:** Camundongo com MPS II, apresentando progressão das características faciais grosseiras como resultado da esclerose e aumento dos ossos do crânio. *Fonte: D'avanzo et al. (2020).*

Outra região cujos GAGs foram quantificados nesse trabalho foi o cérebro. Para tanto, foram feitas separações anatômicas do córtex frontal, córtex total, cerebelo, bulbo olfatório e hipocampo. Entretanto, essas duas últimas regiões não foram usadas nas análises, pois seus pesos eram diminutos tornando-se insuficiente para o protocolo de isolamento de GAGs realizado anteriormente a quantificação por LC-MS/MS. Dentre as outras três regiões usadas nas quantificações, não se observou diferença significativa entre os grupos quanto a quantidade de GAGs no cerebelo. Apesar dessa região ter pequeno papel em atividades cognitivas não motoras, sua principal função é o aprendizado e o controle motor (ROOSTAEI et al. 2014). Em MPS II, há comprometimento de algumas capacidades motoras (D'AVANZO et al., 2020), mas a partir dos dados gerados aqui há indícios de que GAGs não se acumulam no cerebelo, portanto esses sintomas podem ser causados por acúmulos em outras regiões.

Já para córtex frontal e córtex total, aqui foram encontrados níveis elevados do GAG HS, mas não do GAG DS. Dermatan sulfato provavelmente não está relacionado com sintomas neurológicos em MPSs, já que não se acumula no cérebro sendo um GAG mais periférico, como observado em seu acúmulo nos órgãos toracoabdominais e na urina. Além disso, quando há defeitos em enzimas responsáveis somente pela quebra de DS, como a enzima Arilsulfatase B em MPS VI, os pacientes não apresentam comprometimento cognitivo (HARMATZ, 2017), indicando mais uma vez que DS não está associado a esse tipo de problema. Heparan sulfato, por outro lado, é um GAG que se acumula no cérebro, sendo uma constante em todas as MPSs que apresentam comprometimento cognitivo (MPS I, II, III e VII) (MORIMOTO et al., 2021), fato esse que se torna compreensível quando levado em conta o papel importante de HS no desenvolvimento do cérebro (LI; KUSCHE-GULLBERG, 2016). Portanto é seguro assumir que os sintomas neurológicos em MPS II são causados pelo acúmulo de HS no sistema nervoso central.

Outra amostra analisada aqui foi a saliva. Esse fluido tem grandes potenciais para identificação de biomarcadores, em especial para doenças neurodegenerativas (WALTON, 2018). Noventa por cento da saliva é secretada pelas glândulas salivares, essas apresentam alta permeabilidade sendo cercadas por capilares e ácinos, podendo trocar moléculas com essas estruturas, conseqüentemente biomarcadores podem se infiltrar e serem secretados pela saliva (ZHANG et al., 2016).

Apoiando essa teoria de que a saliva contém biomarcadores para doenças neurodegenerativas, estudos indicam que biomarcadores para Alzheimer são expressos ou produzidos pelas próprias glândulas salivares (GLEERUP; HASSELBALCH; SIMONSEN, 2019), tornando a saliva uma alternativa superior a LCR ou sangue, por ser de coleta fácil e relativamente barata. A possibilidade do uso de saliva para acompanhamento ou diagnóstico desse tipo de doenças se dá pela relação de proximidade entre as glândulas salivares e o sistema nervoso (SHI et al., 2011). As principais glândulas salivares estão sob inervação direta dos nervos cranianos VII e IX (FARAH et al., 2018). Portanto a saliva se torna uma boa fornecedora de amostras de DNA, RNA, proteínas da microbiota ou até de

mudanças bioquímicas para diagnósticos. Espera-se que no futuro a saliva substitua testes em sangue e urina para vários diagnósticos (ZHANG et al., 2016).

Aqui, aos 4 meses não houve diferença estatística entre os níveis de GAGs nas salivas dos dois grupos. Por outro lado, aos 6 meses camundongos com MPS II apresentaram GAGs elevados, indicando que o acúmulo dessas moléculas é progressivo. Portanto, para questões de diagnóstico e acompanhamento de tratamentos de pacientes, é possível que o uso da saliva seja indicado apenas para pacientes mais velhos, quando o acúmulo já pode ser significativo. Mas para tanto novas pesquisas precisam ser realizadas para confirmar se esses resultados se repetem.

Por fim, foram realizados testes comportamentais nos camundongos para avaliar sua capacidade cognitiva. O teste de campo aberto não apresentou diferenças significativas entre os grupos aos 6 meses, indicando que mesmo nessa idade não há perda de memória a curto prazo, já que esse tipo de teste é realizado em um intervalo de 1 hora e 30 minutos. Mas por outro lado, o teste de esquiwa passiva indicou uma deficiência cognitiva em camundongos com MPS II, pois seus resultados no teste de esquiwa passiva foram significativamente piores que os dos camundongos normais, isso pode representar uma perda de memória a longo prazo, já que nesse teste realiza-se uma sessão de treinamento em um dia e, 24 horas depois, realiza-se a sessão de teste.

Com esses resultados em mãos, restou buscar correlações entre os diversos dados. Como o HS apresentou elevado acúmulo no cérebro, passamos a considerá-lo como o causador dos sintomas neurológicos nos camundongos com MPS II avaliados aqui. Portanto foi feita uma correlação entre as quantificações de HS nas diferentes regiões do cérebro e os resultados do teste de memória a longo prazo, ou seja, esquiwa passiva. Não existiu correlação entre os níveis de HS no cerebelo de camundongos com MPS II e seus resultados da esquiwa passiva, o que era esperado, já que nessa região não houve acúmulo significativo de GAGs. O córtex pré-frontal, que aqui foi analisado de maneira geral junto ao córtex frontal, apresenta papel importante no direcionamento na recuperação de memórias, ao usar informações contextuais sobre os eventos passados, tendo uma forte conexão

com a memória a longo prazo (PRESTON; EICHENBAUM, 2013), portanto era esperado que houvesse uma correlação entre altos níveis de GAG nessa região com o comprometimento da memória a longo prazo. Entretanto, apesar de apresentar acúmulo significativo de HS, o córtex frontal também não apresentou correlação com os resultados do comportamento.

Por outro lado, houve uma correlação negativa entre o nível de HS no córtex total com o desempenho dos camundongos no teste de esquiva passiva, significando que quanto maior o acúmulo desse GAG nessa região, maior o comprometimento neurológico. O córtex total apresenta papéis fundamentais em uma vasta gama de comportamentos do cérebro, que inclui percepção, movimentos conscientes, emoção, cognição e memória (ESSEN; DONAHUE; GLASSER, 2019), esses dois últimos possivelmente são os responsáveis pela correlação observada aqui. Entretanto, pela vasta extensão dessa região, estudos mais específicos são necessários para comprovar qual área está associada a perda cognitiva em MPS II.

Como mencionado, uma limitação encontrada nesse trabalho foi a impossibilidade de realizar ensaios de GAGs com amostras do hipocampo, pois este apresentava peso insuficiente para a realização do protocolo. Isso seria importante, porque o hipocampo, junto ao córtex pré-frontal, é uma das principais áreas responsáveis pela memória (PRESTON; EICHENBAUM, 2013). Como visto nos resultados, o acúmulo de GAGs no córtex frontal e total pode ser responsável por perda de memória a longo prazo, observado pelos testes de esquiva passiva. Além disso, é possível que exista acúmulo significativo de GAGs no hipocampo, para tanto novas análises são necessárias.

Outras correlações também foram avaliadas entre os níveis de HS na saliva de camundongos com MPS II e seu comportamento, assim como entre HS na saliva e HS no cérebro desses mesmos animais. Essas comparações foram feitas para tentar comprovar que biomarcadores em saliva possuem alta capacidade de refletir o comprometimento neurológico (WALTON, 2018). Entretanto, em nenhuma dessas comparações houve correlação estatística, o que pode significar que os valores de GAG na saliva estavam muito variáveis nas amostras usadas aqui.

Portanto, pesquisas futuras podem provar ou refutar a capacidade dos biomarcadores encontrados em saliva para uso em diagnóstico e acompanhamento em MPS II.

## 5. CONCLUSÕES

GAGs foram analisados em camundongos com MPS I e normais não afetados através de amostras de SIPF. Foram observados níveis elevados de DS, HS-OS e HS-NS no grupo de MPS I, concordando com observações de trabalhos anteriores.

Ainda em camundongos MPS I e controles normais, foram quantificadas, a partir de amostras de SIPF, as atividades enzimáticas das seguintes enzimas lisossômicas: ABG, ASM, GAA, GLA e IDUA. Observou-se que é possível diferenciar animais MPS I de normais através da atividade enzimática de IDUA, fato já bem estabelecido na literatura, sendo sua atividade reduzida nos MPS I. Uma novidade foi a diferenciação dos grupos através da atividade enzimática de GLA (enzima deficiente na doença de Fabry), que se apresentou elevada nos camundongos com MPS I. As atividades de todas as outras enzimas lisossômicas testadas não apresentaram diferença significativa entre os grupos.

Já para MPS II, a quantificação de GAG no sangue não demonstrou diferença significativa entre os camundongos com MPS II dos controles não afetados, apesar de se esperar o contrário. Essa observação pode ser explicada pelo fato de haver muita variabilidade dentro dos grupos, dificultando a avaliação. Já a quantificação de GAG em urina resultou como prevista, sendo possível diferenciar os grupos, com MPS II apresentando níveis significativos de GAG excretados, condizendo com o fato de que GAGs urinários são muito utilizados na prática clínica para diagnóstico dessa doença.

A quantificação de GAG nos órgãos de camundongos com MPS II resultou de forma relativamente prevista pela literatura. Baço, coração, fígado, pulmões e rins apresentaram níveis de GAG elevados no grupo de MPS II, comparando-se aos animais normais. Já para o cérebro, observou-se que não há acúmulo de GAG no cerebelo, pois não houve diferença significativa entre os grupos. Já para córtex frontal e córtex total foram observados níveis dos GAGs HS-OS e HS-NS elevados nos camundongos com MPS II, mas não do GAG DS. Isso é explicado pelo fato de que as células do SNC são mais susceptíveis ao HS do que ao DS, sendo o primeiro o principal GAG acumulado nas MPS que envolvem comprometimento neurológico.

A análise dos níveis de GAG na saliva não apresentou diferença estatística entre camundongos MPS II e normais aos 4 meses, indicando que, por ser um processo gradual, ainda não houve acúmulo significativo nessa idade. Por outro lado, aos 6 meses foi observado diferença significativa entre os grupos, tendo os camundongos MPS II níveis maiores de GAG, indicando que nessa idade já há acúmulo suficiente dessas moléculas. Além disso, essa observação valida a hipótese de GAGs salivares como bons biomarcadores, permitindo possivelmente o estabelecimento dessa análise como uma nova forma de diagnóstico tanto para MPS II como para outros tipos de MPS.

Foi observada uma correlação entre os níveis dos GAG HS-NS e HS-OS no córtex frontal e o comportamento observado no teste de esQUIVA passiva dos camundongos com MPS II. Isso pode ser um indicador de que o comportamento diferenciado observado no grupo de camundongos com MPS II realmente é reflexo do acúmulo de GAG no cérebro, levando ao comprometimento neurológico.

As comparações entre níveis de GAG na saliva e níveis de GAG no cérebro, assim como entre níveis de GAG na saliva e comportamento observado nos camundongos com MPS II não apresentaram correlações significativas. Isso pode ter ocorrido devido ao fato de os níveis de GAG na saliva apresentarem grandes flutuações de valores, portanto não sendo possível uma correlação precisa.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, S. Newborn Screening for Lysosomal Storage Disorders. **Journal of Pediatric Health Care**, v. 32, n. 3, p. 285–294. 2018. doi:10.1016/j.pedhc.2017.04.016.
- ANSON, D. S.; MCINTYRE, C.; BYERS, S. Therapies for Neurological Disease in the Mucopolysaccharidoses. **Current Gene Therapy**, v. 11, n. 2, p. 132-143, 1 abr. 2011. <http://dx.doi.org/10.2174/156652311794940791>.
- ARUNKUMAR, N. et al. Newborn screening of mucopolysaccharidoses: past, present, and future. **Journal of Human Genetics**, v. 65, n. 7, p. 557-567, 10 abr. 2020. <http://dx.doi.org/10.1038/s10038-020-0744-8>.
- AZAMBUJA, A. S. et al. Evidence for Inflammasome Activation in the Brain of Mucopolysaccharidosis Type II Mice. **Metabolic Brain Disease**, 4 jul. 2020. <http://dx.doi.org/10.1007/s11011-020-00592-5>.
- BABAPOUR MOFRAD, R. et al. Cerebrospinal fluid collection: An informative animation video for patients and caregivers. **Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring**, v. 11, n. 1, p. 435–438, 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dadm.2019.04.005>.
- BARTON, N. W.; FURBISH, F. S.; MURRAY, G. J.; GARFIELD, M.; BRADY, R. O. Therapeutic response to intravenous infusions of glucocerebrosidase in a patient with Gaucher disease. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, v. 87, n. 5, p. 1913-1916, 1 mar. 1990. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.87.5.1913>.
- BECK, M.; ARN, P.; GIUGLIANI, R.; MUENZER, J.; OKUYAMA, T.; TAYLOR, J.; FALLET, S. The natural history of MPS I: global perspectives from the MPS I registry. **Genetics in Medicine**, v. 16, n. 10, p. 759-765, 2014. <http://dx.doi.org/10.1038/gim.2014.25>.
- BIOMARKERS DEFINITIONS WORKING GROUP. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 69, n. 3, p. 89-95, mar. 2001. <http://dx.doi.org/10.1067/mcp.2001.113989>.
- BREIER, A; CÉ, J; MEZZALIRA, J; DAITX, V; MORAES, V; GOLDIM, M; COELHO, J. Alpha- I -iduronidase and arylsulfatase B in dried blood spots on filter paper: biochemical parameters and time stability. **Clinical Biochemistry**, v. 50, n. 7-8, p. 431-435, maio 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2016.12.007>.
- CAMARGO NETO, E. Robert Guthrie e a prevenção da PKU. In: CAMARGO NETO, E. **Breve história da fenilcetonúria e do começo da prevenção do retardo mental**. Porto Alegre: Ed. do Autor, 2015. p. 76-96.

CASWELL, S. V. et al. Development of Nanoparticle-Enabled Protein Biomarker Discovery: Implementation for Saliva-Based Traumatic Brain Injury Detection. **Advances in Salivary Diagnostics**, p.121-129, 2015. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-45399-5\\_6](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-45399-5_6).

CHAMOLES, N; BLANCO, M; GAGGIOLI, D; CASENTINI, C. Hurler-like Phenotype: Enzymatic Diagnosis in Dried Blood Spots on Filter Paper. **Clinical Chemistry**, v. 47, n. 12, p. 2098-2102, 1 dez. 2001. <http://dx.doi.org/10.1093/clinchem/47.12.2098>.

CHUANG, C. et al. A modified liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for predominant disaccharide units of urinary glycosaminoglycans in patients with mucopolysaccharidoses. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 9, n. 1, p.1-10, 2 set. 2014. <http://dx.doi.org/10.1186/s13023-014-0135-3>.

CONCOLINO, D.; DEODATO, F.; PARINI, R. Enzyme replacement therapy: efficacy and limitations. **Italian Journal of Pediatrics**, v. 44, n. 2, p. 117-161, nov. 2018. <http://dx.doi.org/10.1186/s13052-018-0562-1>.

COUTINHO, M F; LACERDA, L; ALVES, S. Glycosaminoglycan Storage Disorders: a review. **Biochemistry Research International**, v. 2012, p. 1-16, 2012. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/471325>.

D'AVANZO, F.; RIGON, L.; ZANETTI, A.; TOMANIN, R. Mucopolysaccharidosis Type II: one hundred years of research, diagnosis, and treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 4, p. 1258, 13 fev. 2020. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21041258>.

DONATI, M. A.; PASQUINI, E.; SPADA, M.; POLO, G.; BURLINA, A. Newborn screening in mucopolysaccharidoses. **Italian Journal of Pediatrics**, v. 44, n. 2, p. 126-136, nov. 2018. <http://dx.doi.org/10.1186/s13052-018-0552-3>.

DUVE, C. Exploring cells with a centrifuge. **Science**, v. 189, n. 4198, p. 186-194, 18 jul. 1975. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1138375>.

ESSEN, V; DONAHUE, C; GLASSER, M. Development and Evolution of Cerebral and Cerebellar Cortex. **Brain, Behavior and Evolution**, v. 91, n. 3, p. 158-169, 2018. <http://dx.doi.org/10.1159/000489943>.

EUN, Y. et al. Circulating Tumor DNA in Saliva in an Orthotopic Head and Neck Cancer Mouse Model. **Anticancer Research**, v. 40, n. 1, p. 191–199, 31 dez. 2019. <http://dx.doi.org/10.21873/anticancer.13940>.

FARAH, R; HARATY, H; SALAME, Z; FARES, Y; OJCIUS, D; SADIER, N. Salivary biomarkers for the diagnosis and monitoring of neurological diseases. **Biomedical Journal**, v. 41, n. 2, p. 63-87, abr. 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bj.2018.03.004>.

FEDERHEN, A.; PASQUALIM, G.; FREITAS, T.; GONZALEZ, E.; TRAPP, F.; MATTE, U.; GIUGLIANI, R. Estimated birth prevalence of mucopolysaccharidoses in Brazil. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 182, n. 3, p. 469-483, 11 jan. 2020. <http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.a.61456>.

GAFFKE, L. et al. Changes in cellular processes occurring in mucopolysaccharidoses as underestimated pathomechanisms of these diseases. **Cell Biology International**. 10 jan. 2020. doi:10.1002/cbin.11275.

GARCIA, A; PAN, J; LAMSA, J; MUENZER, J. The characterization of a murine model of mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome). **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 30, n. 6, p. 924-934, 16 set. 2007. <http://dx.doi.org/10.1007/s10545-007-0641-8>.

GHIZONI, J. S. et al. The Utilization of Saliva as an Early Diagnostic Tool for Oral Cancer: microRNA as a Biomarker. **Clinical and Translational Oncology**, v. 22, n. 6, p. 804–812, 27 set. 2019. <http://dx.doi.org/10.1007/s12094-019-02210-y>.

GIUGLIANI, R. et al. Mucopolysaccharidosis I, II, and VI: Brief review and guidelines for treatment. **Genetics and Molecular Biology**, v. 5, n. 33, p.589-604, jan. 2010.

GLEERUP, H. S.; HASSELBALCH, S. G.; SIMONSEN, A. H. Biomarkers for Alzheimer's Disease in Saliva: a systematic review. **Disease Markers**, v. 2019, p. 1-11, 2 maio 2019. <http://dx.doi.org/10.1155/2019/4761054>.

HARMATZ, P. Mucopolysaccharidosis VI pathophysiology diagnosis and treatment. **Frontiers in Bioscience**, v. 22, n. 3, p. 385-406, 2017. <http://dx.doi.org/10.2741/4490>.

HARMATZ, P. O início de uma nova era no tratamento da mucopolissacaridose tipo VI: uma busca por melhores marcadores de evolução da doença e resposta ao tratamento. **Jornal de Pediatria**, v. 84, n. 2, p. 103-106, abr. 2008. <http://dx.doi.org/10.1590/s0021-75572008000200003>.

HENDRIKSZ, C. J.; MUENZER, J.; VANDERVER, A.; DAVIS, J. M.; BURTON, B. K.; MENDELSON, N. J.; WANG, N.; PAN, L.; PANO, A.; BARBIER, A. J. Levels of glycosaminoglycans in the cerebrospinal fluid of healthy young adults, surrogate-normal children, and Hunter syndrome patients with and without cognitive impairment. **Molecular Genetics and Metabolism Reports**, vol. 5, p. 103–106, dez. 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgmr.2015.11.001>.

HOFFMAN, E.; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry: Principles and Applications**. 3. ed. Brussels: John Wiley and Sons, 2007. 502 p.

HUNTER, C. A. A rare disease in two brothers. **Proceedings of the Royal Society of Medicine**, v. 10, p.104-116, 1917.

HURLER, G. Über einen Typ multipler Abartungen, vorwiegend am Skelettsystem. **European Journal of Pediatrics**, Berlin, n. 34, p. 220-234, 1919.

KAY, M. A.; GLORIOSO, J. C; NALDINI, L. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. **Nature Medicine**, v. 7, n. 1, p. 33-40, jan. 2001. <http://dx.doi.org/10.1038/83324>.

KISELOVA, N.; DIERKER, T.; SPILLMANN, D.; RAMSTRÖM, M. An automated mass spectrometry-based screening method for analysis of sulfated glycosaminoglycans. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 450, n. 1, p. 598-603, jul. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.06.011>.

KOBAYASHI, N. Acid mucopolysaccharide granules in the glomerular epithelium in gargoylism. **Am J Pathol**, v. 3, n. 35, p. 591-605, maio 1959.

KOBOLÁK, J. et al. Modelling the neuropathology of lysosomal storage disorders through disease-specific human induced pluripotent stem cells. **Experimental Cell Research**, v. 380, n. 2, p. 216-233, jul. 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.04.021>.

KOWALEWSKI, B. et al. Arylsulfatase G inactivation causes loss of heparan sulfate 3-O-sulfatase activity and mucopolysaccharidosis in mice. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, v. 109, n. 26, p. 10310-10315, 11 jun. 2012. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1202071109>.

KUBASKI, F. **Diagnosis and Therapies for Mucopolysaccharidoses**. 2017. 320 f. Tese (Doutorado) - Curso de Philosophy in Biological Sciences, University of Delaware, Dalaware, 2017 – a.

KUBASKI, F. et al. Diagnosis of Mucopolysaccharidoses. **Diagnostics**, v. 10, n. 3, p. 172, 22 mar. 2020. <http://dx.doi.org/10.3390/diagnostics10030172>.

KUBASKI, F.; OSAGO, H.; MASON, R. W.; YAMAGUCHI, S.; KOBAYASHI, H.; TSUCHIYA, M.; ORII, T.; TOMATSU, S. Glycosaminoglycans detection methods: applications of mass spectrometry. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 120, n. 1-2, p. 67-77, jan. 2017-b. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2016.09.005>.

KUMAR, S. R.; MARKUSIC, D. M.; BISWAS, M.; A HIGH, K.; HERZOG, R. W. Clinical development of gene therapy: results and lessons from recent successes. **Molecular Therapy - Methods & Clinical Development**, v. 3, p. 16034-16039, 2016. <http://dx.doi.org/10.1038/mtm.2016.34>.

LAGRANHA, V et al. Subcutaneous implantation of microencapsulated cells overexpressing  $\alpha$ -L-iduronidase for mucopolysaccharidosis type I treatment. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 28, n. 3, p. 28-43, 1 fev. 2017. <http://dx.doi.org/10.1007/s10856-017-5844-4>.

LAWRENCE, R et al. Disease-specific non-reducing end carbohydrate biomarkers for mucopolysaccharidoses. **Nature Chemical Biology**, v. 8, n. 2, p. 197-204, 8 jan. 2012. <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.766>.

LEVIN, B; JACOBY, N M. Mucopolysaccharidosis. **Proc R Soc Med**, v. 4, n. 65, p. 339341, abr. 1972.

LI, J.P.; KUSCHE-GULLBERG, M. Heparan Sulfate: biosynthesis, structure, and function. **International Review of Cell and Molecular Biology**, p. 215-273, jan. 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.ircmb.2016.02.009>.

LIN, Hsiang-Yu et al. Natural progression of cardiac features and long-term effects of enzyme replacement therapy in Taiwanese patients with mucopolysaccharidosis II. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 16, n. 1, p. 1-14, 23 fev. 2021. <http://dx.doi.org/10.1186/s13023-021-01743-2>.

LIU, Z.; ZHANG, F.; LI, L.; LI, G.; HE, W.; LINHARDT, R. J. Compositional analysis and structural elucidation of glycosaminoglycans in chicken eggs. **Glycoconjugate Journal**, v. 31, n. 8, p. 593-602, 14 set. 2014. <http://dx.doi.org/10.1007/s10719-014-9557-3>.

LOTAN, I. et al. Saliva Immunoglobulin Free Light Chain Analysis for Monitoring Disease Activity and Response to Treatment in Multiple Sclerosis. **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, v. 44, p. 102339, set. 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msard.2020.102339>.

MASHIMA, R.; OKUYAMA, T.; OHIRA, M. Biomarkers for Lysosomal Storage Disorders with an Emphasis on Mass Spectrometry. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 8, p. 2704, 14 abr. 2020. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21082704>.

MORIMOTO, H. et al. Clearance of heparan sulfate in the brain prevents neurodegeneration and neurocognitive impairment in MPS II mice. **Molecular Therapy**, v. 29, n. 5, p. 1-9, jan. 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.01.027>.

MUENZER, J.; WRAITH, J. E.; CLARKE, L. A. Mucopolysaccharidosis I: management and treatment guidelines. **Pediatrics**, v. 123, n. 1, p. 19-29, 1 jan. 2009. <http://dx.doi.org/10.1542/peds.2008-0416>.

MURPHY, S. et al. Proteomic identification of elevated saliva kallikrein levels in the mdx-4cv mouse model of Duchenne muscular dystrophy. **Biochemistry and**

**Biophysics Reports**, v. 18, p.1236-1245, jul. 2019.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrep.2018.05.006>.

NAGREE, M. S. et al. An update on gene therapy for lysosomal storage disorders. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 19, n. 7, p. 655-670, 6 maio 2019.  
<http://dx.doi.org/10.1080/14712598.2019.1607837>.

NEUFELD E.F.; MUENZER J. The Mucopolysaccharidoses. In **The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Diseases**: C. Scriver; A. Beaudet; W. Sly; D. Vaele. New York: Mc Graw-Hill. pp. 3421-3452. 2001.

NIELCHIOR, J; CLAUSEN, J; DYGGVE, H. The Mucopolysaccharidoses. **Clinical Pediatrics**, v. 4, n. 8, p. 468-480, ago. 1965.  
<http://dx.doi.org/10.1177/000992286500400808>.

NISHIYAMA, K; IMAI, T; OHKUBO, K; SANEFUJI, M; TAKADA, H. Resolution of Hydronephrosis in a Patient with Mucopolysaccharidosis Type II with Enzyme Replacement Therapy. **Urology**, v. 101, p. 163-165, mar. 2017.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.urology.2016.12.010>.

NOH, H.; LEE, J. I. Current and potential therapeutic strategies for mucopolysaccharidoses. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 39, n. 3, p. 215-224, 25 fev. 2014. <http://dx.doi.org/10.1111/jcpt.12136>.

OLCZAK, M. et al. Concentration of Microtubule Associated Protein Tau (MAPT) in Urine and Saliva as a Potential Biomarker of Traumatic Brain Injury in Relationship with Blood–brain Barrier Disruption in Postmortem Examination. **Forensic Science International**, v. 301, p. 28–36, ago. 2019.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.05.010>.

PEÑA-BAUTISTA, C. et al. Validated Analytical Method to Determine New Salivary Lipid Peroxidation Compounds as Potential Neurodegenerative Biomarkers. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 164, p. 742–749, fev. 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2018.11.043>.

PENATI, R.; FUMAGALLI, F.; CALBI, V.; BERNARDO, M. E.; AIUTI, A. Gene therapy for lysosomal storage disorders: recent advances for metachromatic leukodystrophy and mucopolysaccharidosis I. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 40, n. 4, p. 543-554, 30 maio 2017. <http://dx.doi.org/10.1007/s10545-017-0052-4>.

PRESTON, A. R.; EICHENBAUM, H. Interplay of Hippocampus and Prefrontal Cortex in Memory. **Current Biology**, v. 23, n. 17, p. 764-773, set. 2013.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2013.05.041>.

RASINHAS, A. et al. First detection of dengue virus in the saliva of immunocompetent murine model. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 4, 5 fev. 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760170208>.

REALE, M.; GONZALES-PORTILLO, I.; BORLONGAN, C. V. Saliva, an Easily Accessible Fluid as Diagnostic Tool and Potent Stem Cell Source for Alzheimer's Disease: Present and Future Applications. **Brain Research**, v. 1727, p. 146535, jan. 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2019.146535>.

ROBLEGG, E.; COUGHRAN, A.; SIRJANI, D. Saliva: An All-Rounder of Our Body. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 142, p. 133–141, set. 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.06.016>.

ROOSTAEI, T; NAZERI, A; SAHRAIAN, M; MINAGAR, A. The Human Cerebellum. **Neurologic Clinics**, v. 32, n. 4, p. 859-869, nov. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ncl.2014.07.013>.

SARDIELLO, M.; PALMIERI, M.; DI RONZA, A.; MEDINA, D. L.; VALENZA, M.; GENNARINO, V. A.; DI MALTA, C.; DONAUDY, F.; EMBRIONE, V.; POLISHCHUK, R. S.; BANFI, S.; PARENTI, G.; CATTANEO, E.; BALLABIO, A. A Gene Network Regulating Lysosomal Biogenesis and Function. **Science**, vol. 325, no. 5939, p. 473–477, 25 Jun. 2009. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1174447>

SCHEIE, H. G.; HAMBRICK JR, G. W. AND BARNES L. A. A newly recognized forme frustre of Hurler's disease (gargoylism). **American Journal of Ophthalmology**. v. 53, p.753-769, 1962.

SCHULTZ, M. L.; TECEDOR, L.; CHANG, M.; DAVIDSON, B. L. Clarifying lysosomal storage diseases. **Trends in Neurosciences**, v. 34, n. 8, p. 401-410, ago. 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2011.05.006>.

SEPURU, K. M.; RAJARATHNAM, K. Structural basis of chemokine interactions with heparan sulfate, chondroitin sulfate, and dermatan sulfate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 43, p. 15650-15661, out. 2019. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.ra119.009879>.

SFERRA, T J; BACKSTROM, K; WANG, C; RENNARD, R; MILLER, M; HU, Y. Widespread Correction of Lysosomal Storage Following Intrahepatic Injection of a Recombinant Adeno-associated Virus in the Adult MPS VII Mouse. **Molecular Therapy**, v. 10, n. 3, p. 478-491, set. 2004. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.05.029>.

SHI, M. et al. Salivary Tau Species are Potential Biomarkers of Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 27, n. 2, p. 299–305, 18 nov. 2011. <http://doi.org/10.3233/JAD-2011-110731>.

SILVA, J. et al. Glycosaminoglycan disaccharide compositional analysis of cell-derived extracellular matrices using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Methods in Cell Biology**, p. 85-106, 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.mcb.2019.11.017>.

SILVA-PINTO, A. et al. The Neonatal Screening Program in Brazil, Focus on Sickle Cell Disease (SCD). **International Journal of Neonatal Screening**, v. 5, n. 1, p. 11-23, 26 jan. 2019. <http://dx.doi.org/10.3390/ijns5010011>.

STAPLETON, M. et al. Clinical presentation and diagnosis of mucopolysaccharidoses. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 125, n. 1-2, p.4-17, set. 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2018.01.003>.

SU, Xu et al. Dried blood spots: an evaluation of utility in the field. **Journal of Infection And Public Health**, v. 11, n. 3, p. 373-376, maio 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiph.2017.09.014>.

TAYLOR, J L. et al. The North Carolina Experience with Mucopolysaccharidosis Type I Newborn Screening. **The Journal of Pediatrics**, v. 211, p. 193-200, ago. 2019 – a. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpeds.2019.04.027>.

TAYLOR, M.; KHAN, S.; STAPLETON, M.; WANG, J.; CHEN, J.; WYNN, R.; YABE, H.; CHINEN, Y.; BOELENS, J. J.; MASON, R. W. Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Mucopolysaccharidoses: past, present, and future. **Biology of Blood And Marrow Transplantation**, v. 25, n. 7, p. 226-246, jul. 2019 – b. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2019.02.012>.

TOLEDANO-ZARAGOZA, A.; LEDESMA, M. D. Addressing neurodegeneration in lysosomal storage disorders: advances in niemann pick diseases. **Neuropharmacology**, v. 171, p. 107851, jul. 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107851>.

TOMATSU, S.; GIUGLIANI, R.; KUBASKI, F.; KAZUKI, S.; ALMÉCIGA-DÍAZ, C. J.; BARRERA, L.; MONTANO, A.; YASUDA, E.; CHINEN, Y.; MASON, R. Impact of enzyme replacement therapy and hematopoietic stem cell transplantation in patients with Morquio A syndrome. **Drug Design, Development and Therapy**, p. 1937-1953, abr. 2015. <http://dx.doi.org/10.2147/dddt.s68562>.

TYLKI-SZYMAŃSKA, A.; SZYMAŃSKA-ROŚEK, P.; HASIŃSKI, P.; ŁUGOWSKA, A. Plasma chitotriosidase activity versus plasma glucosylsphingosine in wide spectrum of Gaucher disease phenotypes – A statistical insight. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 123, n. 4, p. 495-500, abr. 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2018.02.004>.

VEEN, S. et al. Developments in the treatment of Fabry disease. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 43, n. 5, p. 908-921, 2 mar. 2020. <http://dx.doi.org/10.1002/jimd.12228>.

WALTON, E. L. Saliva biomarkers in neurological disorders: A “spitting image” of brain health?. **Biomedical Journal**, v. 41, n. 2, p.59-62, abr. 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bj.2018.04.005>.

WILSON J. M. G., JUNGNER G. **Principles and practice of screening for disease**. Geneva: World Health Organization; 1968.

WORLDSymposium Official List of Lysosomal Diseases. 2020. [acessado em 28 de junho de 2020]. <<https://www.worldsymposia.org/official-list-of-lysosomal-diseases>>.

YAP, T. et al. Intraoral Human Herpes Viruses Detectable by PCR in Majority of Patients. **Oral Diseases**, jul. 2020. <http://dx.doi.org/10.1111/odi.13523>.

YU, Seok-Ho et al. A Biochemical Platform to Define the Relative Specific Activity of IDUA Variants Identified by Newborn Screening. **International Journal of Neonatal Screening**, v. 6, n. 4, p. 88, 12 nov. 2020. <http://dx.doi.org/10.3390/ijns6040088>.

ZHANG, C-Z; CHENG, X-Q; LI, J-Y; ZHANG, P; YI, P; XU, X; ZHOU, X-D. Saliva in the diagnosis of diseases. **International Journal of Oral Science**, v. 8, n. 3, p. 133-137, set. 2016. <http://dx.doi.org/10.1038/ijos.2016.38>.

ZHANG, H. et al. Analysis of Glycosaminoglycans in Cerebrospinal Fluid from Patients with Mucopolysaccharidoses by Isotope-Dilution Ultra-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Clinical Chemistry**, v. 57, n. 7, p.1005-1012, 2011. American Association for Clinical Chemistry (AACC). <http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2010.161141>.

**GRUPO DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Certificamos que o projeto abaixo, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) e pelas áreas de apoio indicadas pelo pesquisador.

Projeto: 140306 Data de Aprovação do Projeto: 10/07/2014  
 Título: HISTÓRIA NATURAL DE MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO I: ESTUDO LONGITUDINAL COM O MODELO MURINO Data de Término: 30/07/2018  
 Pesquisador Responsável: URSULA DA SILVEIRA MATTE

**Equipe de pesquisa:**

ANA PAULA KRAUTHEIN SCHNEIDER	ANA PAULA KRAUTHEIN SCHNEIDER	CAMILA POCHARSKI BARBOSA	CAMILA POCHARSKI BARBOSA
DEISE MICHELE ERHART	DEISE MICHELE ERHART	EDINA POLETTI	EDINA POLETTI
ESTEBAN ALBERTO GONZALEZ	ESTEBAN ALBERTO GONZALEZ	FELIPE MATEUS PELLENZ	FELIPE MATEUS PELLENZ
GABRIELA PASQUALIM	GABRIELA PASQUALIM	GUILHERME BALDO	GUILHERME BALDO
GUILHERME DO NASCIMENTO GOETTEI	GUILHERME DO NASCIMENTO GOETTEI	JULIANA BIDONE	JULIANA BIDONE
LUCAS CAFFERATI BELTRAME	LUCAS CAFFERATI BELTRAME	MICHELLE FRAGA	MICHELLE FRAGA
PÂMELLA BORGES	PÂMELLA BORGES	ROSELENA SILVESTRI SCHUH	ROSELENA SILVESTRI SCHUH
SOLON ANDRADES DA ROSA	SOLON ANDRADES DA ROSA	TALITA GIACOMET DE CARVALHO	TALITA GIACOMET DE CARVALHO
VALESKA LIZZI LAGRANHA	VALESKA LIZZI LAGRANHA	VIVIANE NOLL LOUZADA FLORES	VIVIANE NOLL LOUZADA FLORES

Submissão	Documento	Espécie/Linhagem	Sexo/Idade	Qtd.	Data Reunião	Situação
22/05/2014	APROVAÇÃO	CAMUNDONGO - MPS ldua	- /	60	03/06/2014	APROVADO
22/05/2014	APROVAÇÃO	CAMUNDONGO - C57BL/6 GFP	- /	60	03/06/2014	APROVADO
14/08/2017	EMENDA		/	0	22/08/2017	APROVADO
				<b>Total de Animais:</b>	120	

*Ursula da Silveira Matte*  
 Coordenador  
 Comissão de Ética no Uso de Animais

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEUA/HCPA.

## 7.2 Parecer do Comitê de Ética Institucional do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) para o projeto de número 190611.



### HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE Grupo de Pesquisa e Pós Graduação

#### Carta de Aprovação

Certificamos que o projeto abaixo, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) e pelas áreas de apoio indicadas pelo pesquisador.

**Projeto:** 2019/0611

**Título:** Quantificação de Glicosaminoglicanos em saliva de camundongos com Mucopolissacaridose

**Pesquisador Responsável:** GUILHERME BALDO

**Equipe de Pesquisa:**

LUIZA DA SILVA RODRIGUES                      ISABELLY MARIA BARROS DE                      LUISA NATALIA PIMENTEL VERA

FRANCYNE KUBASKI

**Data de Aprovação:** 16/10/2019

**Data de Término:** 30/04/2021

Espécie/Linhagem	Sexo/Idade	Quantidade	Data Reunião	Documento
CAMUNDONGO KNOCKOUT	F/2 Mês(es)	7		
CAMUNDONGO KNOCKOUT	M/2 Mês(es)	7		
CAMUNDONGO KNOCKOUT	M/2 Mês(es)	14		

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEUA/HCPA.



Assinado digitalmente por:  
**PATRICIA ASHTON PROLLA**  
Grupo de Pesquisa e Pós-graduação  
07/11/2019 11:48:59  
<https://sistemas.hcpa.org.br/pesquisa/qualificacao/comissaoetica/comiteetica/emprego/alterar?token=9502242>