

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**  
**Instituto de Biociências**  
**Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular**

**A doença cardiovascular em camundongos com  
Mucopolissacaridose tipo I: o efeito do losartan e do  
propranolol**

**Esteban Alberto Gonzalez**

**Orientadora:** Profa. Dra. Ursula da Silveira Matte

**Coorientador:** Prof. Dr. Guilherme Baldo

Porto Alegre, dezembro de 2020

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**  
**Instituto de Biociências**  
**Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular**

**A doença cardiovascular em camundongos com  
Mucopolissacaridose tipo I: o efeito do losartan e do  
propranolol**

**Esteban Alberto Gonzalez**

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

**Orientadora:** Profa. Dra. Ursula da Silveira Matte

**Coorientador:** Prof. Dr. Guilherme Baldo

Porto Alegre, dezembro de 2020

*Este trabalho foi desenvolvido no Centro de Terapia Gênica do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). O estudo foi financiado pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do HCPA (FIPE), CAPES e CNPq.*

*Todos os experimentos apresentados nesta tese estão incluídos nos projetos de pesquisa aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sob o registro nº 15-0322 e 17-0590.*

*Dedico esta tese a toda minha família por ter me apoiado e me permitido perseguir e cumprir meus sonhos.*



## AGRADECIMENTOS

Meus mais sinceros agradecimentos a todos os Professores, colegas e amigos que tive o prazer de conhecer desde que ingressei na pós-graduação, e que contribuíram de forma direta ou indireta ao desenvolvimento desta tese e ao meu crescimento. Obrigado a todos pelos bons momentos compartilhados!

A Profa. Ursula Matte pela orientação, paciência, confiança, as oportunidades e toda a sua ajuda. Obrigado por estar sempre disponível, pelos ensinamentos e por contribuir no meu crescimento.

Ao Prof. Guilherme Baldo pela orientação e por estar sempre disponível para me ajudar incluso desde antes de conhecer-nos. Obrigado por me guiar, ensinar, pela paciência, confiança, inspiração e motivação, assim como também por todas as oportunidades oferecidas. Agradeço por se preocupar por mim, sua simpatia, carinho, amizade e bom humor, os quais foram essências durante toda a etapa. Estarei sempre grato.

Ao Prof. Roberto Giugliani pela disponibilidade, ajuda, inspiração e ensinamentos. Agradeço-lhe por ter sido uma excelente pessoa comigo, pelas oportunidades oferecidas e por todos os momentos e conversas compartilhadas.

Aos colegas e amigos/as do laboratório CTG pelos bons momentos, ensinamentos, o companheirismo, a ajuda e principalmente pela amizade. Agradeço a todos os que tive o prazer de conhecer durante esses 7 anos e com quem comparti o dia-a-dia, as atividades e os diferentes eventos. Vocês foram e são uma parte importante na minha jornada e grandes amigos.

A Angela Tavares por sua disponibilidade, paciência, ensinamentos, amizade e ajuda.

Aos colegas e amigos de Laboratório de Cardiologia pelo companheirismo, amizade e ajuda. Em especial ao Santiago Tobar pela atenção, ensinamentos, disponibilidade, parceria e a amizade. Assim como meus orientadores, sua presença foi essencial para meu crescimento intelectual, profissional e pessoal.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre, especialmente aos colegas e amigos do Centro de Pesquisa Experimental e laboratórios associados por toda a sua ajuda. Em especial a

Marta Cioatto, Fernanda Visioli, Eduardo Chiela, Michael Andrades, Patrícia Lopez, Everaldo Batista, Ana Helena Paz, Emily Pilar e Flavia Rejane Giusti.

Ao governo do Brasil, ao apoio financeiro do CNPq, ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM) e à Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) que possibilitaram a realização da pós-graduação e a conclusão deste trabalho. Agradeço aos professores por proporcionar um ensino de excelência e por ter contribuído na minha formação. Agradeço ao Elmo Cardoso pela atenção, disponibilidade e ajuda oferecida.

Ao Marco Polo pelos anos de convivência, sua amizade e companheirismo.

Ao Matias Malleret pela amizade e pelo apoio e o acompanhamento em todas as etapas da minha formação acadêmica.

Ao Sr. Cavaleiro, *in memoriam*, pela amizade.

A todos os amigos que tive o prazer de conhecer desde que cheguei no Brasil. Em especial ao Nataniel Ludwig, Douglas Soares e José Ignacio Gonzalez Solari por todos os momentos compartilhados, pela parceria e amizade.

A minha noiva Dévora Randon pelo companheirismo, amor e paciência. Obrigado por ficar ao meu lado, sempre presente estar e me apoiar em todo momento.

Aos meus pais, Carlos e Gladys, minha avó, Jovita, e aos meus irmãos, Fabian e Natalio, por estarem sempre presentes, pela inspiração, motivação e por me apoiar em todas as decisões da minha vida. Sem seu apoio nunca tivesse conseguido me graduar e continuar com as diferentes etapas da minha formação. Neste último período, após 9 meses de isolamento e sob diversos estímulos estressantes, sua presença, assim como o da devora, foram essenciais para manter a minha cordura e motivação.

# SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
1. O remodelamento cardíaco .....	13
1.1 O remodelamento cardíaco patológico .....	13
2. O remodelamento vascular .....	16
2.1 Alterações vasculares: a dilatação da aorta .....	18
3. Alterações da matriz extracelular no remodelamento cardiovascular .....	18
4. Mecanismos moleculares envolvidos no remodelamento cardíaco patológico .....	21
4.1. Receptores associados à proteína G .....	21
4.1.1. Os receptores adrenérgicos .....	23
4.1.2. O sistema renina angiotensina e o TGF- $\beta$ .....	24
4.1.3. A sinalização PI3K/AKT .....	26
4.1.4. A sinalização das MAPKs (ERK/JNK/p38 MAPK) .....	27
5. O lisossomo e as doenças lisossômicas .....	29
5.1. As Mucopolissacaridoses .....	30
5.2. A Mucopolissacaridose tipo I .....	31
5.2.1. A doença cardiovascular na Mucopolissacaridose tipo I .....	32
5.2.2. Patogênese das doenças cardiovasculares na MPS I .....	36
5.2.3. Estratégias farmacológicas para o manejo das alterações cardiovasculares....	37
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>40</b>
OBJETIVO GERAL.....	41
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	41
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>42</b>
Losartan improves aortic dilatation and cardiovascular disease in Mucopolysaccharidosis I. 44	
Cardiac pathology in Mucopolysaccharidosis I mice: Losartan modifies ERK1/2 activation during cardiac remodeling.....	52
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>84</b>
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>94</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>96</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>107</b>

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1:</b> A hipertrofia cardíaca .....	15
<b>Figura 2:</b> Resultados potenciais do remodelamento vascular .....	17
<b>Figura 3:</b> Representação esquemática dos diferentes tipos de proteases envolvidas no remodelamento cardiovascular .....	20
<b>Figura 4:</b> Diagrama simplificado de algumas vias de sinalização ativadas pelos receptores GPCR. ....	22
<b>Figura 5:</b> A sinalização de TGF- $\beta$ 1.....	25
<b>Figura 6:</b> ERK1/2 pode contribuir à resposta hipertrófica através de dois mecanismos distintos .....	28
<b>Figura 7:</b> Alterações patológicas observadas em camundongos MPS I aos 6 meses de idade .....	34
<b>Figura 8:</b> Alterações na estrutura da elastina em camundongos MPS I .....	92
<b>Tabela 1.</b> Diferentes tipos de Mucopolissacaridoses.....	31
<b>Tabela 2:</b> Alterações patológicas observadas nos pacientes e camundongos com MPS I .....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS

AH - Ácido hialurônico	MAPKs - Proteínas quinases ativadas por mitógenos
AKT - Proteína quinase B	MEC - Matriz extracelular
Ang II - Angiotensina II	MFS - Síndrome de Marfan
AT1- Receptor de Ang II tipo I	MMP - Metaloproteinases de matriz
AT2 - Receptor de Ang II tipo II	MPS - Mucopolissacarídeos
BRAs - Bloqueadores do receptor AT1	NE - Norepinefrina
CS - Condroitin sulfato	PI3K - Fosfatidilinositol 3-quinase
CTS - Catepsina	PKC - Proteína quinase C
DL - Doenças lisossômicas	RAAS - Sistema renina-angiotensina-aldosterona
DS - Dermatan sulfato	RAS - Sistema renina-angiotensina
Epi - epinefrina	SNA - Sistema nervoso adrenérgico
GAGs - Glicosaminoglicanos	SNC - Sistema nervoso central
GPCR - Receptores associados à proteína G	TGF- $\beta$ - Fator de crescimento transformante beta
HS - Heparan sulfato	TIMPs - Inibidores teciduais das metaloproteinases
ICC - Insuficiência cardíaca congestiva	VE - Ventrículo esquerdo
IDUA - $\alpha$ -L-iduronidase	$\beta$ -ARs - Receptores beta adrenérgicos
JNKs - Quinase amino terminal c-jun	
KS - Queratan sulfato	

## RESUMO

A Mucopolissacaridose tipo I (MPS I) é uma doença autossômica recessiva causada por mutações no gene *IDUA* que codifica para a enzima lisossômica  $\alpha$ -L-iduronidase, a qual está envolvida na degradação dos glicosaminoglicanos (GAGs) heparan e dermatan sulfato. Esta deficiência enzimática resulta no acúmulo progressivo e multisistêmico de GAGs afetando a estrutura e funcionamento de diversos tecidos e órgãos. As anormalidades cardiovasculares são comuns em pacientes com MPS I e uma das principais causas de morte. No entanto, o mecanismo que leva à disfunção cardíaca e vascular nas MPS é complexo e não é completamente compreendido. Os receptores associados a proteína G (GPCR) e seus componentes intracelulares têm um papel relevante tanto em processos fisiológicos quanto patológicos e poderiam contribuir no desenvolvimento das patologias cardiovasculares na MPS I. Neste trabalho investigamos o papel dos receptores da angiotensina I (AT1) e dos beta receptores ( $\beta$ -AR), através da inibição com losartan ou propranolol, na doença cardíaca e vascular em camundongos MPS I. Na aorta, o tratamento com losartan melhorou a dilatação vascular possivelmente através da normalização das alterações estruturais observadas na fibra de elastina. Ambos tratamentos melhoraram as anormalidades cardíacas através da prevenção da dilatação do ventrículo esquerdo e da melhora da função contrátil, sem alterar a espessura das valvas cardíacas. Os camundongos MPS I apresentaram redução da ativação de AKT e ERK1/2, um aumento da atividade das catepsinas, mas não foram observadas alterações na atividade de metaloproteinases. O tratamento com losartan restaurou os níveis de ativação da ERK1/2 e reduziu a atividade das catepsinas totais no coração. No entanto nenhuma alteração nessas proteínas foi observada após o tratamento com propranolol. Mesmo considerando o efeito benéfico do propranolol sobre o coração, nossos resultados mostram um papel ainda mais relevante do receptor AT1 na patologia cardiovascular, o que foi evidenciado pela melhora tanto no coração quanto na aorta de camundongos MPS I após o tratamento com losartan. Assim, nossos achados sugerem que losartan pode ser considerado um candidato ao tratamento adjuvante da MPS I.

## ABSTRACT

Mucopolysaccharidosis type I (MPS I) is an autosomal recessive disorder caused by mutations in the IDUA gene, that codifies the alpha-L-iduronidase enzyme, involved in the degradation of glycosaminoglycans (GAGs) heparan and dermatan sulfate. This deficiency results in the progressive and multisystemic accumulation of GAGs, affecting the structure and function of several tissues and organs. Cardiovascular abnormalities are common in patients with MPS I and a major cause of death. However, the mechanism that leads to cardiac and vascular dysfunction is complex and not entirely understood. G protein-coupled receptors (GPCR) and their intracellular components play an important role in both physiological and pathological processes and may contribute to the development of cardiovascular pathologies in MPS I. Thus, we aimed to investigate the role of angiotensin I receptors (AT1) and beta receptors ( $\beta$ -AR) in cardiac and vascular disease in MPS I mice, through specific inhibition with losartan or propranolol, respectively. In the aorta, treatment with losartan improved vascular dilation, possibly by normalizing the structural changes observed in the elastin fiber. Both treatments improved the cardiac abnormalities by preventing left ventricular dilation and improving contractile function, without altering valve thickness. MPS I mice presented reduced activation of AKT and ERK1/2, increased activity of cathepsins, but no changes in metalloproteinase activity were observed. Losartan treatment restored ERK1/2 activation levels and reduced the total cathepsin activity in the heart, while no alterations in these proteins were observed after propranolol treatment. Even considering the beneficial effect of propranolol in the heart, our results show an even more relevant role of the AT1 receptor in cardiovascular pathology, which was evidenced by the improvement in the heart and aorta of MPS I mice after treatment with losartan. In summary, our results suggest that losartan could be used to ameliorate both cardiac and vascular disease in MPS I and could be considered as adjuvant treatment candidate for therapy optimization.

## **INTRODUÇÃO**

---



## **1. O remodelamento cardíaco**

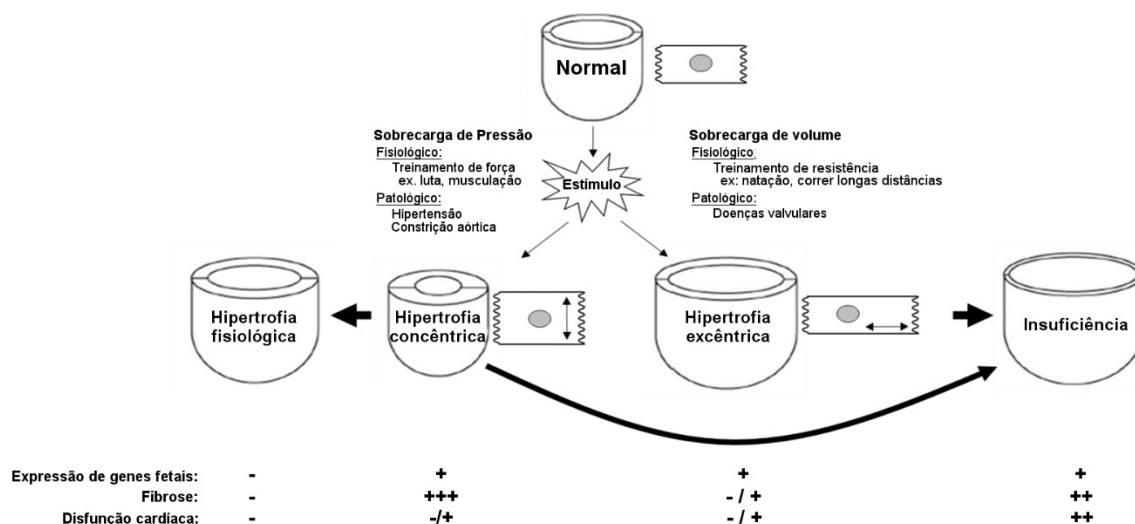
As doenças cardiovasculares são muito prevalentes e uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo (Gupta et al. 2007; Lyle and Taylor 2019). Muitas destas doenças, bem como alguns processos não patológicos, são caracterizadas por adaptações no tecido cardíaco conhecidas como remodelamento. Este processo, comumente conhecido como hipertrofia cardíaca, é definido como as modificações celulares, moleculares e intersticiais que resultam em alterações no tamanho, forma e função do coração em resposta ao estresse mecânico e outros estímulos (Gupta et al. 2007; Bernardo et al. 2010; Kehat and Molkentin 2010). O aumento da massa cardíaca é determinado pelo alargamento individual no tamanho e na massa dos cardiomiócitos, sem incremento no número de células (Gupta et al. 2007). De acordo com o tipo de estímulo que causa o crescimento cardíaco, o coração e os miócitos sofrem diferentes tipos de alterações (Bernardo et al. 2010; Kehat and Molkentin 2010). Desta forma, a hipertrofia cardíaca pode ser classificada em fisiológica ou patológica. O crescimento cardíaco fisiológico é uma resposta adaptativa às mudanças, e é caracterizado por uma função e arquitetura cardíaca normais. Isto ocorre, por exemplo, quando indivíduos saudáveis se exercitam ou durante a gravidez (Shiojima and Walsh 2006). Por outro lado, o crescimento cardíaco patológico ocorre em resposta à constante sobrecarga de pressão ou volume, associados com outros estímulos de natureza hormonal ou citocinas, o que resulta em alterações mal adaptativas (Gupta et al. 2007; Bernardo et al. 2010; Kehat and Molkentin 2010).

### **1.1 O remodelamento cardíaco patológico**

A hipertrofia patológica é frequentemente associada a processos de morte dos miócitos, fibrose intersticial e reexpressão de genes fetais (ex. peptídeo natriurético atrial e a cadeia pesada da b-miosina), o que promove a disfunção sistólica e diastólica e geralmente predispõe ao desenvolvimento de insuficiência cardíaca (Shiojima and Walsh 2006; Shimizu and Minamino 2016). Inicialmente, o crescimento cardíaco é uma resposta adaptativa ao incremento ou sobrecarga hemodinâmica, em que um aumento no estresse mecânico na parede é atenuado pelo incremento na espessura da parede

(Shiojima and Walsh 2006). No entanto, a sobrecarga hemodinâmica crônica é prejudicial para o coração e resulta em dilatação cardíaca e disfunção contrátil que frequentemente progride para insuficiência cardíaca (Shiojima and Walsh 2006; Gupta et al. 2007; Bernardo et al. 2010; Kehat and Molkentin 2010; Shimizu and Minamino 2016). A progressão à insuficiência cardíaca é marcada por uma interação dinâmica entre a disfunção miocítica e mecanismos compensatórios de natureza neuro-humoral, que tentam estimular a atividade de bomba e manter o débito cardíaco (Lympopoulos et al. 2013).

De acordo com a forma geométrica do coração, a hipertrofia cardíaca pode ser classificada por apresentar um crescimento excêntrico ou concêntrico (**Figura 1**). A hipertrofia excêntrica se desenvolve em resposta à sobrecarga de volume (ex. regurgitação aórtica, doenças valvulares) resultando no incremento tanto da massa cardíaca como do volume ventricular (dilatação da câmara), podendo-se observar uma espessura da parede conservada ou alterada (incremento ou redução). Nesse cenário, a adição de sarcômeros em paralelo leva ao crescimento em comprimento dos cardiomiócitos. Em comparação, a hipertrofia concêntrica refere-se ao aumento da parede e da massa cardíaca com um volume da câmara cardíaca normal ou reduzido, causado pela sobrecarga de pressão (ex. hipertensão, estenose aórtica). Nessa condição, os sarcômeros são aderidos em série, resultando no crescimento em largura dos cardiomiócitos (Bernardo et al. 2010; Shimizu and Minamino 2016).



**Figura 1:** A hipertrofia cardíaca. O remodelamento cardíaco resulta em alterações celulares e moleculares que modificam a forma e estrutura do coração. De acordo ao estímulo que causa o remodelamento cardíaco, a hipertrofia pode apresentar diferentes manifestações clínicas (Modificado de Kehat & Molkenkin, 2010 e Bernardo et al., 2010).

Independentemente do estímulo que leve ao crescimento cardíaco, a hipertrofia cardíaca está associada com modificações estruturais e funcionais assim como alterações metabólicas, bioquímicas e moleculares. O remodelamento estrutural dos componentes da parede do ventrículo permite acomodar o incremento do tamanho dos miócitos e as mudanças na rede de colágeno. Sob condições basais, a rede de colágeno fornece a integridade estrutural dos miócitos, facilitando o encurtamento das células. Isso se traduz na eficiente função de bomba cardíaca (Bernardo et al. 2010). No entanto, no remodelamento patológico existe a perda de miócitos e a sua substituição por colágeno (fibrose). O acúmulo excessivo de colágeno acaba enrijecendo os ventrículos, o que prejudica a contração e o relaxamento, a condução elétrica, e reduz a densidade capilar. A fibrose somada à redução da densidade capilar, aumenta a distância de difusão de oxigênio, levando à isquemia do miocárdio, o que provavelmente contribui para a transição da hipertrofia para a insuficiência cardíaca (Bernardo et al. 2010).

Embora os miócitos tenham um papel importante no processo hipertrófico, outras células (ex. fibroblastos, células endoteliais, células do músculo liso) também

estão envolvidas no processo de remodelamento, seja de forma direta ou indireta. O desenvolvimento da hipertrofia e sua progressão para insuficiência cardíaca resulta de muitos fatores, incluindo alterações na expressão gênica, fatores humorais, apoptose dos cardiomiócitos, liberação de citocinas e disfunção vascular em alterações na composição da matriz extracelular (Gupta et al. 2007).

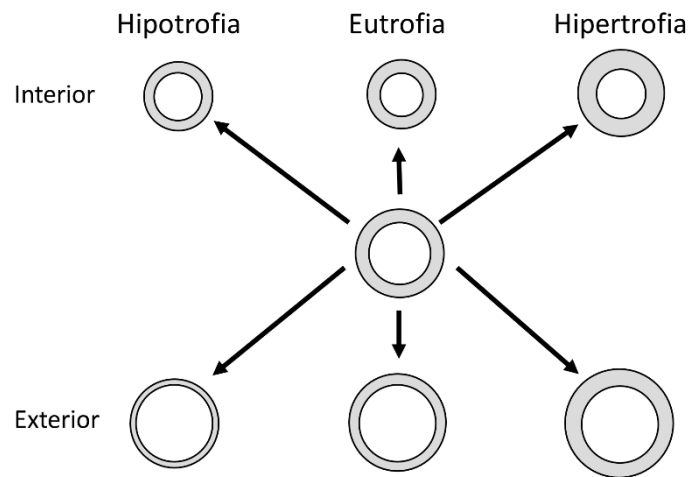
## **2. O remodelamento vascular**

A função vascular está determinada pelas propriedades estruturais e funcionais da parede vascular (Van Varik et al. 2012). Essa parede está constituída por diferentes tipos celulares e camadas: (1) as células endoteliais, compreendem a camada celular interna do vaso (túnica íntima) e estão em contato com o fluxo sanguíneo; (2) as células do musculo liso vascular, que formam a túnica média, fornecem estrutura e regulam o tônus vascular; e por último (3) os fibroblastos, as células inflamatórias (ex. macrófagos) e diversos componentes da matriz extracelular, que formam parte da camada adventícia a qual fornece suporte estrutural (Mazurek et al. 2017; Lyle and Taylor 2019) e as propriedades biomecânicas ao vaso sanguíneo (White and Mazzacco 1996).

A vasculatura é capaz de detectar e responder às alterações do meio, através da produção local de mediadores que promovem mudanças na estrutura e função vascular (Gibbons and Dzau 1994). Através do remodelamento vascular, a parede do vaso pode sofrer alterações que permitem manter o apropriado tamanho do lúmen e o fluxo normal de sangue. Inicialmente, o processo de remodelamento começa como uma resposta adaptativa às alterações hemodinâmicas, mas pode se tornar mal adaptativo levando ao comprometimento da função vascular (Gibbons and Dzau 1994; Melo et al. 2007; Renna et al. 2013).

Embora as alterações hemodinâmicas (pressão, fluxo) sejam os determinantes primários do remodelamento vascular em condições fisiológicas e patológicas, uma variedade de estímulos fisiopatológicos, como inflamação, estresse oxidativo e apoptose, contribuem para o mesmo, resultando em alterações funcionais e estruturais (Melo et al. 2007).

Baseado nas diferentes alterações morfológicas dos vasos sanguíneos, podem se observar diversos tipos de remodelamento (**Figura 2**). Este pode ser direcionado para o interior ou exterior, e ocorrer com ou sem crescimento da parede do vaso (ou seja, hipertrofia, eutrofia ou hipotrofia), acompanhado ou não por alterações no tamanho do lúmen (Mulvany et al. 1996).



**Figura 2:** Resultados potenciais do remodelamento vascular (Melo et al. 2007). Os tipos de remodelamento podem ser para o interior, onde há redução do diâmetro do lúmen, ou para o exterior, onde o diâmetro do lúmen aumenta. Isto pode ser acompanhado do incremento na razão Medial/lúmen (Hipertrofia), sua diminuição (Hipotrofia) ou manutenção (Eutrofia).

No remodelamento eutrófico, os elementos da parede vascular são reorganizados sem um aumento do diâmetro da espessura da camada média em relação ao lúmen. No remodelamento hipertrófico, a estrutura da parede é alterada de modo em que há um aumento do diâmetro da camada medial em relação ao lúmen (razão M/L) através da hipertrofia e hiperplasia das células do músculo liso vascular da média e possivelmente de fibroblastos e células progenitoras vasculares da adventícia. Na remodelação hipotrófica, há uma redução da área de seção transversal da camada média em relação ao lúmen, de forma que a razão M/L é diminuída. Exemplos clínicos desse padrão de remodelamento incluem a dilatação vascular associada com o

incremento crônico do fluxo sanguíneo, e a perda de células e/ou alterações em componentes da matriz que resultam na dilatação e formação do aneurisma (Melo et al. 2007; Renna et al. 2013).

## **2.1 Alterações vasculares: a dilatação da aorta**

A aorta é o vaso sanguíneo que leva o sangue oxigenado do ventrículo esquerdo para todos os órgãos do corpo. Diversas doenças ou condições patológicas podem causar danos à estrutura da aorta. Essas condições incluem a aterosclerose, hipertensão e desordens genéticas (como a síndrome de Marfan [MFS]) e infecciosas, entre outras (Boyer et al. 2004; Unlu et al. 2019).

A dilatação da raiz aorta é a alteração patológica mais observada na aorta ascendente (Kırali and Kahveci 2018). Esta alteração é de grande importância clínica, pois incrementa o risco de complicações como dissecação e ruptura da aorta, e regurgitação valvar (Nataf and Lansac 2006; Unlu et al. 2019). Embora sejam incomuns, a dilatação grave da aorta (aneurisma) assim como a dissecação da aorta ocorre geralmente em pacientes mais velhos (idade média de 62 anos) (Poswar et al., 2019; Rawla et al., 2019). Não obstante, pode ocorrer mais cedo em determinados grupos de risco, incluindo pacientes com síndromes de Marfan ou Turner (Poswar et al., 2019). A dilatação progressiva da raiz da aorta é causada pela destruição das fibras elásticas e de colágeno (Kırali and Kahveci 2018). Os processos fisiopatológicos que contribuem no remodelamento da parede vascular são complexos e envolvem a participação de vários tipos celulares, múltiplas cascatas de sinalização e a ativação de genes envolvidos no crescimento, proliferação, apoptose, migração e adesão de células vasculares (Melo et al. 2007).

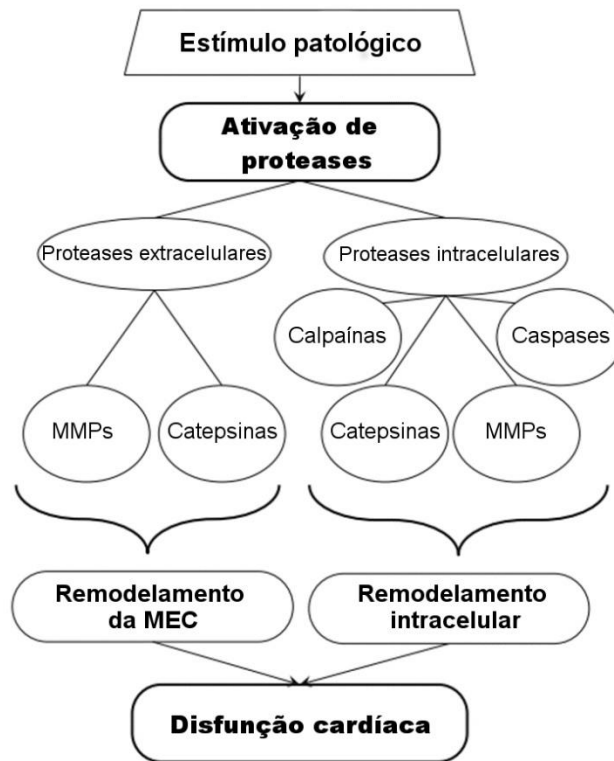
## **3. Alterações da matriz extracelular no remodelamento cardiovascular**

A matriz extracelular (MEC) possui um papel fundamental na estrutura e na função dos tecidos cardiovasculares, assim como no processo de remodelamento e adaptação aos diversos estímulos estressantes e patológicos.

Principalmente, a MEC está formada por uma rede complexa de fibras de colágeno e outras proteínas, que fornece um suporte para as células e mantém a integridade estrutural dos tecidos (Gupta et al. 2007). A composição e estrutura da MEC pode variar consideravelmente dependendo do tipo de tecido, sendo essencial para manter as diferentes propriedades estruturais e biomecânicas destes (Gonzalez 2016). A MEC do miocárdio, por exemplo, é composta principalmente por colágeno tipo I e colágeno tipo III (Gupta et al. 2007). As valvas cardíacas estão formadas por diferentes camadas ricas em elastina, proteoglicanos e colágeno (Combs and Yutzey 2009; Hinton and Yutzey 2011). Na MEC vascular os principais componentes também são o colágeno e a elastina, assim como proteoglicanos e glicoproteínas (Mazurek et al. 2017). As fibras de elastina oferecem elasticidade, enquanto que o colágeno outorga resistência à tração e rigidez (Didangelos et al. 2010). Os proteoglicanos tem a capacidade de reter água e conferem resistência à compressão. Por último, as diferentes glicoproteínas participam na organização matricial e são essenciais para a fixação das células (Didangelos et al. 2010). Todos esses componentes, em conjunto, contribuem para manutenção das propriedades biológicas e funcionais dos tecidos cardiovasculares. Portanto, as alterações em componentes da MEC levam a anormalidades estruturais e disfunção.

Diferentes proteases participam do remodelamento bioquímico dos componentes da MEC em condições normais (crescimento, reparação e renovação) assim como durante processos patológicos. O equilíbrio entre a síntese e degradação de proteínas da matriz é crucial para o remodelamento cardíaco e vascular. A renovação do colágeno, por exemplo, é mantida em equilíbrio pelas metaloproteinases da matriz (MMPs) e seus inibidores endógenos [inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs)]. No entanto, o desbalanço entre eles contribui para a degradação da MEC, resultando na perda da integridade estrutural dos tecidos (Gupta et al. 2007; Müller and Dhalla 2012). O aumento dos níveis de MMPs, especialmente de MMP-2 e MMP-9, tem sido associado com o processo de remodelamento subjacente na hipertrofia cardíaca (Müller and Dhalla 2012). Além disso, a degradação de elastina e colágeno induzida por MMPs também contribuem no desenvolvimento do aneurisma aórtico (Freestone et al. 1995; Ghosh et al. 2012). Outras famílias de proteases incluindo as calpaínas, caspases e catepsinas também desempenham um papel importante no processo de

remodelamento da MEC e dos componentes intracelulares e, conseqüentemente, no desenvolvimento da disfunção cardíaca (**Figura 3**) (Müller and Dhalla 2012; Hua and Nair 2015).



**Figura 3:** Representação esquemática dos diferentes tipos de proteases envolvidas no remodelamento cardiovascular. Adaptado de Müller & Dhalla (2012)

A participação das catepsinas na degradação de proteínas da MEC e nas doenças cardiovasculares tem sido amplamente documentada (Müller and Dhalla 2012; Fonović and Turk 2014; Hua and Nair 2015; Liu et al. 2018). As catepsinas compreendem uma família de proteases sintetizadas como precursores enzimáticos, ativados no interior do lisossomo. A sua principal função é a degradação de proteínas no interior do lisossomo. No entanto, em situações nas quais as catepsinas são secretadas, as mesmas podem causar a degradação de componentes da MEC (como a elastina e colágeno) e/ou ativar MMPs (Müller and Dhalla 2012; Fonović and Turk 2014; De Pasquale et al. 2020). Alterações nos níveis de catepsinas foram observados em processos patológicos que



levam ao aneurisma aórtico, hipertrofia cardíaca e insuficiência cardíaca (Fonović and Turk 2014; Hua and Nair 2015; Liu et al. 2018). O aumento nos níveis de expressão e proteicos de catepsina B ou L, tem sido mostrado estar inversamente relacionado com a função cardíaca (fração de ejeção) em pacientes com cardiomiopatia dilatada (Müller and Dhalla 2012).

#### **4. Mecanismos moleculares envolvidos no remodelamento cardíaco patológico**

Como discutido previamente, a hipertrofia cardíaca resulta da resposta adaptativa das células cardíacas (nível molecular e bioquímico) a uma combinação de fatores, como sobrecarga hemodinâmica e alterações hormonais para manter o débito cardíaco. No entanto, a persistência da hipertrofia e dos estímulos estressantes, por longos períodos, pode ser prejudicial e resultar em disfunção e insuficiência cardíaca (Gupta et al. 2007).

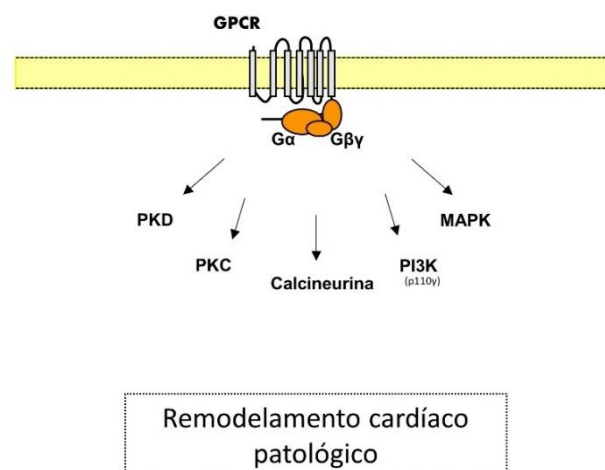
Em resposta à sobrecarga hemodinâmica, os miócitos estão sujeitos a forças mecânicas e à liberação de fatores autócrinos e parácrinos, incluindo a Angiotensina II (Ang II), catecolaminas, fator de crescimento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), entre outros. Esses fatores tem um importante papel no crescimento cardíaco e na progressão das alterações cardiovasculares, pela ativação de diferentes cascatas de sinalização caracterizadas por serem complexas e interrelacionadas (Bernardo et al. 2010). A seguir serão descritos alguns dos potenciais mecanismos envolvidos no processo de remodelamento patológico que levam à disfunção cardíaca.

##### **4.1. Receptores associados à proteína G**

Os receptores associados à proteína G (GPCR) são a superfamília de receptores neuro-hormonais mais importantes que regulam a função e a fisiologia cardiovascular. A função contrátil, por exemplo, é regulada principalmente pela atividade dos receptores  $\beta$  adrenérgicos ( $\beta$ -ARs) localizados na membrana dos cardiomiócitos. Já a estrutura e a morfologia cardíaca são reguladas por receptores de angiotensina II tipo I

(AT1) localizados especialmente em fibroblastos e células endoteliais vasculares, e em menor grau na membrana dos cardiomiócitos. No entanto, outros GPCR presentes no miocárdio também podem contribuir na regulação de diversos aspectos da fisiologia cardíaca (Siryk-Bathgate et al. 2013).

A ativação dos receptores GPCR é uma das cascatas de sinalização responsáveis por mediar o remodelamento cardíaco melhor caracterizada. Em resposta a um estímulo patológico (ex. sobrecarga de volume) diferentes fatores neuro-hormonais são liberados, causando o incremento na atividade do sistema nervoso adrenérgico [ou sistema simpático, (SNA)], do sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS), assim como liberação de diversas citocinas (Bernardo et al. 2010). Esses sistemas são ativados inicialmente para compensar a redução da função cardíaca e manter a funcionabilidade do coração. No entanto, a presença prolongada do estímulo patológico e dos mecanismos compensatórios de natureza neuro-hormonal conduz à descompensação cardíaca e à perda progressiva da função (Lympelopoulos et al. 2013). Entre as vias de sinalização intracelulares ativadas por receptores GPCR associadas com a hipertrofia patológica incluem-se a proteína quinase C (PKC), calcineurina, proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e o fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), entre outras (Gupta et al. 2007; Bernardo et al. 2010). Um resumo esquemático das vias de sinalização ativadas por receptores GPCR são apresentadas na **Figura 4**.



**Figura 4:** Diagrama simplificado de algumas vias de sinalização ativadas pelos receptores GPCR. Uma vez que o ligante é reconhecido pela GPCR (ex. receptores adrenérgicos,

receptores angiotensina II tipo I), ocorre a dissociação das subunidades  $G\alpha$  e  $G\beta\gamma$  e a sinalização intracelular, que podem sinalizar através de vias independentes uma da outra.

#### **4.1.1. Os receptores adrenérgicos**

Os neurotransmissores do sistema nervoso simpático (SNS), a epinefrina (Epi) e a norepinefrina (NE), medeiam seus efeitos na célula e nos tecidos através da união com os receptores adrenérgicos (ARs),  $\alpha$ -AR e  $\beta$ -AR (Lymperopoulos et al. 2013).

Os receptores  $\beta$ -AR são os mais abundantes nos corações humanos, tendo como principal função a regulação da contratilidade cardíaca em resposta às catecolaminas NE e Epi. A estimulação do subtipo  $\beta$ 1-ARs (principalmente) e  $\beta$ 2-ARs (em menor grau) incrementa a contratilidade (efeito inotrópico positivo), a frequência (efeito cronotrópico positivo), a taxa de relaxamento, e acelera a condução do impulso elétrico e a atividade marcapasso do coração, resultando na melhora da performance cardíaca.

No entanto, o subtipo  $\beta$ 2-AR adicionalmente pode sinalizar e funcionar de uma forma diferente ao receptor  $\beta$ 1-AR, já que ele também pode estar acoplado à outra subunidade da proteína G. Desta forma, enquanto a ativação do  $\beta$ 1-AR resulta em apoptose dos cardiomiócitos, o  $\beta$ 2-AR tem um efeito anti-apoptótico (Lymperopoulos et al. 2013).

Embora a ativação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos inicialmente seja um mecanismo pelo qual a contratilidade do músculo cardíaco melhora, a sua ativação crônica, particularmente do subtipo  $\beta$ 1, promove a disfunção contrátil, arritmias ventriculares e insuficiência cardíaca congestiva (Vidal et al. 2012). Camundongos transgênicos que superexpressam  $\beta$ 1-AR no coração apresentam deterioração progressiva do desempenho cardíaco, hipertrofia e fibrose (Gupta et al. 2007). Adicionalmente, camundongos deficientes em  $\beta$ 1 e  $\beta$ 2-ARs têm mostrado uma resposta hipertrófica atenuada e fibrose reduzida, em presença de sobrecarga de pressão (Bernardo et al. 2010).

#### 4.1.2. O sistema renina angiotensina e o TGF- $\beta$

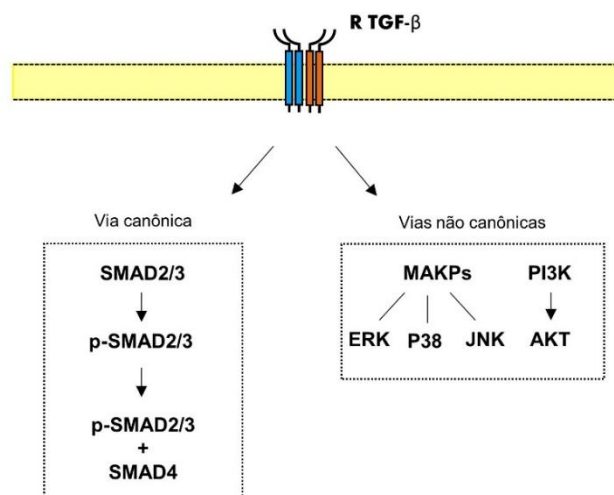
Estudos têm indicado que o sistema renina angiotensina (RAS) e TGF- $\beta$  participam como mediadores no processo de remodelamento cardíaco patológico (Rosenkranz 2004; Gupta et al. 2007). A angiotensina II (Ang II) é a principal substância vasoativa do RAS e tem um papel importante no funcionamento e na homeostase cardiovascular. Dois tipos distintos de receptores, o receptor de Ang II tipo I (AT1) e o receptor de Ang II tipo II (AT2), podem mediar a sinalização da Ang II na célula (Everett et al. 1994). A ativação do receptor AT1 desencadeia vários efeitos, incluindo o aumento da pressão, a síntese de aldosterona, vasoconstrição, fibrose, proliferação celular, hipertrofia, fenômenos de estresse oxidativo e processos inflamatórios (Frag et al. 2015). Em contrapartida, o receptor AT2 induz efeitos opostos ao receptor AT1, atenuando a proliferação, remodelação, fibrose e inibindo a inflamação nas lesões vasculares (Wu et al. 2001). Uma via alternativa do RAS inclui a ativação do receptor da Angiotensina 1-7 (Ang 1-7), chamado MAS, a qual também resulta num efeito cardioprotetor, que inclui a vasodilatação assim como o efeito anti-fibrótico, anti-proliferativo e anti-inflamatório (Frag et al. 2015).

Através da proteína G, o receptor AT1 pode resultar na ativação de genes que favorecem a hipertrofia cardíaca, fibrose, liberação de citocinas pró-inflamatórias (ex. IL-6) e outros processos celulares que contribuem para o remodelamento cardíaco patológico (Capote et al. 2015; Shimizu and Minamino 2016). Estes efeitos são principalmente atribuídos à ativação de receptores AT1 presentes nos fibroblastos do coração e não em miócitos cardíacos (Capote et al. 2015). No entanto, a via de sinalização mediada pelo receptor AT1 é complexa e pode sinalizar independentemente da proteína G ou interagir com outras vias de sinalização (Kawai et al. 2017).

A ativação do receptor AT1 tem um papel conhecido na regulação da expressão do gene *TGF- $\beta$*  na hipertrofia cardíaca e na aorta (Everett et al. 1994; Gupta et al. 2007; Habashi et al. 2011). De fato, estudos recentes indicam que esse efeito seria o principal mecanismo pelo qual a Ang II induz o remodelamento cardíaco (Rosenkranz 2004). A regulação de TGF- $\beta$ 1 através do receptor AT1, pode resultar tanto do incremento dos

ligantes e receptores de TGF- $\beta$ 1 quanto do aumento de ativadores da via de sinalização (Zhou et al. 2006)

O TGF- $\beta$ 1 é expresso principalmente em fibroblastos, células do músculo liso vascular, células endoteliais e macrófagos. Ele é sintetizado e secretado como uma molécula precursora que se une a proteínas da matriz extracelular (MEC). A ativação efetiva de TGF- $\beta$  requer a liberação da forma madura de TGF- $\beta$  associada à MEC e membrana basal, por proteases ou MMPs (ex. MMP-2 e MMP-9) de uma maneira altamente controlada (Kalluri and Han 2008; Kapur 2011). A cascata de sinalização se inicia pela união ao receptor de superfície celular treonina/serina quinase tipos I e II, os quais formam um complexo heterodimérico em presença do ligante (**Figura 5**). A via canônica de sinalização por TGF- $\beta$  conduz à fosforilação dos mediadores SMAD2 e SMAD3 (p-SMAD2/3). A proteína p-SMAD2/3 forma um complexo heterodimérico com o SMAD4 e posteriormente é translocado ao núcleo celular, onde regula a expressão de diferentes genes alvo (Shi and Massagué 2003). No entanto, o receptor pode ativar outras vias de sinalização (não canônicas) que resultam na fosforilação e ativação de diversas cascatas de sinalização, como a PI3K e as MAPK, as quais estão envolvidas em processos patológicos de dilatação da aorta e no remodelamento cardíaco (Zhang 2009; Kapur 2011; Holm et al. 2011; Zeng et al. 2019).



**Figura 5:** A sinalização de TGF- $\beta$ 1. A cascata downstream ao receptor de TGF- $\beta$  inclui vias de sinalização canônicas (SMAD2/3) e não canônicas (ex. MAPK, PI3K), as quais estão envolvidas em processos patológicos.

Desta forma, a sinalização Ang II/AT1 promove a síntese de TGF- $\beta$ 1 em fibroblastos e miócitos cardíacos, o que pode causar hipertrofia dos cardiomiócitos, proliferação de fibroblastos e fibrose. Além de induzir a síntese e remodelamento de componentes da MEC, como colágeno, fibronectina, e proteoglicanos, TGF- $\beta$ 1 também é conhecido por ser um regulador de MMPs (MMP-2 e MMP-9) e seus inibidores endógenos através das vias não canônicas de sinalização (ERK1/2 e p38 MAPK) (Gupta et al. 2007; Kapur 2011; Gomes et al. 2012). Portanto, a desregulação da via de TGF- $\beta$  tem sido envolvida em uma ampla gama de doenças humanas e processos patológicos como síndrome de Marfan (MFS), doenças autoimunes, hipertrofia cardíaca, aneurisma aórtico, fibrose e câncer (Everett et al. 1994; Gupta et al. 2007; Ten Dijke and Arthur 2007; Kalluri and Han 2008; Krstic and Santibanez 2014).

#### **4.1.3. A sinalização PI3K/AKT**

Uma outra via bastante estudada na resposta hipertrófica é a ativação da via PI3K/AKT. A PI3K é uma família de enzimas envolvidas em diferentes funções celulares, como o crescimento celular, sobrevivência, diferenciação, proliferação e metabolismo (Gupta et al. 2007; Bernardo et al. 2010). As isoformas da PI3K, p110 $\alpha$  e p110 $\gamma$ , são abundantemente expressas no coração e sua ativação tem um papel importante no remodelamento cardíaco fisiológico e patológico, respectivamente (Bernardo et al. 2010). A ativação de PI3K pode ser causada por diversos receptores tirosina quinase (ex. receptor de insulina, TGF- $\beta$ ), assim como por receptores GPCR (Zhang 2009; Bernardo et al. 2010).

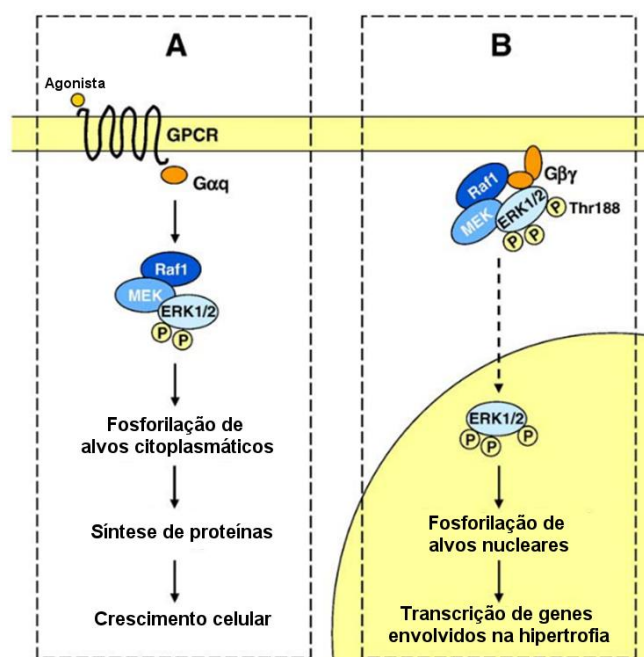
A isoforma PI3K (p110 $\gamma$ ) é acoplada a diferentes GPCR e tem um efeito prejudicial no coração (Bernardo et al. 2010). Os receptores GPCR (ex. AT1 e  $\beta$ -ARs) podem ativar a proteína PI3K (p110 $\gamma$ ) resultando no recrutamento e ativação da quinase AKT (Heineke and Molkentin 2006; Gupta et al. 2007; Bernardo et al. 2010). AKT é molécula efetora da via PI3K e regula diferentes processos como a sobrevivência celular, o ciclo celular, o metabolismo, e a síntese proteica (Gupta et al. 2007; Bernardo et al. 2010). Visto que a AKT pode ser ativada tanto por receptores tirosina quinase como por receptores GPCR,

a mesma parece estar diferencialmente regulada, dependendo do estímulo (Bernardo et al. 2010). A ativação de AKT pode induzir a hipertrofia cardíaca para preservar a função. No entanto, a ativação crônica leva ao desenvolvimento de hipertrofia cardíaca patológica associada com o incremento de fibrose intersticial, indução de genes fetais, dilatação e disfunção contrátil (Heineke and Molkentin 2006; Shiojima and Walsh 2006; Dorn 2007).

#### **4.1.4. A sinalização das MAPKs (ERK/JNK/p38 MAPK)**

As proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) têm um papel significativo na resposta hipertrófica e na patologia vascular. A superfamília das MAPKs é agrupada em três categorias: (a) as quinases reguladoras da sinal extracelular (ERKs), (b) as quinase amino terminal c-jun (JNKs) e (c) a p38 MAPKs (Gupta et al. 2007; Bernardo et al. 2010).

O estresse mecânico, os receptores tirosina quinase e TGF- $\beta$  podem ativar a cascata das ERKs (Gupta et al. 2007; Zhang 2009). A ativação de ERK1/2 pela via sinalização de TGF- $\beta$  contribui em diversos aspectos da patologia vascular e para a progressão do aneurisma aórtico (Holm et al. 2011; Lindsay and Dietz 2011). Por outro lado, a estimulação dos receptores GPCR também pode ativar ERKs através de ambas subunidades da proteína G ( $G\alpha$  ou  $G\beta\gamma$ ), e contribuir à resposta hipertrófica mediante mecanismos diferentes (**Figura 6**) (Bernardo et al. 2010).



**Figura 6:** ERK1/2 pode contribuir à resposta hipertrófica através de dois mecanismos distintos (Bernardo et al. 2010). A) ERK1/2 pode ser ativado via proteína Gαq e fosforilar alvos citosólicos resultando na síntese proteica e crescimento celular. B) ERK1/2 pode ser ativado via proteína Gβγ, o que promove a autofosforilação e seu endereçamento ao núcleo celular onde participa na expressão de genes envolvidos na resposta hipertrófica.

Ao contrário das ERKs, as JNKs e p38 MAPK são ativadas principalmente por estresse celular, citocinas inflamatórias, estresse oxidativo, choque osmótico, choque térmico e endotoxinas, mas também podem ser ativadas por GPCR. A ativação de JNK está envolvida na expressão de genes fetais, TGF-β1, e no colágeno tipo I durante a hipertrofia cardíaca, enquanto que p38 MAPK também tem sido envolvida em promover a reexpressão de genes fetais e contribuir em outros processos incluindo apoptose dos cardiomiócitos, contratilidade, fibrose, remodelamento e metabolismo (Gupta et al. 2007; Bernardo et al. 2010; Shimizu and Minamino 2016). No entanto, alguns estudos são contraditórios em relação ao papel de JNK e p-38 MAPK no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca (Bernardo et al. 2010).



## 5. O lisossomo e as doenças lisossômicas

Os lisossomos são organelas citoplasmáticas formadas por uma bicamada lipídica, encarregadas pela degradação e reciclagem de uma ampla variedade de substratos de origem intracelular e extracelular. Essa degradação de macromoléculas acontece exclusivamente dentro do compartimento lisossômico, onde a presença de mais de 50 hidrolases e o pH ácido favorecem a atividade catalítica das enzimas.

Não obstante, a função dos lisossomos não se limita apenas à degradação de substâncias. Eles também estão envolvidos em diversas outras funções essenciais para a célula, como o tráfego de vesículas, crescimento celular, apoptose e na sinalização celular (Parenti et al. 2015). Portanto, não é razoável supor que qualquer erro em algum dos seus componentes conduz a alterações em toda a maquinaria celular. Já foram descritas diversas doenças metabólicas hereditárias que afetam ao funcionamento do lisossomo. Essas doenças, conhecidas como doenças lisossômicas (DL) ou doenças de depósito lisossômico, são caracterizadas pelo acúmulo progressivo de substratos não degradados dentro e fora do lisossomo.

A maioria das DL são causadas pela deficiência de hidrolases lisossômicas, no entanto, também podem ser causadas por alterações em outras proteínas envolvidas no funcionamento do lisossomo. A deficiência em alguma dessas proteínas resulta no acúmulo de determinados metabólitos e em uma cascata de eventos patogênicos que levam a diversas manifestações clínicas (Vellodi 2005; Platt et al. 2012; Parenti et al. 2015).

Tradicionalmente as DL têm sido classificadas de acordo ao tipo de substrato acumulado. As principais categorias de DL são as mucopolissacaridoses, mucopolipidoses, esfingolipidoses, oligossacaridoses e lipofuscinoses ceróides (Poswar et al., 2019). Essa categorização reúne doenças com sintomas similares resultantes de um bloqueio em uma mesma via catabólica (Winchester 2012).

## 5.1. As Mucopolissacaridoses

As mucopolissacaridoses (MPS) são um grupo de doenças lisossômicas, causadas pela deficiência de alguma das enzimas envolvidas no processo de degradação dos glicosaminoglicanos (GAGs) (Neufeld and Muenzer 2001).

Os GAGs, também conhecidos como mucopolissacarídeos, são complexas moléculas de polissacarídeos com importantes funções biológicas. Existem dois tipos de GAGs: os sulfatados e os não sulfatados. O GAG não sulfatado é o ácido hialurônico (AH) enquanto que os GAGs sulfatados incluem o condroitin sulfato (CS), dermatan sulfato (DS), queratan sulfato (KS), e heparan sulfato (HS). Essas moléculas estão presentes na superfície celular e na matriz extracelular, onde interagem e regulam uma ampla variedade de proteínas, incluindo citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, morfógenos, enzimas e moléculas de adesão (Gandhi and Mancera 2008). Alguns tipos de GAGs podem ser abundantes em determinados tecidos, por exemplo, o DS é naturalmente encontrado no tecido cardiovascular (valvas e vasos sanguíneos) e na pele (Gandhi and Mancera 2008).

O processo de degradação dos diferentes GAGs é realizado no lisossomo pela ação coletiva de diversas enzimas hidrolíticas. O seu acúmulo resulta em um dano celular que afeta progressivamente a múltiplos órgãos e reduz a expectativa de vida dos pacientes com MPS (Volpi et al. 2013).

Dependendo da enzima deficiente e do substrato acumulado, 11 tipos de MPS foram identificadas (Tabela 1). A maioria compartilha algumas características clínicas e caracterizam-se por ter um curso crônico e progressivo. Os sintomas típicos incluem organomegalia, disostose multiplex e características faciais anormais. A visão, a audição, os ossos e articulações assim como a função cardiovascular e pulmonar comumente também podem estar afetados. Em algumas MPS, os GAGs podem afetar ao sistema nervoso levando a alterações cognitivas e retardo mental (Neufeld and Muenzer 2001).

**Tabela 1.** Diferentes tipos de Mucopolissacaridoses.

<b>Tipo de MPS</b>	<b>Síndrome</b>	<b>Enzima deficiente</b>	<b>GAG acumulado</b>
MPS I	Hurler Hurler-Scheie Scheie	$\alpha$ -L-iduronidase	HS, DS
MPS II	Hunter	iduronato sulfatase	HS, DS
MPS III A	Sanfilipo A	heparan-N-sulfatase	HS
MPS III B	Sanfillipo B	$\alpha$ -N-acetilglicosaminidase	HS
MPS III C	Sanfillipo C	$\alpha$ -glicosaminida-N-acetiltransferase	HS
MPS III D	Sanfillipo D	N-acetilglicosamina-6-sulfatase	HS
MPS IV A	Morquio A	N-acetilgalactosamina-6-sulfatase	KS, CS
MPS IV B	Morquio B	$\beta$ -galactosidase	KS, CS
MPS VI	Maroteaux-Lamy	arilsulfatase B	DS, CS
MPS VII	Sly	$\beta$ -glucuronidase	HS, DS, CS
MPS IX	Natowicz	hialuronidase	AH

HS: Heparan sulfato; DS: Dermatan sulfato; KS: Queratan sulfato; CS: condroitin sulfato; AH: ácido hialurônico. Adaptado de Neufeld & Muenzer (2001).

## 5.2. A Mucopolissacaridose tipo I

A Mucopolissacaridose tipo I (MPS I) é uma doença lisossômica causada por mutações no gene *IDUA* que codifica para a enzima alfa-L-iduronidase (IDUA; EC3.2.1.76) a qual é responsável por uma etapa da degradação dos glicosaminoglicanos heparan e dermatan sulfato (HS e DS). Como consequência da atividade baixa ou nula dessa enzima, os metabólitos HS e DS são acumulados progressivamente na célula e em diferentes tecidos, resultando em uma variedade de manifestações clínicas que impactam sobre a qualidade e a expectativa de vida dos pacientes afetados (Pastores et al. 2007; Giugliani et al. 2010).

As manifestações clínicas dependem da gravidade da doença, em parte, determinada pelo grau de atividade enzimática residual associada à mutação patogênica presente no gene *IDUA*. Historicamente três formas fenotípicas da MPS I são reconhecidas. A forma grave da doença (síndrome de Hurler) é caracterizada por alterações oftalmológicas, cardíacas e pulmonares, organomegalia, disostose múltipla e problemas neurológicos. Esses sintomas surgem após o nascimento e progridem rapidamente, o que leva à morte na primeira década de vida. A forma intermediária da

doença (síndrome de Hurler-Scheie) apresenta manifestações somáticas menos graves comparada com a forma grave, podendo-se observar a presença ou ausência de alterações cognitivas. Já na forma atenuada da MPS I (síndrome de Scheie) os sintomas aparecem tarde e progridem de forma lenta. Os pacientes com a forma Scheie têm inteligência normal e sobrevivem até a idade adulta (Neufeld and Muenzer 2001; Pastores et al. 2007; Giugliani et al. 2010).

Do ponto de vista genético, a MPS I apresenta um padrão de herança autossômico recessivo, na qual ambos alelos do gene *IDUA* apresentam uma alteração patogênica. Diversas variantes patogênicas têm sido descritas neste gene e podem estar associadas a um determinado subtipo clínico (Matte et al. 2003). Entre as variantes mais frequentes no mundo, a variante p.(Thr402\*) está associada com a forma mais grave da MPS I (Matte et al. 2003; Poletto et al. 2018). No Brasil, a variante p.(Thr402\*) também é altamente frequente e estima-se uma prevalência de 1:422.507 desta variante na população em geral (Federhen et al. 2020).

O diagnóstico definitivo da MPS I é realizado pela avaliação da atividade enzimática de IDUA, e complementado e confirmado pela avaliação molecular das variantes patogênicas. A avaliação preliminar inclui a análise de GAGs em amostras de plasma/soro e urina após a suspeita clínica (Kubaski et al. 2020). A identificação dos sintomas e o diagnóstico precoce é importante, já que favorece os resultados dos tratamentos para a MPS I, reduzindo a progressão da doença antes do aparecimento de danos irreversíveis. No entanto, infelizmente o diagnóstico e o tratamento precoce são limitados por diversos fatores, incluindo o reconhecimento dos sinais e sintomas clínicos, particularmente para as formas atenuadas da doença (Beck et al. 2014; Bruni et al. 2016).

### **5.2.1. A doença cardiovascular na Mucopolissacaridose tipo I**

Como descrito previamente, existem diversos fatores que contribuem para a patogênese das doenças cardiovasculares e, entre estes, a disfunção do lisossomo está fortemente correlacionada com a progressão das alterações que acometem o músculo cardíaco e os vasos sanguíneos (Chi et al. 2020). Muitos pacientes com DL apresentam

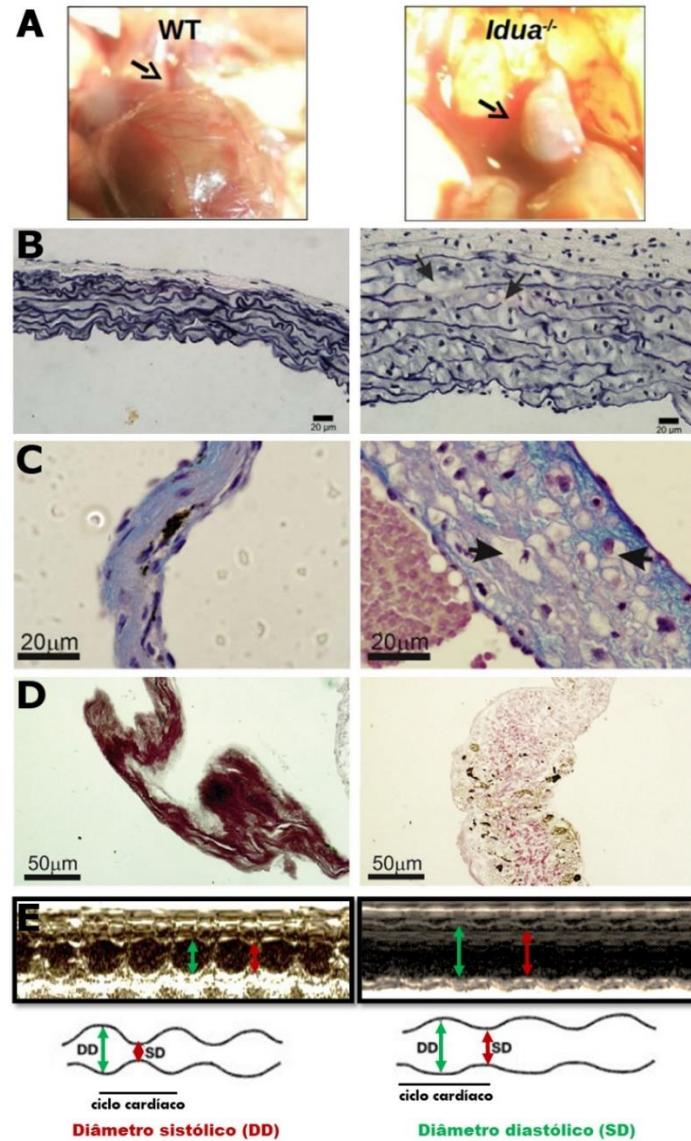
uma variedade de alterações cardíacas graves que incluem cardiomiopatia hipertrófica e dilatada, alterações nas valvas e nos vasos sanguíneos, entre outras (Parenti et al. 2015; Platt et al. 2018; Chi et al. 2020).

No contexto das MPS, as manifestações cardiovasculares são comuns e contribuem significativamente para a morbimortalidade dos pacientes (Krovetz et al. 1965; Rentería et al. 1976; Lin et al. 2014, 2016). Dependendo do GAG acumulado e o grau de deficiência enzimática, as alterações cardiovasculares podem se apresentar com maior frequência e gravidade. Desta forma, as MPS com acúmulo de dermatan sulfato (MPS I, II, VI e VII) apresentam lesões cardíacas mais graves que os demais tipos. Isso ocorre possivelmente porque o DS é naturalmente localizado nas valvas e nos vasos sanguíneos (Dangel 1998; Gandhi and Mancera 2008; Fesslová et al. 2009; Leal et al. 2010).

Particularmente, as alterações cardiovasculares na MPS I apresentam um grau de gravidade dependente da idade e da gravidade da doença. De forma geral, a doença cardiovascular se desenvolve mais cedo e progride mais rápido em pacientes com a forma grave (síndrome de Hurler) em comparação aos pacientes com as formas mais atenuadas (síndrome Hurler-Scheie ou Scheie), nas quais pode apresentar um início tardio com progressão lenta (Braunlin et al., 2011).

Tipicamente, uma das principais causas de óbito em pacientes com MPS I é a insuficiência cardíaca congestiva (ICC) (Rentería et al. 1976; Jordan et al. 2005; Muenzer et al. 2009). Entre as alterações cardíacas que contribuem para o desenvolvimento de ICC, as valvulopatias são uma das mais comuns observadas nestes pacientes (Neufeld and Muenzer 2001). O aumento na espessura das valvas cardíacas e sua disfunção tem sido observado em 80% dos pacientes com MPS I (Braunlin et al., 2011). Em modelos animais para MPS I e MPS VII o aumento progressivo na espessura das valvas cardíacas associado ao acúmulo de GAGs não degradados é uma característica comum (**Figura 7**) (Braunlin et al., 2006; Sleeper et al., 2008). Essas alterações patológicas podem resultar em regurgitação (insuficiência) e/ou estenose (Braunlin et al., 2011; Dangel, 1998). A maioria dos estudos tem reportado que a valva mitral é comumente a mais afetada. No entanto, de forma geral, as valvas do lado esquerdo (mitral e aórtica) são mais afetadas que as do lado direito (tricúspide e pulmonar) (Braunlin et al., 2011; Fesslová et al.,

2009). A disfunção das valvas cardíacas pode levar a uma sobrecarga de volume no ventrículo esquerdo (VE), dilatação do VE, hipertrofia, e por fim disfunção cardíaca (Braunlin et al., 2011).



**Figura 7:** Alterações patológicas observadas em camundongos MPS I aos 6 meses de idade (Modificado de Baldo et al., 2017 e Gonzalez et al., 2018). (A) Aumento no diâmetro da raiz da aorta; (B) as alterações histológicas na aorta incluem acúmulo de GAGs e aumento da fragmentação das fibras de elastina (setas); (C) aumento da espessura das valvas acompanhado de acúmulo de GAGs (setas); e (D) alterações no conteúdo de colágeno; (E) imagem ecocardiográfica ilustrativa da cavidade do ventrículo esquerdo onde se registra um aumento dos diâmetros acompanhado da redução na função cardíaca.

Manifestações cardíacas como hipertensão sistêmica ou pulmonar também têm sido reportadas em indivíduos com MPS I e podem contribuir para o desenvolvimento de ICC (Braunlin et al., 2011; Braunlin & Wang, 2016; Jordan et al., 2005; Kannan & Janardhanan, 2014; Neufeld & Muenzer, 2001; Taylor et al., 1991). Como discutido previamente, as alterações que resultam na sobrecarga de pressão também resultam em processos patológicos como remodelamento, hipertrofia e disfunção cardíaca (Kannan and Janardhanan 2014)

Os grandes vasos sanguíneos também podem ser afetados na MPS. Anormalidades histológicas como aumento na espessura da parede da aorta causado pela presença de acúmulo de GAGs, assim como a dilatação e redução da elasticidade da aorta também foram observadas em pacientes com MPS I (Braunlin et al., 2006; Nemes et al., 2008; Poswar et al., 2019). A dilatação da aorta é frequentemente encontrada em modelos animais para MPS I e MPS VII, e pode estar associada ao incremento na quebra das fibras de elastina e ao acúmulo de GAGs na parede do vaso (Baldo et al., 2017; Baldo et al., 2011; Ma et al., 2008; Metcalf et al., 2010).

Outras manifestações cardiovasculares incluem hipertrofia e dilatação do ventrículo esquerdo com a redução na contratilidade do miocárdio (Brands et al., 2013; Braunlin et al., 2006; Dangel, 1998; Gonzalez et al., 2020; Jordan et al., 2005; Mohan et al., 2002; Wiseman et al., 2013). Embora este último achado seja mais frequente em modelos animais de MPS I (Baldo et al., 2017; Braunlin et al., 2006; Jordan et al., 2005), tem sido observado em alguns pacientes (Brands et al., 2013; Braunlin et al., 2006; Mohan et al., 2002; Wiseman et al., 2013). Na tabela 2 é apresentado um resumo das alterações patológicas em pacientes e camundongos com MPS I.

**Tabela 2:** Alterações patológicas observadas nos pacientes e camundongos com MPS I (Modificado de Braunlin et al. 2006).

Parâmetro	Humanos	Camundongos
<b>Ecocardiografia</b>		
Tamanho do VE	Aumentado	Aumentado
Contratilidade do VE	Normal ou diminuída	Diminuída
Função diastólica	Normal ou diminuída	Diminuída
Raiz da aorta	Aumentado	Aumentado
<b>Histopatologia</b>		
Valvas: acúmulo de GAGs	Comum	Comum
Valvas: diminuição de elastina	Comum	Comum
Aorta: acúmulo de GAGs	Comum	Comum
Aorta: diminuição de elastina	Não reportado	Comum

### 5.2.2. Patogênese das doenças cardiovasculares na MPS I

De forma geral considera-se que o acúmulo de GAGs influencia múltiplos eventos secundários e cascatas de sinalização que causam a patologia na MPS I, levando a alterações anatômicas e funcionais que afetam ao coração e o sistema vascular (Braunlin et al., 2011; Palpant et al., 2011).

Algumas alterações estruturais podem ser explicadas pelo simples acúmulo progressivo de GAGs (ex. espessamento das valvas). Esses GAGs podem induzir processos inflamatórios que levam à liberação de citocinas, quimiocinas e ativação do sistema do complemento, o que finalmente resulta na regulação de várias proteases (Baldo et al., 2011; Braunlin et al., 2011; Simonaro et al., 2001). Numerosos trabalhos tem mostrado um aumento da atividade de MMPs e outras proteases, como as catepsinas, nas MPS (Baldo et al., 2011, 2017; Gonzalez et al., 2018; Ma et al., 2008; Metcalf et al., 2010). Como mencionado anteriormente, o aumento na atividade dessas proteases pode resultar na degradação de colágeno e/ou fibras de elastina e afetar às propriedades biomecânicas de complacência e elastância dos tecidos cardiovasculares. Dessa forma, reduzem drasticamente a sua performance. Recentemente, o nosso grupo tem mostrado que particularmente a catepsina B está envolvida na progressão das alterações cardiovasculares (Baldo et al., 2017; Gonzalez et al., 2018). No entanto,



outros processos e/ou cascatas de sinalização também podem estar afetados e contribuir na progressão das doenças cardiovasculares (Gonzalez et al., 2018) .

Muitas das alterações patológicas presentes nas MPS são morfológicamente similares com outras manifestações cardiovasculares observadas em diversas doenças. Embora as causas primárias dessas doenças possam ser diferentes, elas podem compartilhar eventos celulares, bioquímicos e moleculares que coletivamente modificam a estrutura e função dos tecidos cardiovasculares (Kehat and Molkentin 2010). Por exemplo, a MFS é caracterizada pelo aumento da fragmentação de fibras de elastina e conseqüentemente a dilatação da aorta (morfológicamente similar ao processo observado nas MPS). Essas alterações na MFS estão associadas ao aumento na sinalização de TFG- $\beta$  através da sinalização “não canônica” via ERK1/2 (Brooke et al. 2008; Habashi et al. 2011; Holm et al. 2011). Já na MPS I, embora os mecanismos fisiopatológicos não sejam completamente conhecidos, o aumento na sinalização de TFG- $\beta$ 1 foi descrito em aorta de camundongos (Ma et al. 2008), em lesões vasculares de cachorros (Lyons et al. 2011) assim como em lesões coronárias e cardíacas de pacientes com esta doença (Yano et al. 2009, 2012). Ma et al., (2008), observaram um incremento na via de sinalização da STAT 1/3 (via ativada por citocinas como a IL-6) e nas MAPK (particularmente ERK1/2) na aorta de camundongos MPS I. Recentemente, De Pasquale et al., (2018) demonstraram inclusive que a fosforilação de ERK1/2, induzida pela ativação de EGFR, é essencial para o desenvolvimento do fenótipo hipertrófico e o defeito lisossômico em cardiomiócitos, com o gene NAGLU silenciado (modelo celular para MPS IIIB).

### **5.2.3. Estratégias farmacológicas para o manejo das alterações cardiovasculares**

Atualmente as terapias disponíveis para MPS I (transplante de células-tronco hematopoiéticas e a terapia de reposição enzimática) têm melhorado muitas das manifestações clínicas observadas neste grupo de pacientes. Embora ambos tratamentos melhorem a qualidade e a expectativa de vida dos pacientes com MPS I, existem diversas limitações em relação aos custos, administração e principalmente na

eficácia em determinados tecidos, principalmente nas valvas e aorta. Isto tem levado à busca de novos alvos terapêuticos.

Como visto previamente, os receptores GPCR tem um papel fundamental nas doenças cardiovasculares. Vários medicamentos têm sido utilizados para bloquear os mecanismos de sinalização das GPCR e dessa forma reduzir ou prevenir o remodelamento cardíaco em pacientes com alterações na função cardíaca. Entre estes incluem-se os inibidores da enzima conversora da angiotensina ou inibidores da ECA, os bloqueadores do receptor AT1 (BRAs) e os beta bloqueadores (Gupta et al. 2007; Azevedo et al. 2016).

Os mecanismos de ação dos BRAs e os inibidores da ECA estão relacionados à sinalização do RAS. Os inibidores da ECA previnem a conversão de Ang I em Ang II e dessa forma diminuem a pressão sanguínea através da dilatação dos vasos sanguíneos. No entanto, outras enzimas (ex. catepsinas e quinases cardíacas) também são capazes de promover a conversão de Ang I em Ang II, limitando o efeito dos inibidores da ECA (Gupta et al. 2007). Em contrapartida, os bloqueadores de AT1 representam uma boa alternativa aos inibidores da ECA para o tratamento de hipertensão e a insuficiência cardíaca (Gupta et al. 2007). O losartan é um medicamento que bloqueia seletivamente o receptor AT1 prevenindo os efeitos da sinalização da Ang II. No MFS, o bloqueio de AT1 tem demonstrado ser eficaz em prevenir ou reduzir as anormalidades cardiovasculares ocasionadas pelo aumento da sinalização de TGF- $\beta$  (Brooke et al., 2008; Habashi et al., 2006; Kalluri & Han, 2008; Lindsay & Dietz, 2011). Esse bloqueio induz uma diminuição clínica relevante da via TGF- $\beta$  através da diminuição dos níveis no plasma de TGF- $\beta$ , seus mediadores intracelulares e seus genes alvo (Brooke et al. 2008). Em camundongos com Síndrome de Marfan (MSF), o losartan mostrou uma melhora inclusive em algumas das manifestações não cardiovasculares (Lacro et al. 2007). Adicionalmente, o bloqueio seletivo de AT1 atua na sinalização Ang II/AT2 e induz o aumento da expressão de ACE2, resultando na transformação da Ang II em Ang 1-7 e potenciando o efeito cardioprotetor da via Ang 1-7/MAS (Brooke et al. 2008; Xu et al. 2009). Na MFS o losartan reduz a fosforilação do ERK1-2 através da inibição da ativação de ERK mediada pelo receptor AT1 e pelo desvio da sinalização Ang II/AT2 (Habashi et al., 2011).

Já os beta bloqueadores, como o propranolol, são uma classe de medicamentos utilizados para diminuir os efeitos da ativação dos receptores beta adrenérgicos (Gupta et al. 2007). O tratamento com beta bloqueadores são comumente utilizados para tratar condições como hipertensão, arritmias e insuficiência cardíaca congestiva associadas com o incremento excessivo na atividade do sistema simpático (Clarke et al. 2010; Gregor and Čurila 2015). O mecanismo benéfico dos betas bloqueadores está relacionado à melhora da função diastólica prolongando a diástole e induzindo uma remodelação benéfica que resulta em uma cavidade ventricular esquerda maior e um melhor volume sistólico (Ostman-Smith 2014). Estes medicamentos também foram usados para o tratamento de pequenos aneurismas aórticos (Lacro et al. 2007; Chun et al. 2013). Alguns estudos em pacientes com MFS evidenciaram que os beta bloqueadores retardam a taxa de dilatação ou crescimento da aorta (Salim et al. 1994; Chun et al. 2013; Koo et al. 2017). O raciocínio teórico por trás do uso de beta bloqueadores é que esses medicamentos diminuem a frequência cardíaca e pressão arterial, o que reduz o estresse na aorta que pode romper o aneurisma. No entanto, as evidências científicas não são convincentes (Chun et al. 2013; Koo et al. 2017) e indicam que o tratamento com beta bloqueadores falha em reduzir consistentemente o crescimento do aneurisma aórtico em pacientes com ou sem MFS (Chun et al. 2013). Por outro lado, bloqueadores do receptor AT1 (BRAs) como o losartan conferem uma proteção superior em comparação aos beta bloqueadores não apenas pela redução da pressão sanguínea – um efeito desejável em pacientes com aneurisma aórtico – mas também pelo antagonismo de TGF- $\beta$  (Habashi et al. 2006; Lacro et al. 2007; Brooke et al. 2008; Matt et al. 2008)

Como temos visto, diversas proteínas ativadas, direta ou indiretamente, por receptores GPCR estão alteradas em tecidos cardiovasculares na MPS I. Apesar desta observação e das manifestações clínicas observadas nas MPS, o papel dos receptores GPCR ainda não foi avaliado. Portanto, uma abordagem farmacológica utilizando losartan e propranolol poderia colaborar na elucidação do papel dos receptores GPCR e das vias de sinalização na doença cardiovascular na MPS I. Adicionalmente, os resultados deste estudo poderiam trazer um benefício potencial para o manejo das alterações cardiovasculares neste grupo de pacientes.

## **OBJETIVOS**

---

## **OBJETIVO GERAL**

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar o efeito do losartan ou propranolol sobre a doença cardiovascular em camundongos com Mucopolissacaridose tipo I (MPS I).

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Comparar dimensões e função cardíaca utilizando técnicas ecocardiográficas em animais MPS I tratados com losartan ou propranolol e controles;
- Comparar as alterações cardiovasculares presentes na válvula (espessura) e na aorta (diâmetro e quebras na estrutura da elastina) nos quatro grupos experimentais (Normal, MPS I, MPS I + losartan; MPS I + propranolol);
- Quantificar por HPLC os níveis de Angiotensina circulantes e por Western Blot os níveis de proteínas *downstream* associadas a GPCR nos quatro grupos descritos acima;
- Avaliar a atividade das principais proteases (catepsinas e metaloproteinases) envolvidas no desenvolvimento da doença cardíaca na MPS I, em amostras de animais normais, MPS I e animais tratados com losartan ou propranolol.

## **RESULTADOS**

---

Os resultados da presente tese serão apresentados no formato de 2 artigos científicos.

*Artigo científico 1* - Losartan improves aortic dilatation and cardiovascular disease in Mucopolysaccharidosis I. J Inherit Metab Dis. 2017 May;40(3):311-312. DOI: 10.1007/s10545-017-0014-x.

*Artigo científico 2* - Cardiac pathology in Mucopolysaccharidosis I mice: Losartan modifies ERK1/2 activation during cardiac remodeling. DOI: 10.1002/jimd.12327.

## **ARTIGO CIENTÍFICO 1**

Losartan improves aortic dilatation and cardiovascular disease in  
Mucopolysaccharidosis I

---



## Losartan improves aortic dilatation and cardiovascular disease in mucopolysaccharidosis I

Esteban Alberto Gonzalez<sup>1,2</sup> · Angela Maria Vicente Tavares<sup>1,3,4</sup> · Edina Poletto<sup>1,2</sup> · Roberto Giugliani<sup>2,5</sup> · Ursula Matte<sup>1,2</sup> · Guilherme Baldo<sup>1,2,3</sup>

Received: 8 November 2016 / Revised: 2 January 2017 / Accepted: 5 January 2017  
© SSIEM 2017

To the Editor,

We read with great interest the manuscript titled “Angiotensin receptor blockade mediated amelioration of mucopolysaccharidosis type I cardiac and craniofacial pathology” recently published in the *Journal of Inherited Metabolic Disorders* (Osborn et al., 2016). Simultaneously, we have been conducting a similar study, with results that are partially in accordance, and we thus have some additional important considerations concerning the content of their paper.

We treated juvenile (8-week-old) *Idua*<sup>-/-</sup> mice with losartan or other antihypertensive drug (propranolol) as an additional control (Suppl. Material and Methods) to determine the benefit of angiotensin receptor blockade (ARB) in mucopolysaccharidosis I (MPS I) and if this effect was specific to losartan. Mice were sacrificed at 6 months of age.

Our data showed an increase in aortic diameter measured by a digital caliper in untreated *Idua*<sup>-/-</sup> mice

without significant gender differences (Suppl. Fig. 1). Treatment analysis was performed according to gender and without differentiation (Suppl. Fig. 2). Unlike Osborn et al.’s results, our data indicate that losartan is effective in decreasing aortic dilatation in MPS I at a similar rate for both genders (~20%). As a comparison, we also treated female mice with propranolol (a beta-blocker), which was not able to reduce aortic dilatation.

In agreement with Osborn et al., our echocardiographic analysis showed that losartan also improves ventricular contraction, expressed through left ventricular fraction shortening (LVSF) and suggesting an improved heart-pumping ability. It also prevented enlargement of left ventricular chamber dimensions (Suppl. Table 1). However, it is important to point out that propranolol also improved cardiac function, which suggests that heart dysfunction may be independent from angiotensin receptor (AT-1R) activation. Propranolol might have its beneficial effect by reducing hemodynamic stress on the aortic vasculature. In contrast, we believe that losartan targets the underlying pathophysiology in MPS possibly by antagonism of transforming growth factor (TGF)- $\beta$  or other pathways, which will be investigated. Aortic diameter was also measured by echo, which confirmed that only losartan prevented abnormalities in the aorta.

The authors highlight the possibility that matrix metalloproteinase-12 (MMP-12) increase via AT-1R activation is one of the mechanisms involved in the pathogenesis of cardiovascular disease in MPS. Nonetheless, in a previous study, MPS I and VII mice developed aortic dilatation by similar mechanisms, and knocking out MMP-12 in MPS VII mice did not prevent aortic abnormalities (Baldo et al. 2011). This probably suggests that multiple mechanisms and genes are responsible for this effect.

---

Communicated by: Carla E. Hollak

---

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s10545-017-0014-x) contains supplementary material, which is available to authorized users.

---

✉ Ursula Matte  
umatte@hcpa.edu.br

<sup>1</sup> Gene Therapy Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Ramiro Barcelos, 2350, 90035-903 Porto Alegre, Brazil

<sup>2</sup> Postgraduate Program in Genetics and Molecular Biology, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

<sup>3</sup> Postgraduate Program in Physiology-UFRGS, Porto Alegre, Brazil

<sup>4</sup> Ritter dos Reis University Center-UniRitter, Porto Alegre, Brazil

<sup>5</sup> Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

The data we present here, complementary to that reported by Osborn et al. (2016), represents evidence that, effectively, ARB therapy with losartan prevents aortic dilatation in MPS I mice. This is especially important, since therapies seem to have a limited effect on this organ (Baldo et al., 2011), and it potentially could be administered in patients under enzyme replacement therapy. Although losartan has not been used in MPS patients, its chronic use has been safely reported in young pediatric patients.

#### Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** Esteban Alberto Gonzalez, Angela Maria Vicente Tavares, Edina Poletto, Roberto Giugliani, Ursula Matte, and Guilherme Baldo declare that they have no conflict of interest.

**Animal rights** All institutional and national guidelines for the care and use of laboratory animals were followed.

#### References

- Baldo G, Wu S, Howe RA, Ramamoorthy M, Knutsen RH, Fang J, Mecham RP, Liu Y, Wu X, Atkinson JP et al (2011) Pathogenesis of aortic dilatation in mucopolysaccharidosis VII mice may involve complement activation. *Mol Genet Metab* 104:608–19. doi:10.1016/j.ymgme.2011.08.018
- Osborn MJ, Webber BR, McElmurry RT, Rudser KD, DeFeo AP, Muradian M, Petryk A, Hallgrímsson B, Blazar BR, Tolar J et al (2016) Angiotensin receptor blockade mediated amelioration of mucopolysaccharidosis type I cardiac and craniofacial pathology. *J Inherit Metab Dis*. doi:10.1007/s10545-016-9988-z

## Supplementary materials and methods

### Animals

All animal experiments were approved by the authors' institutional review board (#15-0322). Wild-type (WT) and *Idua*<sup>-/-</sup> (MPS I) mice (kindly donated by Elizabeth Neufeld from UCLA) on a C57BL/6 background were used. Animals were assigned to the following groups: Groups I and II consisted of *Idua*<sup>-/-</sup> and WT mice without treatment (n=6 each male/female MPS I mice; n=6 each male/female WT mice). Group III consisted of *Idua*<sup>-/-</sup> mice treated from 8 weeks of age that received ARB treatment with losartan (n=6 each male/female MPS I mice). Group IV consisted of *Idua*<sup>-/-</sup> mice treated from 8 weeks of age treated with propranolol (n=5 female MPS I mice). All animals underwent a single ultrasound examination at 6 months of age and subsequently were euthanized.

### Treatment

Losartan potassium (50mg/tablet, Prati Donaduzzi, Brazil) or propranolol hydrochloride tablets (80mg/tablet, NeoQuimica, Brazil) were processed and dissolved in drinking water at a dose of 0.6 g/L or 0.5g/L, respectively. The water was changed twice a week. Both treatments began at two months of age.

### Aortic measures

Aortic measurements were performed by 2 methods: using echo data (described below) and using a digital caliper *in situ* at the moment of death. Digital caliper results were confirmatory of the observations found in echo images. The measurement of the diameter from ascending aortas was performed *in situ* using a digital caliper (with a 0.01 mm precision) under magnifying glass by a blinded single experienced user immediately after euthanasia at 6 months.

## Cardiac ultrasound

Transthoracic echocardiography examination was performed on anesthetized mice (2% isoflurane) and placed in left lateral decubitus position to obtain cardiac images. Images were captured by a trained user in mouse echocardiography using EnVisor HD System, Philips Medical (Andover, MA, USA), with a 12–4 MHz transducer at 2 cm depth with fundamental and harmonic imaging. Left ventricular (LV) dimensions from diastolic and systolic transverse areas (cm<sup>2</sup>) were obtained by tracing the endocardial border at three levels: basal (at the tip of the mitral valve leaflets), middle (at the papillary muscle level) and apical (distal from the papillary muscle but before the final curve cavity). Likewise, the left ventricular chamber diameter in diastole (DD) and systole (SD) were measured using the M-Mode, at three planes. Final value for each animal was obtained by taking the average of all three planes. The assessment of LV systolic function was performed using the following equation: LV fraction shortening (LVFS) = (diastolic diameter – systolic diameter) / diastolic diameter × 100.

To measure the aortic diameter, we used the transthoracic echocardiography which provides a view of the proximal ascending aorta and a small portion of the descending aorta behind the left atrium. The measurement was obtained from the segment between the sinotubular junction and the ascending tubular aorta. Typically, the proximal aorta can be seen in its long and short axis from the parasternal view. We used the parasternal long-axis view of the heart with superior angulation that emphasizes visualization of the ascending aorta.

## Statistical analysis

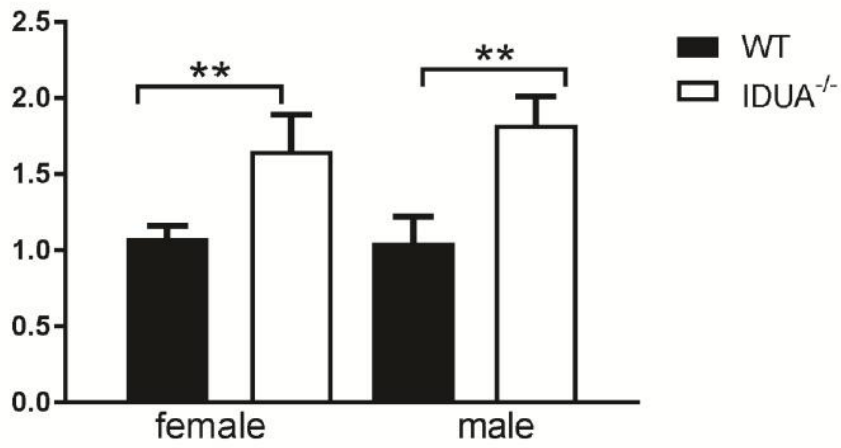
One way ANOVA and Tukey's Post Hoc were performed to evaluate the significance between groups with  $p < 0.05$  considered statistically significant.

Suppl. Table 1: Results from echocardiographic analysis at 6 months.

Parameters	WT (n=12)	<i>Idua</i> <sup>-/-</sup> (n=12)	<i>Idua</i> <sup>-/-</sup> Losartan (n=11)	<i>Idua</i> <sup>-/-</sup> Propranolol (n=5)
LVSF (%)	36.7 ± 5.1	27.6 ± 3.6 <sup>A</sup>	34.8 ± 5.7 <sup>B</sup>	32.7 ± 5.3 <sup>B</sup>
SD (cm)	0.24 ± 0.052	0.31 ± 0.042 <sup>A</sup>	0.24 ± 0.003 <sup>B</sup>	0.23 ± 0.026 <sup>B</sup>
DD (cm)	0.37 ± 0.059	0.43 ± 0.042 <sup>A</sup>	0.36 ± 0.028 <sup>B</sup>	0.34 ± 0.022 <sup>B</sup>
Aortic diameter (cm)	0.13 ± 0.009	0.15 ± 0.013 <sup>A</sup>	0.12 ± 0.011 <sup>B</sup>	0.15 ± 0.008 <sup>A</sup>

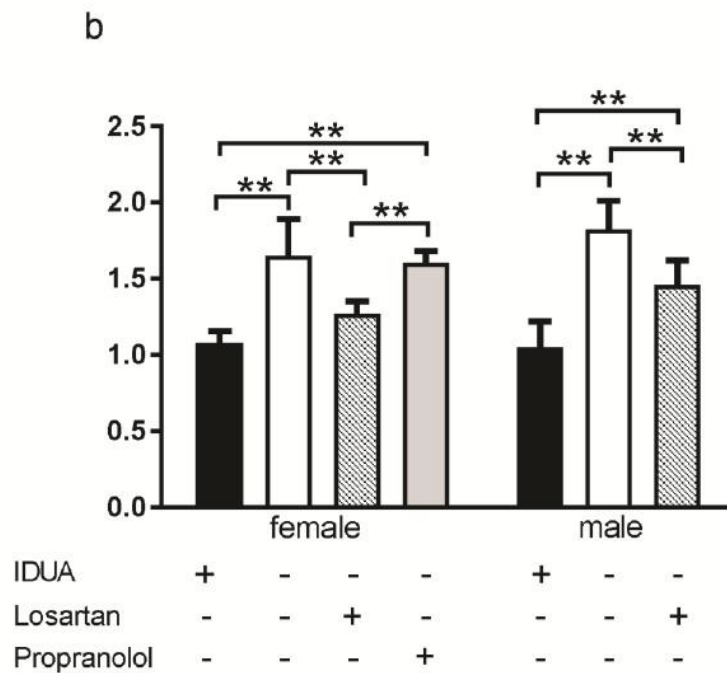
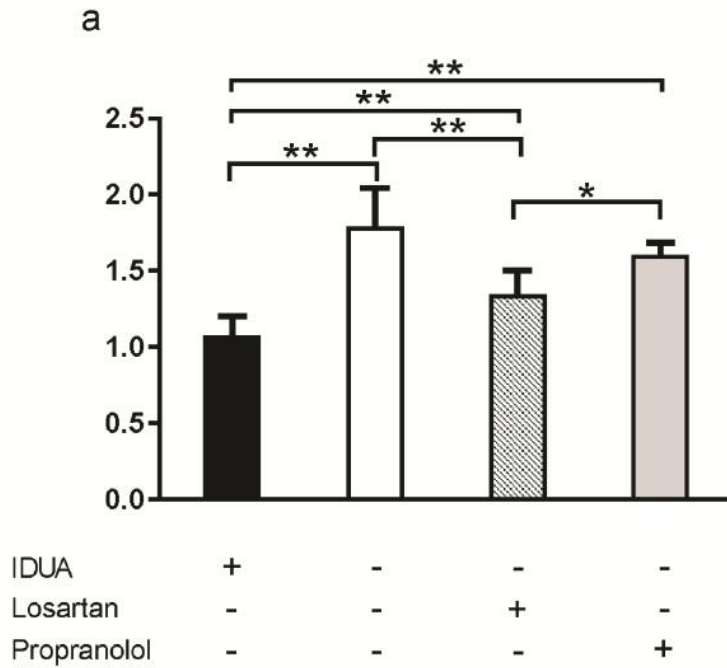
Legend: LVSF – left ventricular shortening fraction; SD – systolic diameter; DD- diastolic diameter; WT- wild type. <sup>A</sup> represent  $p \leq 0.05$  respect to WT and <sup>B</sup> represent  $p \leq 0.05$  respect to *Idua*<sup>-/-</sup>.

Suppl. Fig. 1: Ascending aorta diameter in untreated animals at 6 months. Measures were performed with a digital caliper and are presented in mm. \*\*  $p \leq 0.01$ , Student's t test.





Suppl. Fig. 2: Ascending aorta diameter measured with digital caliper at 6 months. **a.** Diameter analysis for all animals. **b.** Data analysis according to gender. Values are presented in mm. \*  $p \leq 0.05$  and \*\* represent  $p \leq 0.01$ .



## **ARTIGO CIENTÍFICO 2**

Cardiac pathology in Mucopolysaccharidosis I mice: Losartan modifies  
ERK1/2 activation during cardiac remodeling

---





**Cardiac pathology in Mucopolysaccharidosis I mice:  
Losartan modifies ERK1/2 activation during cardiac remodeling**

Esteban Alberto Gonzalez<sup>1,2</sup>, Santiago Alonso Tobar Leitão<sup>3,4</sup>, Douglas dos Santos Soares<sup>3,4</sup>, Angela Maria Vicente Tavares<sup>2</sup>, Roberto Giugliani<sup>1,2,5</sup>, Guilherme Baldo<sup>1,2,5</sup>, Ursula Matte<sup>1,2,5</sup>

1. Postgraduate Program in Genetic and Molecular Biology, UFRGS, Porto Alegre, Brazil.
2. Cells, Tissues, and Genes Laboratory, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.
3. Cardiovascular Research Laboratory, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.
4. Postgraduate Program in Health Science: Cardiology and Cardiovascular Science, UFRGS, Porto Alegre, Brazil.
5. Department of Genetics, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

Corresponding author:

Guilherme Baldo

Centro de Pesquisa Experimental - HCPA

Ramiro Barcelos, 2350

91201-903

Porto Alegre, RS, Brazil

Email: [gbaldo@hcpa.edu.br](mailto:gbaldo@hcpa.edu.br)

Word count for the text: **4302**

Word count for the summary: **211**

Number of tables: **1**

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: 10.1002/jimd.12327

Number of figures: 5

**Number of supplementary tables: 1**

**Number of supplementary figures: 3**

Accepted Article

## **Abstract**

Mucopolysaccharidosis type I (MPS I) is a lysosomal storage disorder caused by mutations in the *IDUA* gene, that codifies the alpha-L-iduronidase enzyme, which deficiency leads to storage of glycosaminoglycans, with multiple clinical manifestations. One of the leading causes of death in MPS I patients are cardiac complications such as cardiac valve thickening, conduction abnormalities, myocardial dysfunction, and cardiac hypertrophy. The mechanism leading to cardiac dysfunction in MPS I is not entirely understood. In a previous study, we have demonstrated that losartan and propranolol improved the cardiac function in MPS I mice. Thus, we aimed to investigate whether the pathways influenced by these drugs may modulate the cardiac remodeling process in MPS I mice. According to our previous observation, losartan and propranolol restore the heart function, without altering valve thickness. MPS I mice presented reduced activation of AKT and ERK1/2, increased activity of cathepsins, but no alteration in metalloproteinase activity was observed. Animals treated with losartan showed a reduction in cathepsin activity and restored ERK1/2 activation. While both losartan and propranolol improved heart function, no mechanistic evidence was found for propranolol so far. Our results suggest that losartan or propranolol could be used to ameliorate the cardiac disease in MPS I and could be considered as adjuvant treatment candidates for therapy optimization.

## **Synopsis**

Alteration in downstream signals to G protein-coupled receptors, AT1 or  $\beta$ -AR, could mediate the pathological cardiac remodeling in MPS I mice, which can be ameliorated with losartan or propranolol, respectively.

## **Compliance with Ethics Guidelines**

### **Corresponding author**

Guilherme Baldo

### **Conflict of Interest**

The authors have no potential conflicts of interest to disclose related to this article.

### **Details of the contribution of individual authors**

EAG, SATL, GB and UM were responsible for the experimental design. All authors took part in performing experiments and editing the manuscript. All authors have reviewed and approved the article.

### **Details of ethics approval**

The study protocols were approved by the Ethics Committee on Animal Use of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CEUA/HCPA) and registered under the numbers #15-0322 and #17-0590.

### **Details of funding**

This study was supported by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES), FAPERGS and and FIFE—Hospital de Clínicas de Porto Alegre (grant number 15-0322 and 17-0590).

**Keywords:** Mucopolysaccharidosis type I; cardiac remodeling; losartan; propranolol; cardiac disease; ERK1/2; AKT



## 1. INTRODUCTION

Mucopolysaccharidosis type I (MPS I) is a lysosomal storage disorder caused by mutations in the *IDUA* gene, leading to the deficiency of the lysosomal hydrolase alpha-L-iduronidase (IDUA, EC 3.2.1.76), which is involved in the catabolism of the glycosaminoglycans (GAGs) heparan and dermatan sulfate. GAG storage is progressive and results in a subsequent multi-organ dysfunction.<sup>1,2</sup> Due to high variability, patients may present a phenotypic spectrum, from an attenuated to a severe form of the disease.<sup>3</sup> The most common clinical phenotype in MPS I includes characteristic facial features, corneal clouding, hepatosplenomegaly, respiratory problems, cardiopathy, and some degree of dysostosis multiplex and cognitive impairment.<sup>3,4</sup>

The most common cardiovascular manifestations in MPS I patients are aortic dilatation, valvulopathy, and cardiac remodeling. This latter process is characterized by progressive changes in the cardiac shape and structure, leading to heart dysfunction,<sup>5,6</sup> and plays a crucial role in the development and progression of cardiomyopathy. Typically, MPS I patients die due to congestive heart failure.<sup>7</sup>

Several studies have demonstrated that the MPS I murine model develops a progressive heart dilatation with decreased myocardial contractility, valve thickening, as well as regurgitation.<sup>8</sup> In addition, vascular involvement with aortic root dilatation was observed in mice and patients.<sup>9,10</sup>

Classically, the G protein-coupled receptors (GPCR) play a crucial role in the cardiac remodeling progression to heart failure,<sup>11-13</sup> either by angiotensin II peptide (Ang II) binding to angiotensin-II type I receptor (AT1R) or the activation of  $\beta$ -adrenergic receptors ( $\beta$ -AR). The activation of the G protein triggers oxidative stress and hypertrophy response, through several secondary messengers such as PI3K (p110 $\gamma$ ), and mitogen-activated protein kinase (MAPKs). Other protein kinases and calcineurin have also been involved in the pathological cardiac hypertrophy of several conditions.<sup>14,15</sup> However, the mechanism involved in MPS I cardiac dysfunction is not entirely understood.

It is well-known that glycosaminoglycans play an essential role in matrix remodeling, especially in cardiac hypertrophy.<sup>5</sup> Therefore, the accumulation of GAG at abnormal levels within lysosomes,

cell surface and in the extracellular matrix (ECM) triggers a complex pathogenic event which contributes to cardiac damage.<sup>1,7</sup>

Besides the structural abnormalities, GAG accumulation can also trigger an inflammatory process. It leads to increased levels of cytokines, chemokines and complement activation, resulting in up-regulation of several proteases involved in ECM degradation, which in turns contributes to the cardiac remodeling.<sup>7,9,16,17</sup>

We previously reported<sup>18</sup> that, although both drugs have different mechanisms and trigger distinct intracellular signal transduction cascades, treatment with the anti-remodeling drugs losartan and propranolol results in anatomical and functional cardiac improvements in MPS I mice. To better understand the molecular mechanism behind these treatments in the setting of MPS I cardiac remodeling, we now explore the signaling pathways involved in this process.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Animals, treatments and sample size**

Wild-type littermates (WT; *Idua*<sup>+/-</sup> and *Idua*<sup>+/+</sup>) and MPS I (*Idua*<sup>-/-</sup>, kindly donated by Elizabeth Neufeld from UCLA) mice of both genders in a C57BL/6 background were used in this study. A description of the study design has been published previously.<sup>18</sup> It consisted of two control groups, wild-type (WT) animals and MPS I mice without treatments; and two groups of treated MPS I mice: one was treated with 0.6g/L of the angiotensin receptor blockade losartan (50mg/tablet, Prati Donaduzzi, Brazil) and the other one with 0.5 g/L of the beta-adrenergic blocker propranolol (80mg/tablet, NeoQuimica, Brazil) in drinking water from 2 months-old. Water was changed every 3 days and the volume of water consumed was recorded to estimate dose of the drug. At 6 months old, animals were subjected to echocardiography and subsequently euthanized. For echocardiographic analyses we used animal data previously published from our group<sup>8,18</sup>, however, here we analyzed other parameters and new treated animals were added to complement this work. For biochemical and histological analyzes the number of animals used in each assay depends on the

sample availability and technical limitations (such as the inability of finding the aortic valve in all histological sections) and it is detailed in each figure. The sample size available for each assay is also summarized in the **Suppl. Table 1**. The study protocols were approved by the Ethics Committee on Animal Use of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CEUA/HCPA) and registered under the numbers #15-0322 and #17-0590.

## 2.2 Echocardiography

Transthoracic echocardiography examination was performed on an EnVisor HD System, Philips Medical (Andover, MA, USA), with a 12–4 MHz linear transducer at 2-3 cm depth with fundamental imaging. Animals were anesthetized (2% isoflurane) and placed in the left lateral decubitus position to capture cardiac images. All analyses were performed by a trained operator blinded for experimental groups. Left ventricular (LV) dimensions from diastolic and systolic transverse areas (cm<sup>2</sup>) were obtained by tracing the endocardial border at three levels: basal (at the tip of the mitral valve leaflets), middle (at the papillary muscle level) and apical (distal from the papillary muscle but before the final curve cavity). Likewise, LV internal dimensions (LVID), posterior wall thickness (PWT), and anterior wall thickness (AWT) at diastole (d) and systole (s) were measured from M-mode images at three planes. The final value for each animal was obtained by taking the average of all three planes. The assessment of LV global systolic function was calculated by the following formulas.<sup>19</sup>

$$\text{LVEF (\%)} = 100 \times [(\text{LVIDd}^3 - \text{LVIDs}^3) / \text{LVIDd}^3]$$

$$\text{LVFS (\%)} = 100 \times [(\text{LVIDd} - \text{LVIDs}) / \text{LVIDd}]$$

LVEF - Left Ventricular Ejection Fraction

LVFS - Left Ventricular Fractional Shortening

LV mass was calculated using a standard cube formula, which assumes a spherical LV



geometry according to the following formula.<sup>20</sup>

$$\text{LV mass} = 1.04 \times [(\text{LVIDd} + \text{AWTd} + \text{PWTd})^3 - \text{LVIDd}^3]$$

### 2.3 Histological analysis

Thirty-one hearts (WT= 11, MPS I= 7, Losartan=9, Propranolol= 4) were removed, and the basal portion was fixed in 10% neutral buffered formalin, processed and embedded in paraffin according to our institutional routine. Thin sections of heart valves were stained with Hematoxylin-Eosin & Alcian Blue to visualize general structure and GAG storage. The thickness of the heart valves from left ventricular sections was measured using Cell<sup>^</sup>F imaging systems software (Olympus, Europe), taking at least 8 measures to calculate the average.<sup>21</sup> Additionally, heart sections at the middle level were stained with picosirius red to determine collagen deposition.

### 2.4 Angiotensin Quantification

Blood samples from euthanized animals were withdrawn and centrifuged (4.629 g, 4°C, 10 min) to collect serum. The serum was filtered in a C<sub>18</sub> classic cartridge (Waters, USA), previously activated sequentially by methanol (5 mL), tetrahydrofuran (5 mL), hexane (5 mL), methanol (5 mL), and water (10 mL). Serum samples were then loaded into the columns (100-500 µL of the sample), washed with water, and eluted with ethanol/acetic acid/water at a 90%/4%/6% ratio. The eluted fractions were dried under a nitrogen flow and resuspended in 50-250 µL (50% of the starting sample volume) with mobile phase A (0.1% orthophosphoric acid, pH 3.00 with 5% acetonitrile) and filtered in a 0.22 µm centrifuge filters (Sigma-Aldrich, USA - CLS8160) at 13.000g, 4°C, for 20 min previous to the HPLC analyses (Shimadzu System, Japan).

Angiotensin peptides of each sample (35 µL of the injected sample) were separated on a C18 reversed-phase ODS Aquapor 300 column (beads diameter of 7 µm, 250 mm height, and 4.6 mm diameter, PerkinElmer's Browlee Columns, USA). The peptides were analyzed in gradient ranging from 5 to 35% of mobile phase B (100% acetonitrile) in 0.1% phosphoric acid pH 3.0 (phase A) at a 1.5 mL.min<sup>-1</sup> flow for 80 minutes. Comparisons identified the angiotensin peptides to the retention



time of standard angiotensins (Ang I – H-1680.0025; Ang II – 1705.0025; Ang 1-7 – 1715.0025 – Bachem, USA). Results were expressed as nmol/mL of serum.

## 2.5 Western blot assay

Forty heart samples (from medial/apical portion; WT= 13, MPS I= 11, Losartan= 11, Propranolol= 5) were weighed and homogenized (1:9) in 50 mM Tris/HCl buffer pH 7.5, containing 1% Triton X-100, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), 5 mM sodium fluoride, 1 mM sodium orthovanadate, SigmaFast protease inhibitor cocktail (1 tablet/100 mL – Sigma Aldrich, USA), phosphatase inhibitor cocktail 3 (Sigma Aldrich, USA - P0044) and then centrifuged (10.000xg, 4°C, 20 min). The supernatants were collected, and protein concentrations were determined by the Bradford method.<sup>22</sup> Samples were then diluted in 0.1 M Tris, pH 6.8, to achieve final protein concentrations of 4 µg/µL in Laemmli buffer (250 mM Tris, 8% SDS, 40% glycerol, 0.008% bromophenol blue, pH 6.8 and 20% β-mercaptoethanol) and heated to 70°C for 10 min. A total of 50 µg of protein were loaded on SDS-PAGE (10 or 12%) gels and run for 60 min at 50V and then for 90 min at 120V. The proteins in the gel were transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Millipore Corporation Inc., Billerica, MA, USA) using a transfer buffer (48 mM Tris, pH 9-9.3, 39 mM glycine, 10% methanol) on a semi-dry system (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA) for 50 min at 210 mA. The membranes were stained with Coomassie Blue, and the molecular weights of the proteins were determined by comparison to standard molecular weights (Bio-Rad Laboratories Inc., USA - #1610374).

The membranes were blocked for 2 hours with 5% non-fat milk or 5% BSA (according to antibodies manufacturer's) in TTBS buffer (100 ml TBS 10x, 0.1% Tween 20, 800mL deionized water) followed by overnight incubation at 4 °C with the primary antibody diluted in TTBS buffer with 5% non-fat milk or 5% BSA. Primary antibodies used were: AT1R (1:400; Abcam, USA - #ab18801), phospho-smad2(Ser465/467)/smad3(Ser423/425) (1:750; Cell Signaling Technology, USA - #8828); MMP-2 (1:200; Abbiotec, USA - #250752); MMP-9 (1:200; Abbiotec, USA - #250755); ERK1/2 (1:5000; Thermo Fisher Scientific, USA - #61-7400); phospho-p44/42 MAPK(p-ERK1/2) (Thr202/Tyr204) (1:1000; Cell Signaling Technology, USA - #4370); AKT (1:1000; Sigma-Aldrich, USA - #SAB4500803); phospho-AKT (pThr308) (1:1000; Sigma-Aldrich,

USA - #SAB4504332) TGF-beta 1 (1:200; Abbiotec, USA - #250876). After incubation, the membranes were washed 3 times with TTBS and incubated with anti-rabbit (IgG) secondary goat antibody conjugated to horseradish peroxidase (1:1000; Cell Signaling Technology, USA - #7074). Chemiluminescent detection was performed using the Clarity™ Western ECL Substrate or ClarityMax™ (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA - #170-5061; #170-5062) and the membranes were then exposed to a digital image acquisition system (L-Pix Chemi Molecular Imaging, Loccus Biotecnologia, Brazil). The densitometry of the protein bands was quantified using the ImageJ software. Results were expressed as percentage of change from baseline in arbitrary units (%A.U.) using the receptor densitometry-to-coomassie blue densitometry ratio.<sup>23-26</sup>

## 2.6 Cathepsins and Matrix Metalloproteinases activities

Twenty-three heart samples (from medial/apical portion; WT= 6, MPS I= 6, Losartan= 6, Propranolol= 5) were homogenized (0.2 mg/μL) in acetate buffer (100mM sodium acetate, 0.1% TritonX, EDTA 2.5 Mm, DTT 2.5 mM pH 7.4) for cathepsin assays. For the cathepsin B activity, 5 μL of the sample was incubated with 95 μL of assay buffer containing the specific substrate Z-Arg-Arg-AMC 50 μM (Enzo Life Sciences, USA - #BML-P137) in a microtiter plate at 37°C. Fluorescence was recorded using Spectramax M3 every 5 min for 30 min at an excitation wavelength of 355 nm and an emission wavelength of 460 nm. The increase in fluorescence intensity was proportional to the substrate hydrolysis, and then the total substrate consumption was calculated by comparison to the standard fluorescence of 7-amino-4-methylcoumarin (AMC), accordingly to manufacturer's instructions.

Total cathepsin activity was measured using the Z-Phe-Arg substrate (Anaspec, USA - #AS-24096) at a final concentration of 10 μM with the same buffer and parameters used for the cathepsin B assay.

For MMP assay, the same heart samples were homogenized (0.2mg/μl) in 50 mM Tris-HCL (pH 7.4), containing 150 mM NaCl<sub>2</sub>, 0.1 mM ZnCl<sub>2</sub>, 0.025% (v/v) Brij35, 0.1% (w/v) PEG6000. Total MMP activity was determined with the total-MMP fluorogenic substrate (5 μM): Mca-Lys-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH<sub>2</sub> (Enzo Life Sciences, USA - #BML-P276). The reaction was performed in a microtiter plate by adding 5 μL of sample to 195 μL of assay buffer containing substrate. The



fluorescence intensity was recorded every 5 minutes for 30 minutes at 328 nm (excitation) and 400 nm (emission) at room temperature.<sup>27,28</sup> The MMP activity was measured as the change in relative fluorescence compared to OmniMMP™ fluorogenic control peptide Mca-Pro-Leu-OH (Enzo Life Sciences, USA - #BML-P127).

All enzymatic activities were expressed as nmol/h/mg of protein, and the protein content of each sample was measured by the Lowry method.

## **2.7 Statistical analysis**

Data were expressed as mean ± standard deviation (SD). The normality test was calculated using the D'Agostino-Pearson omnibus and the Shapiro-Wilk normality test. Outliers were identified and removed using the ROUT method (with Q set to 1%). Statistical comparisons among multiple groups were calculated using one-way ANOVA with Tukey's (for biochemical and histologic analyses) or Bonferroni's Post Hoc (for WB analyses). Non-parametric tests were used when indicated. Statistical tests were two-sided, and  $p < 0.05$  were considered statistically significant. All statistical analyses and illustrations were performed using GraphPad Prism 6.01.

## **3. RESULTS**

### **3.1 Effect of losartan and propranolol in heart function and morphology**

No differences in water consumption were observed among groups (data not shown). Based on data of water consumption, the approximate dose of losartan and propranolol were  $0.14 \pm 0.01$  mg/g/day and  $0.11 \pm 0.02$  mg/g/day, respectively. No deaths related to treatments were observed.

Echocardiographic examination was performed at 6 months of age to assess cardiac function and dimensions. Previously, we showed that either losartan or propranolol improved the left ventricle contractility and dimensions of MPS I mice.<sup>18</sup> Here, we expanded these results to evaluate other cardiac parameters and to obtain samples for multiple analyses, including enzymatic activities,

Western Blot and histological evaluation. Echocardiographic data are shown in the **Table 1** (and **Suppl. Fig. 1-2**). After 4 months, both treatments prevented the heart enlargement ( $p < 0.05$ ) compared to the untreated MPS I group. As a consequence, losartan or propranolol improved the left ventricle fractional shortening and ejection fraction ( $p < 0.05$ ). Conversely, aortic valve thickness, assessed by histology, was increased in MPS I mice (**Fig. 1** and **Suppl. Fig. 3**). However, neither losartan nor propranolol affected this parameter. No gender differences were observed.

### 3.2 Renin-Angiotensin System

Considering the importance of the renin-angiotensin system (RAS) on the cardiac remodeling process, we explored the effect of losartan and propranolol on the MPS I mice RAS. At first, we assessed the serum angiotensin levels in the MPS I mice by HPLC. The number of processed samples was WT= 11, MPS I= 11, Losartan= 9, Propranolol= 5. However, the number of samples analyzed for each metabolite was limited by the serum volume and problems on the identification of peptides peak and are indicated in **Fig. 2**. Our results show that circulating levels of Ang II were decreased in the MPS I in comparison to WT mice ( $p < 0.05$ ), and losartan and propranolol did not alter its levels. Regarding the Ang I and Ang 1-7 levels, no differences were observed among groups (**Fig. 2**). We also measured the heart AT1 receptor levels, and no alterations were observed in all experimental groups.

### 3.3 Downstream proteins associated with G protein-coupled receptors

To explore the underlying molecular mechanisms of losartan and propranolol treatments in MPS I heart disease, downstream proteins activated by GPCR were examined by western blotting. Activation of GPCR by biomechanical stress and neurohormonal mediators leads to the activation of downstream pathways like extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2) or serine/threonine-protein kinase B (PKB, also known as AKT). As shown in **Fig. 3**, the p-AKT/t-AKT levels were reduced in the MPS I group. Additionally, a lower ERK1/2 activation (p-ERK1/2/t-ERK1/2) was observed in MPS I mice compared to WT mice ( $p < 0.05$ ). While both treatments did not affect AKT activation, losartan increased ERK1/2 activation.

### 3.4 Extracellular matrix remodeling

The extracellular matrix (ECM) plays an essential role in the development of pathological cardiac remodeling. Therefore, alteration on protease activity or ECM components can negatively affect the cardiac function and structure. Thus, we analyzed the signaling pathways associated with collagen deposition as well as the activity and levels of matrix metalloproteases (MMP) and cathepsins (Cts), which may be activated through GPCR signaling.

Pathological cardiac remodeling usually involves myocardial fibrosis, which is associated with increased TGF- $\beta$  expression and collagen deposition. As shown in **Fig. 4**, TGF- $\beta$  levels and its intracellular mediator (p-SMAD2/3) were unaltered in all experimental groups. Similarly, picrosirius red analysis showed no evidence of collagen deposition in the heart.

Increases in the activities of proteolytic enzymes such as MMPs and Cts play a fundamental role in the process of cardiac remodeling.<sup>17</sup> As shown in **Fig. 5**, total MMP, MMP-2, and MMP-9 activities were unaltered in all experimental groups ( $p \geq 0.05$ ). However, as previously shown by Baldo et al<sup>8</sup>, total Cts activity was increased in MPS I heart samples ( $p < 0.05$ ). Although losartan did not have any effect on Cts B activity, it reduced the total Cts activity ( $p < 0.05$ ).

## 4. DISCUSSION

In this study, we have confirmed the beneficial effect of losartan and propranolol on left ventricle ejection fraction and left ventricle dilatation, as previously observed.<sup>18</sup> Besides, we have demonstrated that *Idua*<sup>-/-</sup> mice have diminished activation of AKT and ERK1/2 and increased total cathepsin activity. Interestingly, losartan seems to restore ERK1/2 activity while decreasing total cathepsin activity to levels similar to wild-type controls.

MPS I patients commonly develop heart abnormalities such as LV dilatation and LV hypertrophy leading to heart dysfunction.<sup>4,7</sup> These alterations in cardiac chambers architecture (size, shape, and



function) is termed cardiac remodeling.<sup>5,29</sup> This process occurs due to different hemodynamic stress, as observed in systemic hypertension, valve diseases, myocardial infarction.<sup>15</sup> Valve thickening is present in approximately 80% of cases,<sup>4</sup> which is also observed in several animal models for MPS I and VII.<sup>30–34</sup> This alteration may result in valve regurgitation (insufficiency), causing the left-ventricular remodeling, dilatation, and ultimately in systolic and diastolic dysfunction. Systemic and pulmonary hypertension can also result in a pathologic alteration but have been reported in only some MPS I patients.<sup>35,36</sup>

Indeed, MPS I mice also present progressive cardiac involvement, which results in an abnormal structure and heart dysfunction. At 6 months old, it is possible to observe cardiac hypertrophy, with increased LV internal diameter, normal-to-reduced wall thickness, and cardiac dysfunction. The valve disease seems to be the main problem in MPS I animals, which may induce a volume overload; thus, promoting cardiac hypertrophy with an eccentric pattern. Volume overload typically results in eccentric hypertrophy, which is characterized by serial addition of sarcomeres that leads to an increase in cardiomyocytes length and is associated with mild or no fibrosis.<sup>29</sup>

Here, we were able to demonstrate that MPS I mice developed substantial valve thickness, followed by left ventricle enlargement and reduction in contractile function evidenced by decreased fractional shortening and ejection fraction. Interestingly, both propranolol and losartan improved the left ventricle contractile function, but only losartan maintained the LVEF similar to wild-type animals. Nevertheless, one of the major limitations of this study was the inability to determine the dose of losartan and propranolol in each individual mouse. This may have impacted the individual parameters of the animals analyzed due to function of a differential drug consumption.

It is well-known that all morphological alterations observed during the cardiac remodeling occur in addition to a series of cellular, biochemical, molecular, and genetic changes.<sup>15,37</sup> This process begins with alterations in signaling pathways that result in metabolic changes and the morphological course of the cardiomyocytes. Therefore, considering our findings regarding the beneficial effect of two different blockers of G-protein receptors, propranolol, and losartan, we decided to understand whether the pathways controlled by its receptor, angiotensin II type I receptor (AT1R) and  $\beta$ -adrenergic receptor ( $\beta$ -AR), may influence the MPS I diseases course.

The increased hemodynamic workload that occurs in MPS I results in the mechanical stretch of the myocardium, triggering the release of several neuro-humoral factors (such as angiotensin II or catecholamines), which acts through the activation of G protein-coupled receptors, such as AT1R and  $\beta$ -AR.<sup>14,38,39</sup> Palpant et al<sup>40</sup> indicated that adult mice (>8 months) displayed excessive catecholaminergic stimulation to maintain baseline hemodynamics. Even though, initially adrenergic stimulation increases contractility and may be beneficial, chronic adrenergic stimulation can result in compensatory maladaptive cardiac remodeling and contribute to heart failure in MPS-I. Thus, we have decided to analyze the role of renin-angiotensin system (RAS) and observed that the circulating levels of Ang II were lower in MPS I mice. This result seems contradictory since it is expected that pathological heart conditions lead to higher Ang II levels. However, it is important to stress out that possible outliers (2 animals) may have raised the Ang II mean levels of wild-type controls, although the outlier analysis demanded to keep these values, this mean value may be biased and not a very robust representative of accurate Ang II level for normal C57BL/6 mice. Hence, if these values are removed from the analysis, all groups presented similar levels, which may indicate that animals have similar blood pressure among groups. In conformity, Jordan et al<sup>36</sup> showed a moderate increase in arterial pressure in MPS I mice after 10 months of age; consequently, oscillations on circulating Ang II are not expected.

On the other hand, given that RAS peptides and its receptors can be produced locally, heart RAS activation may play a more critical role in cardiovascular diseases, contrasting to systemic activation. Indeed, Osborn et al<sup>41</sup> showed a local up-regulation of angiotensin II receptors type I and II and the activation of angiotensin II conversion enzyme I and II in the aortas of MPS I. Yet, in our study, we did not analyze the angiotensin peptides in the heart; we have analyzed the levels of AT1R, which was unaltered in heart samples. Nonetheless, when we assessed AT1R downstream proteins AKT and ERK1/2, we observed that both proteins were decreased in MPS I animals, and only losartan seems able to increase the ERK1/2 levels, but not AKT.

The G protein-coupled receptors (GPCR) transduce several signals that control cardiomyocytes and matrix dynamics. For instance, GPCR activation of AKT is mainly associated with physiological cardiac hypertrophy. However, DeBosch et al<sup>42</sup> reported that knockout AKT mice had enhanced cardiac growth and reduced contractility in response to pressure overload. Thus, AKT may have an essential role in the regulation of cardiac hypertrophy, requiring the maintenance of contractile



function in response to a pathological stimulus.<sup>43</sup> Therefore, decreased levels of AKT activation could lead to pathological hypertrophy development. However, considering that losartan and propranolol did not affect AKT activation, the improvements observed with both treatments would not be related to AKT-dependent signaling pathways.

Another common pathway activated by GPCR involves the induction of MAPKs, like the extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2). The activation of ERK1/2 is considered to have a pro-hypertrophic effect. The reduction or depletion of ERK1/2 has shown to promote cardiomyocyte lengthening and eccentric cardiac growth, while its activation resulted in concentric hypertrophy.<sup>15,44</sup> However, it is unclear whether ERK is a critical mediator of hypertrophic responses.<sup>15</sup> ERK1/2 deficiency or partial reduction fails to block hypertrophy response, which suggests that ERK1/2 activation is sufficient, but not essential, for the development of cardiac hypertrophy.<sup>45</sup>

ERK1/2 could also regulate the phosphorylation of multiple intracellular targets that induce reprogramming cardiac gene expression related to cardiac hypertrophy, fibrosis, cell proliferation, oxidative stress, and inflammation.<sup>39,46</sup> Through MAPK, AT1R can enhance TGF- $\beta$  signaling by inducing ligands, receptors, and activators.<sup>47</sup> Also, the accumulation of negatively charged GAGs may activate TGF- $\beta$  in the myocardium, leading to hypertrophic cardiomyopathy.<sup>48</sup> Yano et al<sup>49</sup> found an increase in p-SMAD2 in the vascular wall and myocardium on an autopsy specimen of a deceased MPS I patient. Nevertheless, we found alteration neither in TGF- $\beta$  levels nor in its canonical target (SMAD2/3) in heart samples. Per our data, a modest increase in TGF- $\beta$  expression levels<sup>41,50</sup> with no activation of secondary messenger (p-SMAD2) was found in the aorta of MPS I mice.<sup>50</sup> As ERK, AKT, and TGF- $\beta$  are related to collagen production, the reduced level of ERK and AKT activities and the unaltered levels of TGF- $\beta$ , can explain, in part, the absence of collagen deposition on histological specimens.

The activation of MAPKs has also been involved in the regulation of the proteolytic enzymes, like MMPs and Cathepsins, which can alter the extracellular matrix and affect the activities of subcellular organelles in cardiomyocytes.<sup>17</sup> ERK's role in the modulation of MMP has been observed,<sup>51-53</sup> which may contribute to heart pathology and result in abnormal cardiac function and structure. Among MMPs, the substrates of MMP-2 and MMP-9 include several components of



ECM like elastin, fibronectin, proteoglycans, laminin, and collagens. However, we did not detect changes in total MMP activities or MMP-2 and MMP-9 levels, which corroborates the lack of change in heart elastase or collagenase activity in MPS I mice.<sup>21</sup> Nevertheless, alteration in cathepsin activities has been demonstrated to play an essential role in the development of heart disease. For instance, it has been shown that the specific inhibition of lysosomal proteases (like CtsB) could improve function and cardiac diameters, regardless of the improvement in the heart valves.<sup>21</sup> Confirming our previous study, the total cathepsin activity was elevated in untreated MPS I mice being CtsB the main protease activity contributing to whole cathepsin activity. While no alteration was observed in CtsB activity with treatment, only losartan reduced the total Cts activity.

Our results suggest that heart pathology in MPS I involves multiple factors and a complex cascade of secondary pathogenic events resulting in LV dysfunction. Losartan and propranolol block different GPCR, which ameliorates cardiac alteration by preventing heart enlargement and improving its contractile function (normalized with losartan). When we assessed the downstream proteins of AT1R, AKT and ERK1/2, we observed that both proteins were down-regulated in MPS I animals, but only losartan treatment seemed to restore ERK1/2 levels, with no effect on AKT. Even through the mechanism of the beneficial effect of propranolol remains unclear, our findings show an important role of AT1R in MPS I

While there needs to be more definitive evidence on the mechanism of action of both drugs in the MPS I heart disease, both losartan and propranolol could be considered as potentially useful adjuvants in the treatment of the MPS I cardiac manifestations, which in fact is already being tested in a clinical trial from our group (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03632213).

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors would like to thank Luisa Natalia Pimentel Vera and Giuseppe Ávila Testa for technical assistance. EAG would like CNPq for the scholarship.

## REFERENCE

1. De Pasquale V, Pezone A, Sarogni P, et al. EGFR activation triggers cellular hypertrophy and lysosomal disease in NAGLU-depleted cardiomyoblasts, mimicking the hallmarks of mucopolysaccharidosis IIIB. *Cell Death Dis* 2018; 9: 40.
2. Neufeld EF, Muenzer J. The Mucopolysaccharidoses. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 2001, pp. 3421–3454.
3. Giugliani R, Federhen A, Rojas MVM, et al. Mucopolysaccharidosis I, II, and VI: Brief review and guidelines for treatment. *Genet Mol Biol* 2010; 33: 589–604.
4. Pastores GM, Arn P, Beck M, et al. The MPS I registry: Design, methodology, and early findings of a global disease registry for monitoring patients with Mucopolysaccharidosis Type I. *Mol Genet Metab* 2007; 91: 37–47.
5. Rienks M, Papageorgiou A-P, Frangogiannis NG, et al. Myocardial Extracellular Matrix. *Circ Res* 2014; 114: 872–888.
6. Jugdutt BI. Aging-related Changes in Cardiac Extracellular Matrix: Implications for Heart Failure in Older Patients. *J Cardiol Curr Res* 2015; 3: 1–14.
7. Braunlin EA, Harmatz PR, Scarpa M, et al. Cardiac disease in patients with mucopolysaccharidosis: presentation, diagnosis and management. *J Inherit Metab Dis* 2011; 34: 1183–1197.
8. Baldo G, Tavares AMV, Gonzalez E, et al. Progressive heart disease in mucopolysaccharidosis type I mice may be mediated by increased cathepsin B activity. *Cardiovasc Pathol* 2017; 27: 45–50.
9. Baldo G, Wu S, Howe R a, et al. Pathogenesis of aortic dilatation in mucopolysaccharidosis VII mice may involve complement activation. *Mol Genet Metab* 2011; 104: 608–619.
10. Poswar F de O, de Souza CFM, Giugliani R, et al. Aortic root dilatation in patients with mucopolysaccharidoses and the impact of enzyme replacement therapy. *Heart Vessels* 2019; 34: 290–295.

- Accepted Article
11. Wang J, Gareri C, Rockman HA. G-Protein–Coupled Receptors in Heart Disease. *Circ Res* 2018; 123: 716–735.
  12. Capote LA, Mendez Perez R, Lymperopoulos A. GPCR signaling and cardiac function. *Eur J Pharmacol* 2015; 763: 143–148.
  13. Kacimi R, Gerdes AM. Alterations in G Protein and MAP Kinase Signaling Pathways During Cardiac Remodeling in Hypertension and Heart Failure. *Hypertension* 2003; 41: 968–977.
  14. Shimizu I, Minamino T. Physiological and pathological cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 2016; 97: 245–262.
  15. Bernardo BC, Weeks KL, Pretorius L, et al. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: Experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol Ther* 2010; 128: 191–227.
  16. Simonaro CM, Ge Y, Eliyahu E, et al. Involvement of the Toll-like receptor 4 pathway and use of TNF- $\alpha$  antagonists for treatment of the mucopolysaccharidoses. *Proc Natl Acad Sci* 2010; 107: 222–227.
  17. Müller AL, Dhalla NS. Role of various proteases in cardiac remodeling and progression of heart failure. *Heart Fail Rev* 2012; 17: 395–409.
  18. Gonzalez EA, Tavares AMV, Poletto E, et al. Losartan improves aortic dilatation and cardiovascular disease in mucopolysaccharidosis I. *J Inherit Metab Dis* 2017; 40: 311–312.
  19. Gao S, Ho D, Vatner DE, et al. Echocardiography in Mice. In: *Current Protocols in Mouse Biology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., pp. 997–1003.
  20. Litwin SE, Katz SE, Weinberg EO, et al. Serial Echocardiographic-Doppler Assessment of Left Ventricular Geometry and Function in Rats With Pressure-Overload Hypertrophy. *Circulation* 1995; 91: 2642–2654.
  21. Gonzalez EA, Martins GR, Tavares AMV, et al. Cathepsin B inhibition attenuates cardiovascular pathology in mucopolysaccharidosis I mice. *Life Sci* 2018; 196: 102–109.
  22. Bradford M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248–254.



23. Colella AD, Chegenii N, Tea MN, et al. Comparison of Stain-Free gels with traditional immunoblot loading control methodology. *Anal Biochem* 2012; 430: 108–110.
24. Gürtler A, Kunz N, Gomolka M, et al. Stain-Free technology as a normalization tool in Western blot analysis. *Anal Biochem* 2013; 433: 105–111.
25. Li R, Shen Y. An old method facing a new challenge: Re-visiting housekeeping proteins as internal reference control for neuroscience research. *Life Sci* 2013; 92: 747–751.
26. Soares D dos S, Pinto GH, Lopes A, et al. Cardiac hypertrophy in mice submitted to a swimming protocol: Influence of training volume and intensity on myocardial renin-angiotensin system. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol* 2019; 316: R776–R782.
27. Muto Y, Wang Z, Vanderberghe M, et al. Mast Cells Are Key Mediators of Cathelicidin-Initiated Skin Inflammation in Rosacea. *J Invest Dermatol* 2014; 134: 2728–2736.
28. Serena TE, Cullen BM, Bayliff SW, et al. Defining a new diagnostic assessment parameter for wound care: Elevated protease activity, an indicator of nonhealing, for targeted protease-modulating treatment. *Wound Repair Regen* 2016; 24: 589–595.
29. Kehat I, Molkenin JD. Molecular Pathways Underlying Cardiac Remodeling During Pathophysiological Stimulation. *Circulation* 2010; 122: 2727–2735.
30. Braunlin E, Mackey-Bojack S, Panoskaltsis-Mortari A, et al. Cardiac functional and histopathologic findings in humans and mice with mucopolysaccharidosis type I: implications for assessment of therapeutic interventions in hurler syndrome. *Pediatr Res* 2006; 59: 27–32.
31. Bigg PW, Sleeper MM, O'Donnell P a, et al. The effect of neonatal gene therapy with a gamma retroviral vector on cardiac valve disease in mucopolysaccharidosis VII dogs after a decade. *Mol Genet Metab* 2013; 110: 311–318.
32. Sleeper MM, Kusiak CM, Shofer FS, et al. Clinical characterization of cardiovascular abnormalities associated with feline mucopolysaccharidosis I and VI. *J Inherit Metab Dis* 2008; 31: 424–431.
33. Ponder KP, O'Malley TM, Wang P, et al. Neonatal Gene Therapy With a Gamma Retroviral

Vector in Mucopolysaccharidosis VI Cats. *Mol Ther* 2012; 20: 898–907.

34. Traas AM, Wang P, Ma X, et al. Correction of Clinical Manifestations of Canine Mucopolysaccharidosis I with Neonatal Retroviral Vector Gene Therapy. *Mol Ther* 2007; 15: 1423–1431.
35. Taylor DB, Blaser SI, Burrows PE, et al. Arteriopathy and coarctation of the abdominal aorta in children with mucopolysaccharidosis: Imaging findings. *Am J Roentgenol* 1991; 157: 819–823.
36. Jordan MC, Zheng Y, Ryazantsev S, et al. Cardiac manifestations in the mouse model of mucopolysaccharidosis I. *Mol Genet Metab* 2005; 86: 233–243.
37. Azevedo PS, Polegato BF, Minicucci MF, et al. Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment. *Arq Bras Cardiol* 2016; 62–69.
38. Dorn GW. The Fuzzy Logic of Physiological Cardiac Hypertrophy. *Hypertension* 2007; 49: 962–970.
39. Heineke J, Molkentin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7: 589–600.
40. Palpant NJ, Bedada FB, Peacock B, et al. Cardiac disease in mucopolysaccharidosis type I attributed to catecholaminergic and hemodynamic deficiencies. *Am J Physiol Circ Physiol* 2011; 300: H356–H365.
41. Osborn MJ, Webber BR, McElmurry RT, et al. Angiotensin receptor blockade mediated amelioration of mucopolysaccharidosis type I cardiac and craniofacial pathology. *J Inherit Metab Dis* 2017; 40: 281–289.
42. DeBosch B, Treskov I, Lupu TS, et al. Akt1 is required for physiological cardiac growth. *Circulation* 2006; 113: 2097–104.
43. Shiojima I, Walsh K. Regulation of cardiac growth and coronary angiogenesis by the Akt/PKB signaling pathway. *Genes Dev* 2006; 20: 3347–65.
44. Kehat I, Davis J, Tiburcy M, et al. ERK1/2 regulate the balance between eccentric and

concentric cardiac growth. *Circ Res* 2011; 108: 176–83.

45. Purcell NH, Wilkins BJ, York A, et al. Genetic inhibition of cardiac ERK1/2 promotes stress-induced apoptosis and heart failure but has no effect on hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 2007; 104: 14074–14079.
46. Farag E, Maheshwari K, Morgan J, et al. An update of the role of renin angiotensin in cardiovascular homeostasis. *Anesth Analg* 2015; 120: 275–292.
47. Lindsay ME, Dietz HC. Lessons on the pathogenesis of aneurysm from heritable conditions. *Nature* 2011; 473: 308–316.
48. Yano S, Moseley K, Wong L, et al. Glycosaminoglycan metabolism defects and atherosclerosis: Frequent association of endothelial dysfunction in patients with Mucopolysaccharidosis. *J Inherit Metab Dis* 2014; 37: 255–261.
49. Yano S, Li C, Pavlova Z. The Transforming Growth Factor-Beta Signaling Pathway Involvement in Cardiovascular Lesions in Mucopolysaccharidosis-I. *JIMD Rep* 2012; 4: 55–58.
50. Ma X, Tittiger M, Knutsen RH, et al. Upregulation of elastase proteins results in aortic dilatation in mucopolysaccharidosis I mice. *Mol Genet Metab* 2008; 94: 298–304.
51. Cho A, Graves J, Reidy MA. Mitogen-activated protein kinases mediate matrix metalloproteinase-9 expression in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2527–2532.
52. Hua Y, Nair S. Proteases in cardiometabolic diseases: Pathophysiology, molecular mechanisms and clinical applications. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 2015; 1852: 195–208.
53. Moulik S, Pal S, Biswas J, et al. Role of ERK in Modulating MMP 2 and MMP 9 with Respect to Tumour Invasiveness in Human Cancer Cell Line MCF-7 and MDA-MB-231. *J Tumor* 2014; 2: 87–98.



## Figure legends:

**Figure 1. Aortic valve thickening.** Representative images from aortic valve at 6 months of age. Sample size: WT (n=11); MPS I (n=7); Losartan (n=9); Propranolol (n=4). \*  $p \leq 0.05$ . Plot: Mean  $\pm$  SD.

**Figure 2. Renin angiotensin system analyses.** A-C) Serum angiotensin levels assessed by high performance liquid chromatography from: WT (n=5-7); MPS I (n=7-10); Losartan (n=6-8); Propranolol (n=4). D) Western blot analysis of myocardial lysates were from: WT (n=13); MPS I (n=11); Losartan (n=11); Propranolol (n=5).  $p \leq 0.05$ . Plot: Mean  $\pm$  SD. Each dot represents a single mouse.

**Figure 3. ERK1/2 and AKT activation.** Western blot analysis of myocardial lysates were from: WT (n=12-13); MPS I (n=10); Losartan (n=11); Propranolol (n=5). Spliced images are shown by dividing line at the junction. \*  $p \leq 0.05$ . Plot: Mean  $\pm$  SD.

**Figure 4. TGF- $\beta$  and p-Smad2/3 levels, and collagen accumulation in MPS-I mice.** A-B) Western blot analysis of myocardial lysates were from: WT (n=8-13); MPS I (n=8-11). Representative images from picrosirius red staining was used to analyze myocardial collagen. \*  $p \leq 0.05$ . Plot: Mean  $\pm$  SD.

**Figure 5. Effects of losartan and propranolol on MMPs and cathepsin levels/activity.** Western blot analysis of myocardial lysates were from: WT (n=13); MPS I (n=11); Losartan (n=11); Propranolol (n=5). Enzymatic activities in myocardial lysates were performed from: WT (n=6); MPS I (n=6); Losartan (n=6); Propranolol (n=5). \*  $p \leq 0.05$ . Plot: Mean  $\pm$  SD.

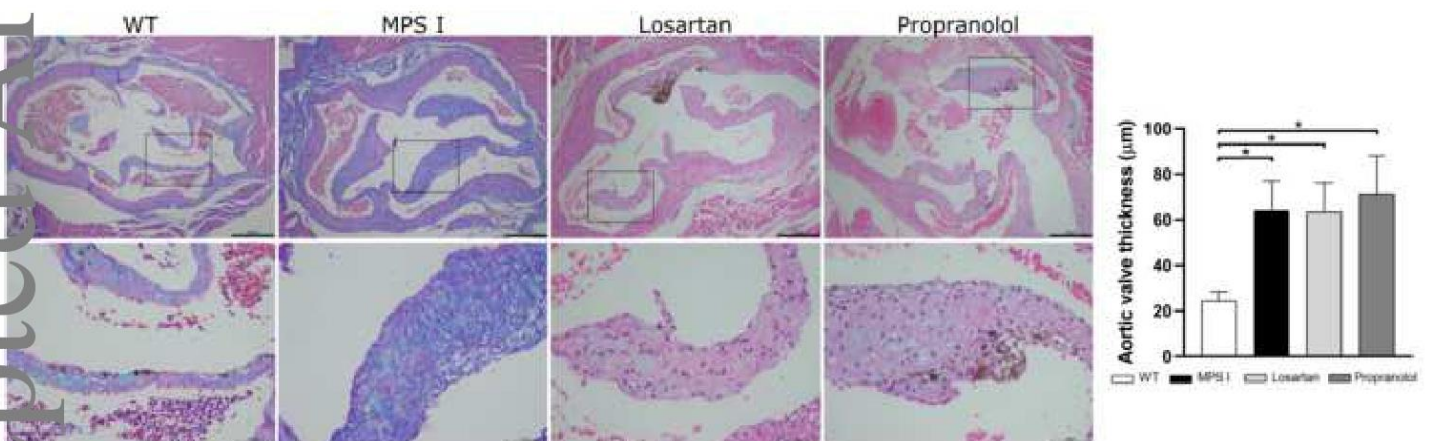
**Table 1: Echocardiographic analysis at 6 months.**

Parameters	WT (n=14)	MPS I (n=17)	MPS I Losartan (n=24)	MPS I Propranolol (n=14)
LVSF (%)	36.7 ± 5.1	27.6 ± 2.7 <sup>A</sup>	34.5 ± 5.4 <sup>B</sup>	32.1 ± 3.7 <sup>AB</sup>
LVEF (%)	74.2 ± 6.1	61.9 ± 4.3 <sup>A</sup>	71.4 ± 7.2 <sup>B</sup>	68.4 ± 5.1 <sup>B</sup>
LVIDs (cm)	0.230 ± 0.03	0.309 ± 0.04 <sup>A</sup>	0.220 ± 0.04 <sup>B</sup>	0.231 ± 0.02 <sup>B</sup>
LVIDd (cm)	0.367 ± 0.03	0.426 ± 0.04 <sup>A</sup>	0.334 ± 0.04 <sup>AB</sup>	0.340 ± 0.02 <sup>B</sup>
AWTs (cm)	0.130 ± 0.02	0.120 ± 0.02	0.136 ± 0.03	0.128 ± 0.01
AWTd (cm)	0.096 ± 0.01	0.085 ± 0.01	0.102 ± 0.02 <sup>B</sup>	0.100 ± 0.01 <sup>B</sup>
PWTs (cm)	0.116 ± 0.01	0.095 ± 0.02 <sup>A</sup>	0.120 ± 0.02 <sup>B</sup>	0.117 ± 0.01 <sup>B</sup>
PWTd (cm)	0.092 ± 0.02	0.072 ± 0.02 <sup>A</sup>	0.090 ± 0.02 <sup>B</sup>	0.086 ± 0.01
LV mass (g)	0.132 ± 0.03	0.126 ± 0.03	0.117 ± 0.04	0.112 ± 0.02

Legend: LV – Left ventricle; SF - Shortening fraction; EF - Ejection fraction; ID - internal diameter in systole (s) or diastole (d); AWT - Anterior wall thickness in systole (s) or diastole (d); PWT – Posterior wall thickness in systole (s) or diastole (d); WT - wild type. <sup>A</sup> represent  $p \leq 0.05$  compared to WT and <sup>B</sup> represent  $p \leq 0.05$  compared to MPS I.

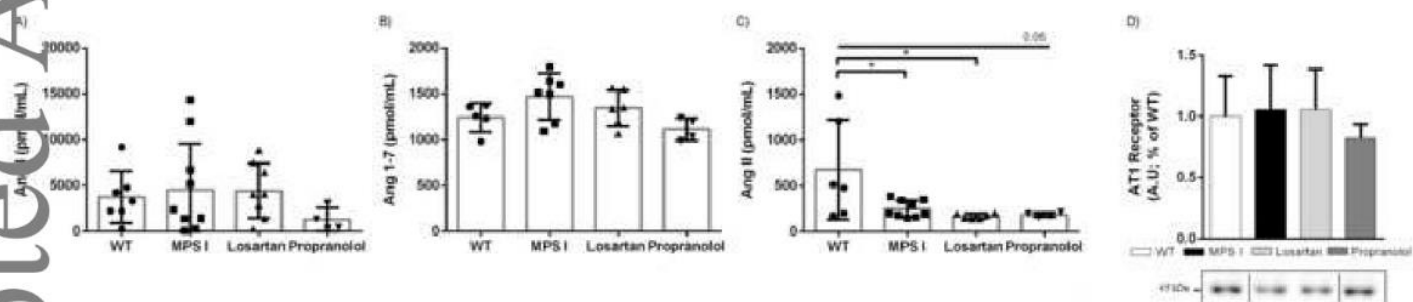


Figure 1



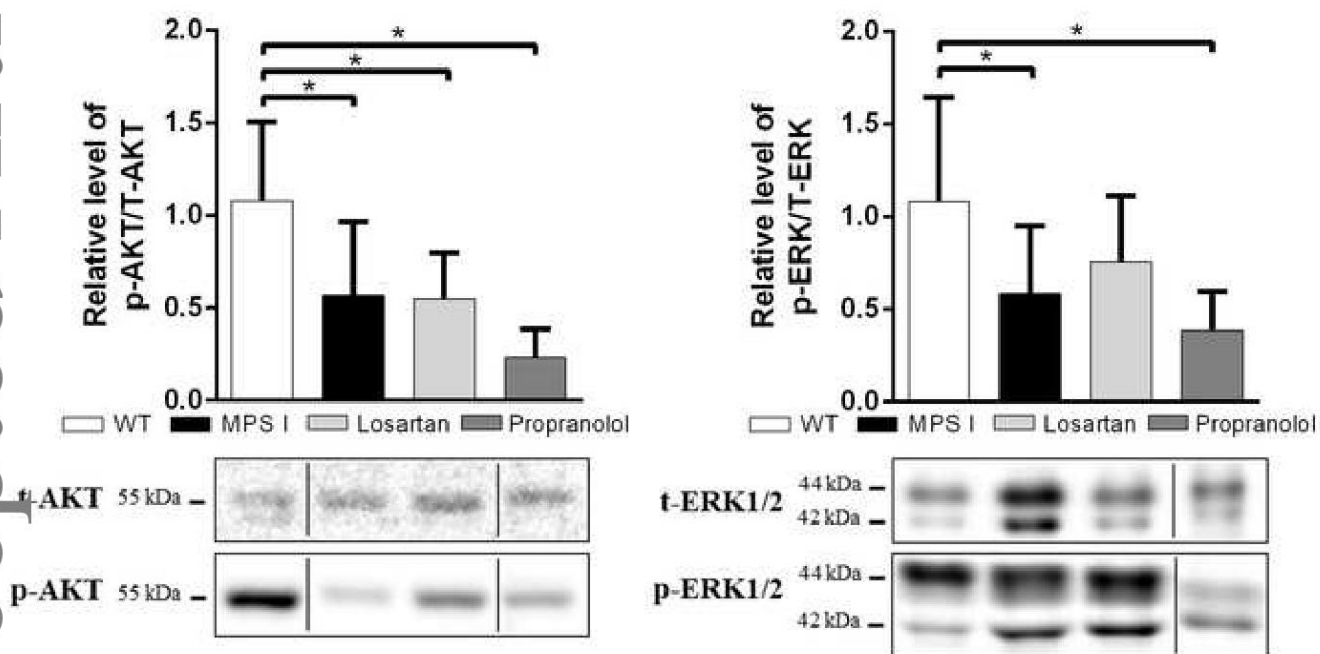
This article is protected by copyright. All rights reserved.

Figure 2



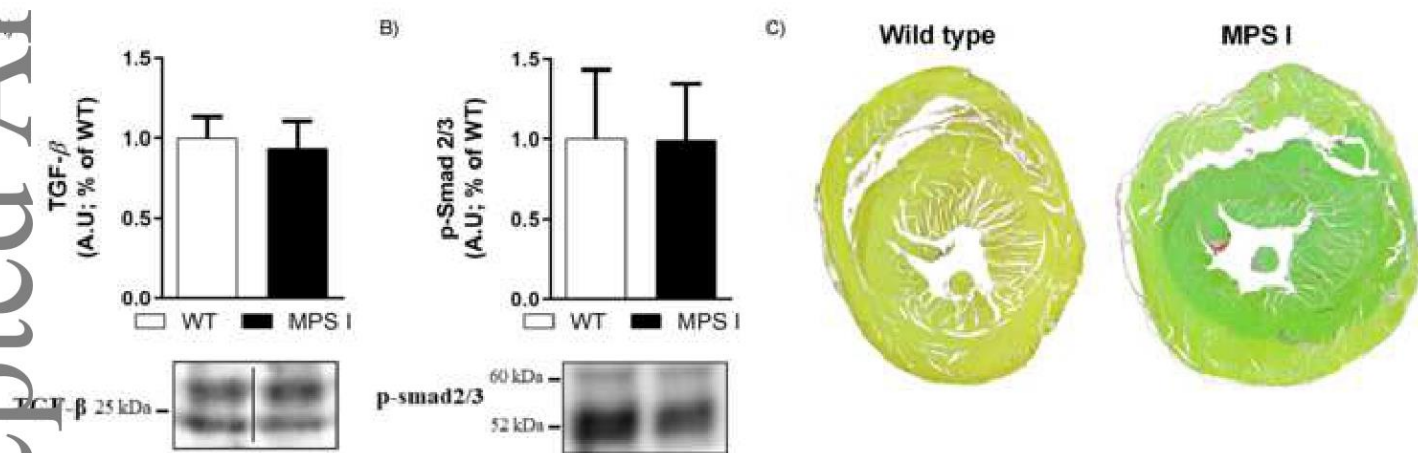
This article is protected by copyright. All rights reserved.

Figure 3



This article is protected by copyright. All rights reserved.

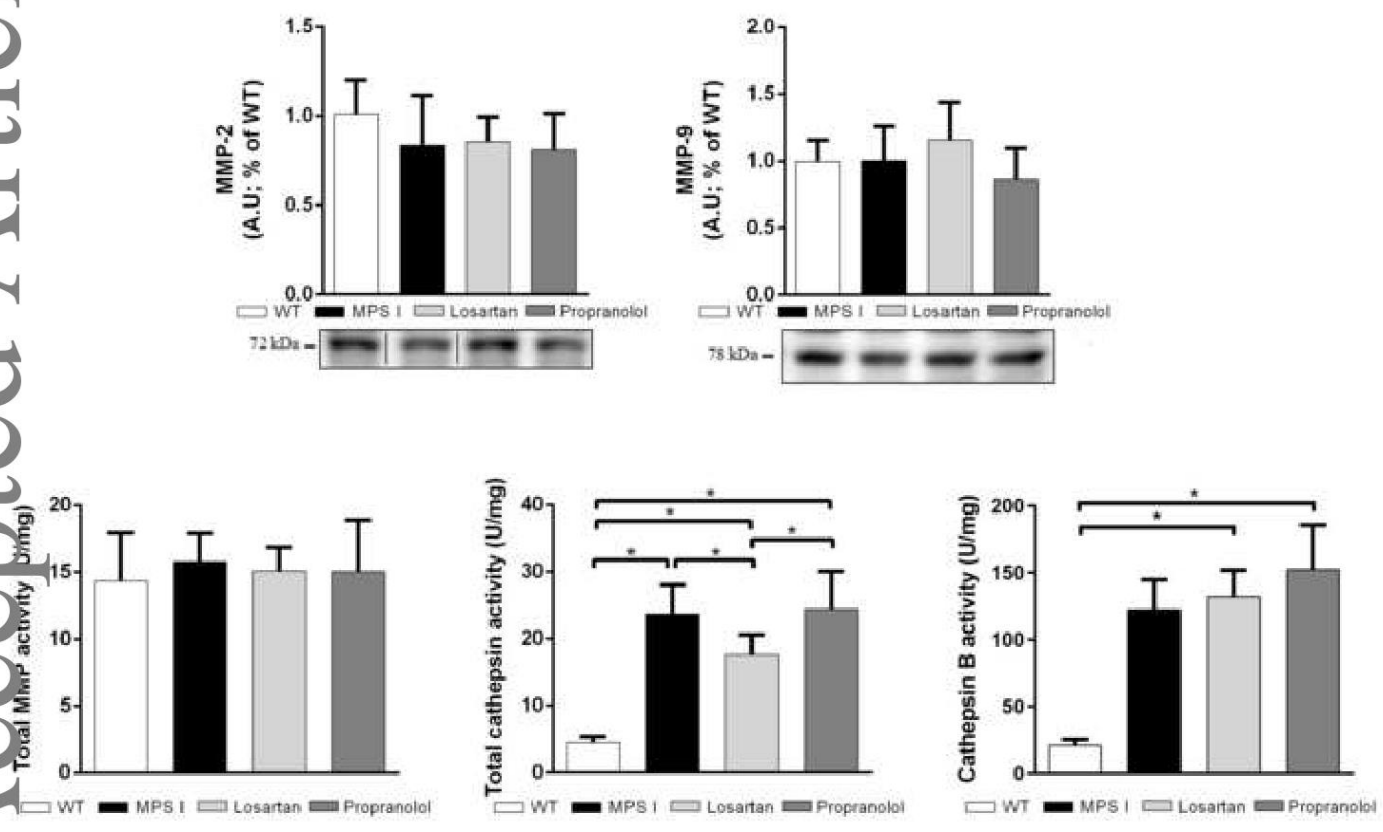
Figure 4



This article is protected by copyright. All rights reserved.

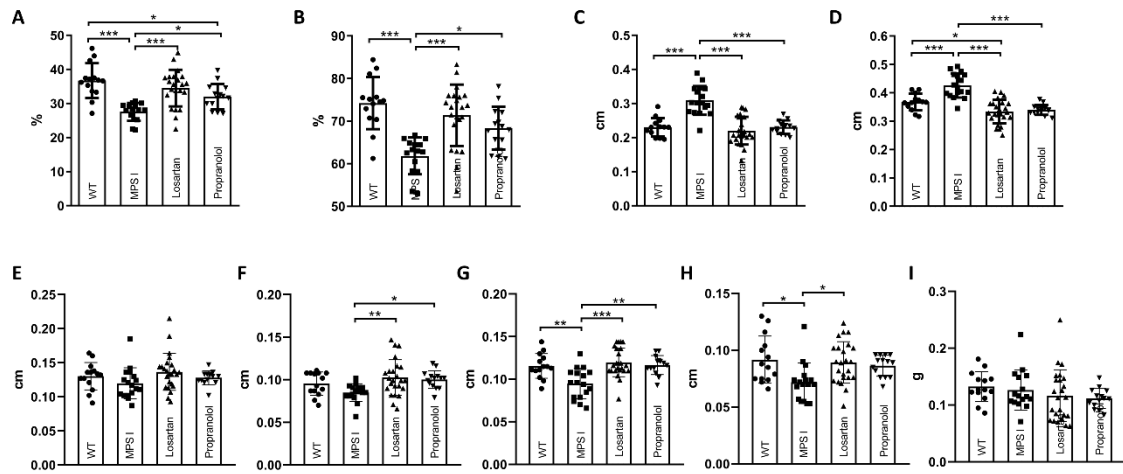
Figure 5

Accepted Article

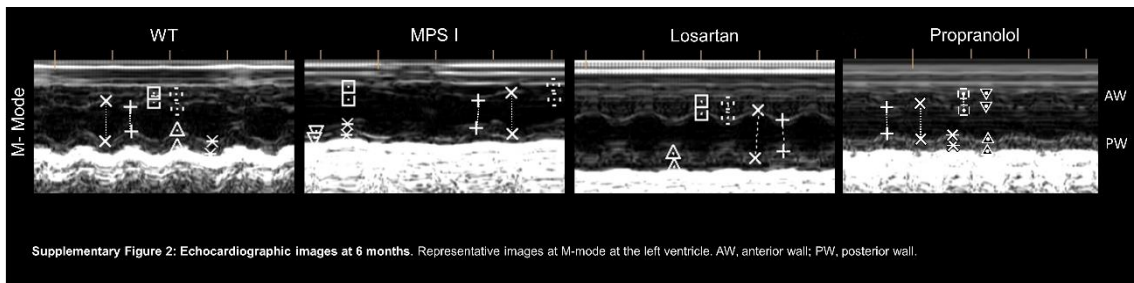


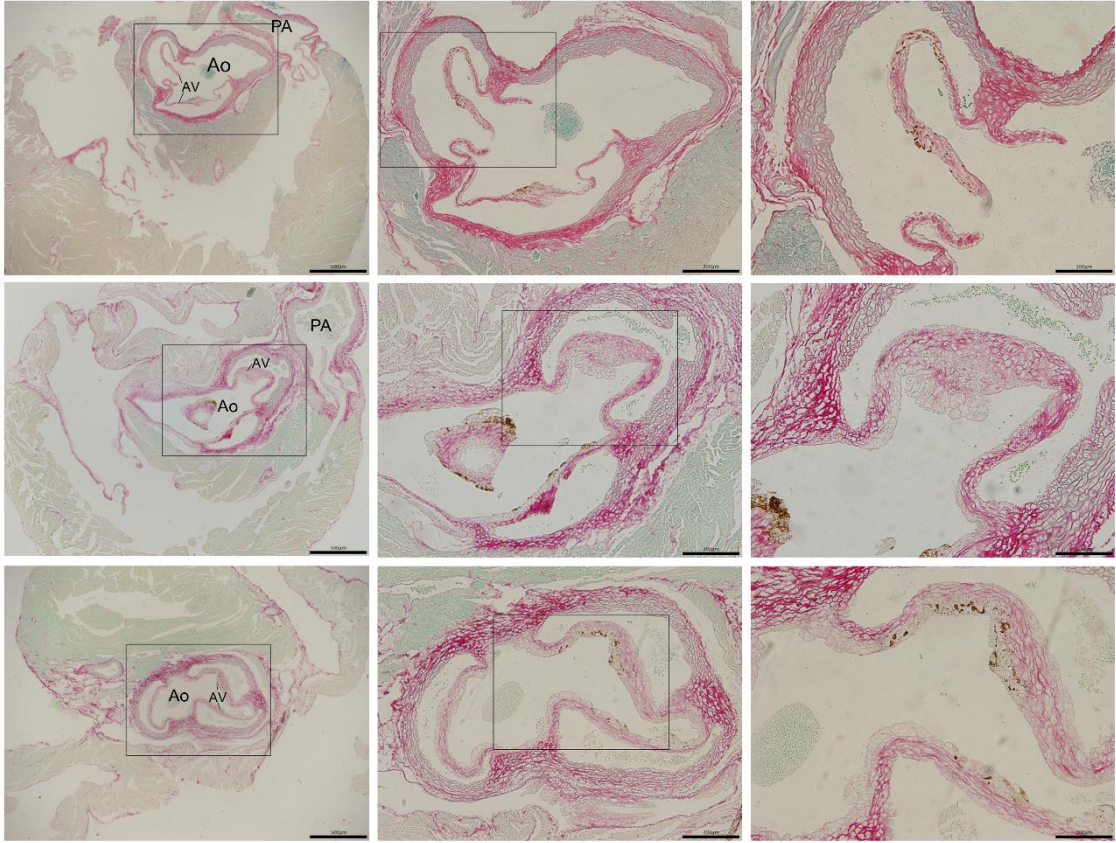
This article is protected by copyright. All rights reserved.

## Supplementary material



**Supplementary Figure 1: Echocardiography performed at 6 months of age.** A) Left ventricular (LV) shortening fraction. B) LV ejection fraction. C) LV systolic diameter. D) LV diastolic diameter. E) Anterior wall thickness in systole or (F) diastole. G) Posterior wall thickness in systole or (H) diastole. I) LV mass. Each dot represents an animal. \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . Plot: Mean  $\pm$  SD





**Supplementary Figure 3: Aortic valve.** Valve structure visualized by picrosirius staining. PA, Pulmonary artery; Ao, Aorta; AV, aortic valve.

## **DISCUSSÃO**

---



As manifestações cardiovasculares são frequentes e representam uma das principais causas de mortalidade em pacientes com MPS I (Krovetz et al. 1965; Rentería et al. 1976; Neufeld and Muenzer 2001; Muenzer et al. 2009). Os tratamentos disponíveis atualmente podem melhorar muitas das manifestações clínicas, mas apresentam baixa eficácia sobre os tecidos cardiovasculares (Bolourchi et al. 2016; Poswar et al. 2019a; Kubaski et al. 2020). Nesse contexto, o estudo dos mecanismos que participam do desenvolvimento das alterações patológicas no sistema cardiovascular, assim como a busca de novas opções terapêuticas que permitam limitar sua progressão são fundamentais.

O acúmulo de GAGs pode desencadear uma série de eventos patológicos que comprometem a estrutura e função dos tecidos cardiovasculares (Palpant et al. 2011; Braunlin et al. 2011). Algumas dessas alterações, como o aumento na espessura das valvas cardíacas, podem ser explicadas pelo acúmulo excessivo de GAGs. Esse espessamento das valvas cardíacas é comum nas MPS, podendo levar à disfunção e iniciar o processo de remodelamento cardíaco, resultando na dilatação do coração e na deterioração progressiva da função contrátil (Dangel 1998; Braunlin et al. 2011). Nos camundongos MPS I identificamos um aumento substancial na espessura das valvas seguido pelo incremento do diâmetro interno do ventrículo esquerdo e a redução da função cardíaca, evidenciada pela diminuição da fração de encurtamento e a fração de ejeção. Estas anormalidades são progressivas e causam o declínio da função contrátil a partir dos 6 meses de idade (Baldo et al. 2017).

Outras manifestações, como hipertensão pulmonar e sistêmica, também foram reportadas em alguns pacientes com MPS I e representam um fator de risco relevante para o desenvolvimento de problemas cardiovasculares (Taylor et al. 1991; Jordan et al. 2005). Considerando isto, tentamos monitorar a pressão sanguínea dos animais no momento prévio à eutanásia, o que não foi possível devido a problemas na aquisição dos dados pelo equipamento. No entanto, um aumento moderado na pressão arterial, foi observado em camundongos MPS I somente a partir dos 10 meses de idade em estudos prévios (Jordan et al. 2005). Desta forma, o aumento na espessura das valvas cardíacas parece ser a principal alteração patogênica observada no tecido cardíaco em camundongos MPS I aos 6 meses de idade. Como resultado da sobrecarga de volume,

decorrente da doença valvar, o coração é propenso a sofrer remodelamento do tipo excêntrico. Esse tipo de processo é caracterizado pelo crescimento em largura dos cardiomiócitos, associado com fibrose ausente ou leve (Kehat and Molkentin 2010). A partir disso, tentamos realizar um análise morfométrica nas células cardíacas através de lâminas coradas com Hematoxilina & Eosina. No entanto, as imagens histológicas obtidas não permitiram a análise, uma vez que não foi possível determinar com clareza o limite dos cardiomiócitos. Por outro lado, através da análise de lâminas coradas com picosirius-red, identificamos a ausência de acúmulo de tecido fibrótico.

O acúmulo de GAGs também pode afetar os tecidos vasculares, causando alterações estruturais como incremento na espessura, assim como iniciar a degradação de componentes da MEC através da ativação de diversas proteases, incluindo catepsinas e MMPs, e resultando no aumento da dilatação da aorta (Braunlin et al. 2006; Nemes et al. 2008; Baldo et al. 2011; Bolourchi et al. 2016; Poswar et al. 2019a). O aumento progressivo do diâmetro aórtico pode resultar em aneurisma e inclusive óbito (Caglayan and Dundar 2009). Embora os pacientes com MPS não apresentem risco aumentado para o desenvolvimento desta alteração (Poswar et al. 2019a), o aumento no conteúdo de GAG foi associado a aneurisma aórtico (Engle et al. 1997; Humphrey 2012). Adicionalmente, o aumento no conteúdo de determinados GAGs foi observado em amostras humanas de dissecação de aneurismas da aorta torácica (Cattell et al. 1994; Humphrey 2012). No presente trabalho, identificamos um aumento na dilatação da aorta, juntamente ao incremento no número de quebras na estrutura de elastina. Estes dados fazem parte de uma etapa deste trabalho cuja conclusão não foi possível em função da pandemia e que será apresentada mais adiante. Embora, em termos gerais, a dilatação da aorta apresenta-se em maior frequência em homens que mulheres (Unlu et al. 2019; Kauhanen et al. 2020), nós não observamos disparidade de gênero no modelo animal utilizado. Isto tampouco foi observado em pacientes com MPS; entretanto, Tolar e colaboradores (Tolar et al. 2009) identificaram dimorfismo sexual para outros parâmetros em camundongos MPS I. Esse grupo observou que camundongos MPS I machos apresentam uma redução na função cardíaca e um aumento na incidência de insuficiência aórtica associada com o incremento de MMPs no arco aórtico.

O mecanismo pelo qual estas alterações ocorrem ainda não foi completamente elucidado, uma vez que existe pouco conhecimento das cascatas de sinalização ativadas pelo acúmulo de GAGs. Buscando mecanismos para explicar as anormalidades observadas no coração e na aorta, investigamos o papel da sinalização AT1 e TGF- $\beta$ . A desregulação da sinalização de AT1 pode promover uma série de processos patológicos através de diferentes vias, e representa um potente ativador da via de TGF- $\beta$ . Na síndrome de Marfan (MSF) a desregulação da sinalização de TGF- $\beta$  responsável pelo desenvolvimento e progressão das alterações vasculares (Holm et al. 2011). Essas anormalidades na MSF, as quais podem ser amenizadas pela inibição do receptor AT1 ou uso de anticorpos neutralizantes para TGF- $\beta$  (Holm et al. 2011), compartilham algumas semelhanças com as observadas na MPS (Osborn et al. 2017). Na MPS I, a ativação da sinalização de TGF- $\beta$  foi previamente observada em lesões cardiovasculares (Lyons et al. 2011; Yano et al. 2012). Portanto, medicamentos que inibem a atividade de TGF- $\beta$ , como o losartan, poderiam trazer um benefício na prevenção e no tratamento de pacientes com MPS I (Yano et al. 2012), de forma similar ao observado na MFS. Com base esses dados, camundongos MPS I foram tratados com losartan ou propranolol. O tratamento com propranolol visou a determinar se qualquer efeito observado no grupo tratado com losartan seria causado pela ação sobre a sinalização AT1/TGF- $\beta$  ou pelo efeito anti-hipertensivo do fármaco, independente da via de sinalização bloqueada. Após o tratamento durante 4 meses, nossos resultados mostraram uma redução do diâmetro da raiz da aorta em camundongos MPS I tratados com losartan e uma melhora significativa em diferentes parâmetros cardíacos com ambos medicamentos. Tanto losartan como propranolol melhoram significativamente os diâmetros do ventrículo esquerdo e a função contrátil, sem alterar a espessura das valvas cardíacas. Adicionalmente, observamos que losartan teve um efeito levemente superior ao propranolol mantendo os níveis de contratilidade similares ao grupo normal. Em paralelo ao nosso estudo, Osborn e colaboradores (2017) também identificaram uma melhora significativa na estrutura e função do coração em camundongos MPS I tratados com losartan. O mesmo grupo também evidenciou um efeito benéfico do bloqueio do receptor AT1 nas alterações esqueléticas.

A partir desses dados, verificamos o efeito de ambos medicamentos em um número maior de indivíduos e incluímos a análise exploratória das vias de sinalização associadas à ativação dos receptores AT1 e  $\beta$ -AR que poderiam estar envolvidas no remodelamento cardíaco e vascular na MPS I. Embora ambos medicamentos sejam frequentemente utilizados na prática clínica para o tratamento de manifestações cardiovasculares, atualmente não existem recomendações para seu uso em pacientes com MPS. Incluímos também no ensaio um grupo de camundongos MPS I tratados com losartan durante o período pré-natal (a partir das duas semanas de gestação). Esse último, permitiria avaliar se o tratamento previne ou diminui as alterações ósseas. Habashi e colaboradores (2006) realizaram um estudo similar utilizando losartan durante o período pré-natal em camundongos com MSF, sem relatar efeitos adversos. No entanto, nós observamos uma elevada taxa de mortalidade (mais de 80% dos animais), razão pela qual decidiu-se cancelar o tratamento neste grupo em particular. Embora os resultados do efeito pós-natal do losartan no tecido osteoarticular não formem parte desta tese, eles estão sendo compilados e analisados de forma paralela.

Durante o processo de remodelamento patológico e sua transição à disfunção cardíaca, diversos sinais extracelulares como a liberação de fatores neuro-hormonais tem um papel central, uma vez que podem ativar GPCR, como AT1 e  $\beta$ -AR. A análises dos níveis sistêmicos dos componentes do sistema renina angiotensina (SRA) indicaram que apenas os níveis da Angiotensina II (Ang II) estavam diminuídos em camundongos MPS I. Embora esse resultado seja discordante ao esperado sob condições fisiopatológicas, caracterizadas por um aumento nos níveis de Ang II, é importante enfatizar a presença de possíveis valores atípicos (2 animais), que podem ter causado o aumento nos níveis médios de Ang II em animais saudáveis. Apesar de que a análise de *outliers* tenha exigido manter esses valores, o valor médio pode ser tendencioso e não ser representativo do nível exato de Ang II em camundongos C57BL/6 selvagens. De qualquer forma, os dados bioquímicos sugerem que os animais MPS I não apresentaram pressão arterial elevada no tempo analisado, o que concorda com o demonstrado previamente por Jordan e colaboradores (2005). Os componentes do SRA (peptídeos e receptores) também podem ser produzidos localmente (no tecido), de forma que a ativação local do SRA ainda poderia ter um papel mais relevante sobre as doenças

cardiovasculares. De fato, Osborn e colaboradores (2017), observaram um aumento na expressão dos receptores AT1 e AT2, assim como da ECA I e ECA II nas aortas de camundongos MPS I. No presente estudo, não foi possível analisar os peptídeos do SRA no coração, entretanto, os níveis do receptor AT1 se mostraram inalterados e alguns componentes da sinalização *downstream* à GPCR, como ERK1/2 e AKT, foram alterados.

Outro mecanismo que contribui para o desenvolvimento e progressão da hipertrofia cardíaca é a sinalização  $\beta$ -adrenérgica mediada por catecolaminas. Apesar de não termos conseguido avaliar estes metabólitos, Palpant e colaboradores (2011) observaram uma estimulação catecolaminérgica excessiva em camundongos adultos (após 8 meses de idade) para manter a hemodinâmica em níveis basais. A estimulação adrenérgica fornece inicialmente um efeito benéfico através do aumento do desempenho cardíaco, entretanto, a estimulação crônica pode ser prejudicial e costuma ser uma das causas de descompensação e insuficiência cardíaca (Palpant et al. 2011). Desta forma, o uso de bloqueadores  $\beta$ -AR, como propranolol, poderia ter um efeito benéfico frente ao incremento excessivo da atividade do sistema simpático.

Os GPCR, AT1 e  $\beta$ -AR, podem ativar diversas vias de sinalização intracelulares associadas com o remodelamento cardíaco. Entre estas, a ativação de AKT pode ter um papel relevante na regulação da hipertrofia cardíaca, sendo necessária para a manutenção da função contrátil em resposta a um estímulo patológico (Shiojima and Walsh 2006). Camundongos nocaute para AKT têm mostrado um crescimento cardíaco pronunciado acompanhado da redução na contratilidade em resposta ao estímulo de sobrecarga de pressão (DeBosch et al. 2006). Nossos resultados em camundongos MPS I indicaram uma redução da ativação de AKT. Porém, considerando que o losartan e o propranolol não afetaram a ativação de AKT, as mudanças observadas com ambos tratamentos não estariam relacionadas às vias de sinalização dependentes de AKT.

Outra via em comum, ativada por receptores GPCR, inclui a indução de MAPKs, como por exemplo a quinases reguladas por sinal extracelular 1/2 (ERK1/2). Nossos resultados indicam que camundongos MPS I apresentam uma redução nos níveis de ativação de ERK1/2, entretanto o tratamento com losartan pareceu restaurá-los. Embora a via de sinalização ERK1/2 tenha um efeito pró-hipertrófico, foi observado que a deficiência ou redução parcial de ERK1/2 não bloqueia a resposta hipertrófica, o que

sugere que a ativação de ERK1/2 é suficiente, mas não essencial, para o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca (Purcell et al. 2007). A redução ou depleção de ERK1/2 tem mostrado promover o alongamento dos cardiomiócitos e o crescimento cardíaco excêntrico, enquanto que a ativação da via de ERK1/2 resulta em hipertrofia concêntrica (Bernardo et al. 2010; Kehat and Molkentin 2010; Kehat et al. 2011). Estas observações coincidem com os nossos resultados ecocardiográficos e histológicos, sugerindo uma relação entre ERK1/2 e a hipertrofia cardíaca observada nos camundongos MPS I. Outras MAPKs, como a JNK e a p38 MAPK, também podem estar envolvidas no processo de remodelamento cardíaco, apesar de que na literatura existem relatos contrastantes a respeito do seu papel (Bernardo et al. 2010), no entanto, o estudo destas vias não foi incluído no presente trabalho.

A sinalização via ERK1/2 controla diversos aspectos da hipertrofia cardíaca e da patologia vascular (Heineke and Molkentin 2006; Farag et al. 2015). Através de MAPK, AT1 pode promover a sinalização de TGF- $\beta$ , mediante a produção de ligantes, receptores e ativadores da via (Lindsay and Dietz 2011). Estudos prévios mostraram um aumento no p-SMAD2 (downstream à TGF- $\beta$ ) na parede vascular e no miocárdio em uma amostra de autópsia de um paciente com MPS I. Embora nós não tenhamos identificado alterações nos níveis de TGF- $\beta$  nem em seu alvo canônico (SMAD2/3) em amostras de coração de camundongos MPS I, é importante destacar que TGF- $\beta$  pode sinalizar através de vias não canônicas, que incluem as MAPK ou AKT. Como TGF- $\beta$ , ERK e AKT estão relacionadas à produção de colágeno, os níveis reduzidos de ERK e AKT, assim como os níveis inalterados de TGF- $\beta$ , podem explicar, em parte, a ausência de acúmulo de colágeno nas lâminas histológicas de tecido cardíaco.

A ativação de MAPKs também pode estar envolvida na regulação de enzimas proteolíticas que degradam componentes da MEC, como MMPs e catepsinas (Cts). Entre estas, o aumento da expressão de MMP2 e MMP9 está associado com o processo de hipertrofia cardíaca (Müller and Dhalla 2012) e com o aneurisma aórtico (Lindsay and Dietz 2011). Apesar de não termos observado alterações nos níveis de MMP-2 e MMP-9, nem na atividade de MMP totais em nenhum dos grupos analisados, a atividade total de catepsinas e particularmente da Cts B foram elevadas. Estudos prévios do nosso grupo sugeriram que tanto a insuficiência cardíaca progressiva como a doença valvar,

observadas em camundongos MPS I, podem ser dependentes da superexpressão de Cts B (Baldo et al. 2017). Isto foi demonstrado através do tratamento *in vivo* com um inibidor de Cts B, o qual reduziu a dilatação aórtica e o espessamento da válvula cardíaca levando à melhora da função cardíaca (Gonzalez et al. 2018). Neste estudo, nós não observamos alterações na atividade do CtsB com ambos medicamentos, no entanto o losartan reduziu parcialmente a atividade de Cts totais.

Além dos dois artigos já publicados, um terceiro trabalho compunha esta tese. No entanto, em função das medidas de distanciamento social impostas desde março pela pandemia de Covid-19, não foi possível concluir todas as análises a tempo. Neste trabalho, aumentamos o tamanho amostral dos grupos, avaliando adicionalmente 4 animais WT, 9 MPS I, 7 Losartan e 5 Propranolol. Imediatamente após a eutanásia o diâmetro externo da aorta ascendente foi medido usando um paquímetro digital por um avaliador cego para os grupos. As aortas foram então removidas e processadas para análise histológica com a coloração de Verhoeff-van Gieson (VVG) para visualização das fibras de elastina. Fragmentações nessas fibras foram quantificadas usando o software Cell<sup>^</sup>F (Olympus) através da análise média de quatro campos por animal. Além disso, foi coletado material para quantificação da expressão gênica de TGF- $\beta$  mas essas análises não foram finalizadas.

Camundongos MPS I apresentaram um aumento médio de 66% no diâmetro aórtico ( $1,79 \pm 0,25$  mm in MPS I vs  $1,07 \pm 0,12$  mm in WT,  $p < 0,001$ ), com acúmulo anormal de GAGs e aumento das quebras de elastina (95% de aumento comparado com WT,  $p < 0,05$ ). O tratamento com propranolol reduziu levemente o diâmetro aórtico ( $1,57 \pm 0,18$  mm) mas não teve impacto significativo na estrutura da matriz extracelular da aorta. Entretanto, camundongos tratados com losartan mostraram uma redução de 26% no diâmetro aórtico ( $1,32 \pm 0,16$  mm;  $p < 0,001$  comparado com animais MPS I não tratados). Não houve efeito sobre o acúmulo de GAG mas losartan normalizou os níveis de fragmentação da elastina e a estrutura histológica era visualmente similar ao WT (**Figure 8**).





Figura 8: Alterações na estrutura da elastina em camundongos MPS I. Imagens representativas da quebra na estrutura de elastina (setas) visualizada a partir da coloração Verhoeff Van Gieson. Todas as imagens foram capturadas em aumento de 10X. Número de amostras utilizadas na análises: WT (n=4); MPS I (n=9); Losartan (n=7); Propranolol (n=5). \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ . Plot: Média  $\pm$  DS.

O tratamento de camundongos MPS I com losartan teve um efeito benéfico sobre a aorta, decorrente da redução do seu diâmetro, de forma concomitante com a diminuição do número de quebras na estrutura de elastina. Isto é particularmente relevante, uma vez que a degradação de elastina é uma alteração crítica e necessária para a perda da integridade estrutural da parede aórtica, a qual está associada com a perda das propriedades biomecânicas e o processo de dilatação (White and Mazzacco 1996; Humphrey 2012). Embora o propranolol seja capaz de reduzir o estresse hemodinâmico sobre a vasculatura aórtica, seu efeito sobre o diâmetro da aorta foi moderado, sem chegar a afetar a sua estrutura de maneira considerável. Dessa forma, o efeito superior do losartan pode ser decorrente do bloqueio de proteínas envolvidas na degradação da MEC, considerando que a sinalização AngII/AT1 tem um papel importante no remodelamento vascular (Wang et al. 2018).

Resultados similares foram observados na MFS. Nesta condição, o aumento excessivo da sinalização de TGF- $\beta$  pode ser reduzido através do bloqueio do receptor AT1 com losartan (Brooke et al. 2008; Habashi et al. 2011). Embora não tenhamos conseguido analisar de expressão e atividade de TGF- $\beta$  na aorta, as mesmas serão finalizadas quando da retomada das atividades presenciais. O aumento da sinalização de TGF- $\beta$  foi observado em lesões vasculares de cachorros com MPS I (Lyons et al. 2011). Porém outros estudos reportaram um aumento modesto nos níveis de expressão de TGF- $\beta$  (Ma et al. 2008; Osborn et al. 2017) sem ativação da via de sinalização canônica (p-SMAD2) na aorta de camundongos MPS I (Ma et al. 2008). No entanto, foi observado

um aumento de STAT1/3 e p-ERK (Ma et al. 2008). Esse aumento na sinalização de ERK1/2 poderia estar envolvido no processo de degradação da elastina e, conseqüentemente, resultar na dilatação aórtica, como observada na MFS (Holm et al. 2011). Considerando que o desequilíbrio no *turnover* de proteases que degradam os componentes da MEC poderia contribuir no desenvolvimento das anormalidades estruturais da aorta, a avaliação da atividade de catepsinas e metaloproteinases será realizada no futuro. Da mesma forma, a análise das vias de sinalização *downstream* à TGF-B pode ser útil para o melhor entendimento da patologia aórtica e do efeito terapêutico do losartan.

## **CONCLUSÃO**

---

Considerando os resultados encontrados neste estudo podemos concluir que a patologia cardiovascular na MPS I envolve múltiplos fatores e cascatas de eventos patológicos secundários ao acúmulo de GAGs.

A ativação de receptores associados a proteína G (GPCR), AT1 e  $\beta$ -AR podem contribuir na progressão das doenças cardiovasculares em camundongos MPS I, o que foi determinado pelo uso de losartan e propranolol. Na aorta apenas o uso de losartan melhorou as alterações estruturais observadas na fibra de elastina e, conseqüentemente, a dilatação aórtica.

No coração ambos tratamentos melhoraram algumas das manifestações estruturais e a função contrátil. A análise exploratória sobre alguma das vias downstream aos receptores AT1 e  $\beta$ -AR mostrou uma diminuição na ativação dos mensageiros secundários ERK1/2 e AKT, e o aumento na atividade de catepsinas no coração de camundongos MPS I, mas apenas o tratamento com losartan melhorou os níveis de ativação da ERK1/2 e reduziu a atividade de catepsinas totais. O propranolol, por outro lado, possivelmente teve um efeito benéfico sobre outras vias de sinalização ou proteínas não analisadas.

Nossos resultados indicam um papel relevante do receptor AT1 sobre a doença cardiovascular na MPS I. O efeito benéfico do losartan sobre ambas alterações cardíacas e vasculares poderia ser utilizado potencialmente como adjuvante no tratamento de pacientes com MPS I.

## **REFERENCIAS**

---

- Azevedo PS, Polegato BF, Minicucci MF, et al (2016) Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment. *Arq Bras Cardiol* 62–69. <https://doi.org/10.5935/abc.20160005>
- Baldo G, Tavares AMV, Gonzalez E, et al (2017) Progressive heart disease in mucopolysaccharidosis type I mice may be mediated by increased cathepsin B activity. *Cardiovasc Pathol* 27:45–50. <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2017.01.001>
- Baldo G, Wu S, Howe R a, et al (2011) Pathogenesis of aortic dilatation in mucopolysaccharidosis VII mice may involve complement activation. *Mol Genet Metab* 104:608–619. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2011.08.018>
- Beck M, Arn P, Giugliani R, et al (2014) Open The natural history of MPS I : global perspectives from the MPS I Registry. 16:. <https://doi.org/10.1038/gim.2014.25>
- Bernardo BC, Weeks KL, Pretorius L, McMullen JR (2010) Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: Experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol Ther* 128:191–227. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.04.005>
- Bolourchi M, Renella P, Wang R (2016) Aortic Root Dilatation in Mucopolysaccharidosis I–VII. *Int J Mol Sci* 17:2004. <https://doi.org/10.3390/ijms17122004>
- Boyer JK, Gutierrez F, Braverman AC (2004) Approach to the dilated aortic root. *Curr Opin Cardiol* 19:563–569. <https://doi.org/10.1097/01.hco.0000139724.27066.e4>
- Brands MMMG, Frohn-Mulder IM, Hagemans MLC, et al (2013) Mucopolysaccharidosis: Cardiologic features and effects of enzyme-replacement therapy in 24 children with MPS I, II and VI. *J Inherit Metab Dis* 36:227–234. <https://doi.org/10.1007/s10545-011-9444-z>
- Braunlin E, Mackey-Bojack S, Panoskaltis-Mortari A, et al (2006) Cardiac functional and histopathologic findings in humans and mice with mucopolysaccharidosis type I: implications for assessment of therapeutic interventions in hurler syndrome. *Pediatr Res* 59:27–32. <https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000190579.24054.39>
- Braunlin E, Wang R (2016) Cardiac issues in adults with the mucopolysaccharidoses: Current knowledge and emerging needs. *Heart* 102:1257–1262. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2015-309258>
- Braunlin EA, Harmatz PR, Scarpa M, et al (2011) Cardiac disease in patients with mucopolysaccharidosis: presentation, diagnosis and management. *J Inherit Metab Dis* 34:1183–1197. <https://doi.org/10.1007/s10545-011-9359-8>
- Brooke BS, Habashi JP, Judge DP, et al (2008) Angiotensin II blockade and aortic-root dilation in marfan’s syndrome. *N Engl J Med* 358:2787–2795. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0706585>
- Bruni S, Lavery C, Broomfield A (2016) The diagnostic journey of patients with mucopolysaccharidosis I: A real-world survey of patient and physician experiences. *Mol Genet Metab Reports* 8:67–73.

<https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2016.07.006>

- Caglayan AO, Dundar M (2009) Inherited diseases and syndromes leading to aortic aneurysms and dissections. *Eur J Cardio-thoracic Surg* 35:931–940.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejcts.2009.01.006>
- Capote LA, Mendez Perez R, Lymperopoulos A (2015) GPCR signaling and cardiac function. *Eur J Pharmacol* 763:143–148.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.05.019>
- Cattell MA, Hasleton PS, Anderson JC (1994) Glycosaminoglycan content is increased in dissecting aneurysms of human thoracic aorta. *Clin Chim Acta* 226:29–46.  
[https://doi.org/10.1016/0009-8981\(94\)90100-7](https://doi.org/10.1016/0009-8981(94)90100-7)
- Chi C, Riching AS, Song K (2020) Lysosomal abnormalities in cardiovascular disease. *Int J Mol Sci* 21:1–12. <https://doi.org/10.3390/ijms21030811>
- Chun AS, Eleftheriades JA, Mukherjee SK (2013) Do  $\beta$ -Blockers Really Work for Prevention of Aortic Aneurysms? *Aorta* 1:45–51.  
<https://doi.org/10.12945/j.aorta.2013.13.002>
- Clarke GL, Bhattacharjee A, Tague SE, et al (2010) B-Adrenoceptor Blockers Increase Cardiac Sympathetic Innervation by Inhibiting Autoreceptor Suppression of Axon Growth. 30:12446–12454. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1667-10.2010>
- Combs MD, Yutzey KE (2009) Heart valve development: Regulatory networks in development and disease. *Circ Res* 105:408–421.  
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.201566>
- Dangel JH (1998) Cardiovascular changes in children with mucopolysaccharide storage diseases and related disorders- clinical and echocardiographic findings in 64 patients. *Eur J Pediatr* 157:534–538. <https://doi.org/10.1007/s004310050872>
- De Pasquale V, Moles A, Pavone LM (2020) Cathepsins in the Pathophysiology of Mucopolysaccharidoses: New Perspectives for Therapy. *Cells* 9:979.  
<https://doi.org/10.3390/cells9040979>
- De Pasquale V, Pezone A, Sarogni P, et al (2018) EGFR activation triggers cellular hypertrophy and lysosomal disease in NAGLU-depleted cardiomyoblasts, mimicking the hallmarks of mucopolysaccharidosis IIIB. *Cell Death Dis* 9:40.  
<https://doi.org/10.1038/s41419-017-0187-0>
- DeBosch B, Treskov I, Lupu TS, et al (2006) Akt1 is required for physiological cardiac growth. *Circulation* 113:2097–104.  
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.595231>
- Didangelos A, Yin X, Mandal K, et al (2010) Proteomics characterization of extracellular space components in the human aorta. *Mol Cell proteomics MCP* 9:2048–2062. <https://doi.org/10.1074/mcp.M110.001693>
- Dorn GW (2007) The Fuzzy Logic of Physiological Cardiac Hypertrophy. *Hypertension* 49:962–970. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.106.079426>
- Engle J, Safi HJ, Abbassi O, et al (1997) Mucopolysaccharidosis presenting as pediatric



- multiple aortic aneurysm: First reported case. *J Vasc Surg* 26:704–710.  
[https://doi.org/10.1016/S0741-5214\(97\)70074-0](https://doi.org/10.1016/S0741-5214(97)70074-0)
- Everett AD, Tufro-McReddie A, Fisher A, Gomez RA (1994) Angiotensin receptor regulates cardiac hypertrophy and transforming growth factor- $\beta$ 1 expression. *Hypertension* 23:587–592. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.23.5.587>
- Farag E, Maheshwari K, Morgan J, et al (2015) An update of the role of renin angiotensin in cardiovascular homeostasis. *Anesth Analg* 120:275–292.  
<https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000000528>
- Federhen A, Pasqualim G, de Freitas TF, et al (2020) Estimated birth prevalence of mucopolysaccharidoses in Brazil. *Am J Med Genet Part A* 182:469–483.  
<https://doi.org/10.1002/ajmg.a.61456>
- Fesslová V, Corti P, Sersale G, et al (2009) The natural course and the impact of therapies of cardiac involvement in the mucopolysaccharidoses. *Cardiol Young* 19:170–178. <https://doi.org/10.1017/S1047951109003576>
- Fonović M, Turk B (2014) Cysteine cathepsins and extracellular matrix degradation. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 1840:2560–2570.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.03.017>
- Freestone T, Turner RJ, Coady A, et al (1995) Inflammation and Matrix Metalloproteinases in the Enlarging Abdominal Aortic Aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15:1145–1151. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.15.8.1145>
- Gandhi NS, Mancera RL (2008) The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. *Chem Biol Drug Des* 72:455–482.  
<https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2008.00741.x>
- Ghosh A, Dimusto PD, Ehrlichman LK, et al (2012) The role of extracellular signal-related kinase during abdominal aortic aneurysm formation. *J Am Coll Surg* 215:668-680.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2012.06.414>
- Gibbons GH, Dzau VJ (1994) The Emerging Concept of Vascular Remodeling. *N Engl J Med* 330:1431–1438. <https://doi.org/10.1056/NEJM199405193302008>
- Giugliani R, Federhen A, Rojas MVM, et al (2010) Mucopolysaccharidosis I, II, and VI: Brief review and guidelines for treatment. *Genet Mol Biol* 33:589–604.  
<https://doi.org/10.1590/S1415-47572010005000093>
- Gomes LR, Terra LF, Wailemann RAM, et al (2012) TGF- $\beta$ 1 modulates the homeostasis between MMPs and MMP inhibitors through p38 MAPK and ERK1/2 in highly invasive breast cancer cells. *BMC Cancer* 12:1–15. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-26>
- Gonzalez EA, Martins GR, Tavares AMV, et al (2018) Cathepsin B inhibition attenuates cardiovascular pathology in mucopolysaccharidosis I mice. *Life Sci* 196:102–109.  
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.01.020>
- Gonzalez EA, Visioli F, Pasqualim G, et al (2020) Progressive eye pathology in mucopolysaccharidosis type I mice and effects of enzyme replacement therapy.

- Clin Exp Ophthalmol 48:334–342. <https://doi.org/10.1111/ceo.13713>
- Gregor P, Čurila K (2015) Medical treatment of hypertrophic cardiomyopathy - What do we know about it today? *Cor Vasa* 57:e219–e224. <https://doi.org/10.1016/j.crvasa.2015.02.003>
- Gupta S, Das B, Sen S (2007) Cardiac hypertrophy: Mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxidants Redox Signal* 9:623–652. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1474>
- Habashi JP, Doyle JJ, Holm TM, et al (2011) Angiotensin II Type 2 Receptor Signaling Attenuates Aortic Aneurysm in Mice Through ERK Antagonism. *Science (80- )* 332:361–365. <https://doi.org/10.1126/science.1192152>
- Habashi JP, Judge DP, Holm TM, et al (2006) Losartan, an AT1 antagonist, prevents aortic aneurysm in a mouse model of Marfan syndrome. *Science (80- )* 312:117–121. <https://doi.org/10.1126/science.1124287>
- Heineke J, Molkentin JD (2006) Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:589–600. <https://doi.org/10.1038/nrm1983>
- Hinton RB, Yutzey KE (2011) Heart Valve Structure and Function in Development and Disease. *Annu Rev Physiol* 73:29–46. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-012110-142145>
- Holm TM, Habashi JP, Doyle JJ, et al (2011) Noncanonical TGF Signaling Contributes to Aortic Aneurysm Progression in Marfan Syndrome Mice. *Science (80- )* 332:358–361. <https://doi.org/10.1126/science.1192149>
- Hua Y, Nair S (2015) Proteases in cardiometabolic diseases: Pathophysiology, molecular mechanisms and clinical applications. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 1852:195–208. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.04.032>
- Humphrey JD (2012) Possible mechanical roles of glycosaminoglycans in thoracic aortic dissection and associations with dysregulated transforming growth factor- $\beta$ . *J Vasc Res* 50:1–10. <https://doi.org/10.1159/000342436>
- Jordan MC, Zheng Y, Ryazantsev S, et al (2005) Cardiac manifestations in the mouse model of mucopolysaccharidosis I. *Mol Genet Metab* 86:233–243. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2005.05.003>
- Kalluri R, Han Y (2008) Targeting TGF- $\beta$  and the Extracellular Matrix in Marfan's Syndrome. *Dev Cell* 15:1–2. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.06.005>
- Kannan A, Janardhanan R (2014) Hypertension as a risk factor for heart failure. *Curr Hypertens Rep* 16:. <https://doi.org/10.1007/s11906-014-0447-7>
- Kapur NK (2011) Transforming growth factor- $\beta$  governing the transition from inflammation to fibrosis in heart failure with preserved left ventricular function. *Circ Hear Fail* 4:5–7. <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.110.960054>
- Kauhanen SP, Saari P, Jaakkola P, et al (2020) High prevalence of ascending aortic dilatation in a consecutive coronary CT angiography patient population. *Eur Radiol*

30:1079–1087. <https://doi.org/10.1007/s00330-019-06433-z>

Kawai T, Forrester SJ, O'Brien S, et al (2017) AT1 receptor signaling pathways in the cardiovascular system. *Pharmacol Res* 125:4–13.

<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.05.008>

Kehat I, Davis J, Tiburcy M, et al (2011) ERK1/2 regulate the balance between eccentric and concentric cardiac growth. *Circ Res* 108:176–83.

<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.231514.ERK1/2>

Kehat I, Molkentin JD (2010) Molecular Pathways Underlying Cardiac Remodeling During Pathophysiological Stimulation. *Circulation* 122:2727–2735.

<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.942268>

Kirali K, Kahveci G (2018) Aortic Root Pathologies. In: *New Approaches to Aortic Diseases from Valve to Abdominal Bifurcation*. Elsevier, pp 67–78

Koo H-K, Lawrence KA, Musini VM (2017) Beta-blockers for preventing aortic dissection in Marfan syndrome. *Cochrane Database Syst Rev*.

<https://doi.org/10.1002/14651858.CD011103.pub2>

Krovetz LJ, Lorincz AE, Schiebler GL (1965) Cardiovascular Manifestations of the Hurler Syndrome: Hemodynamic and Angiocardiographic Observations in 15 Patients. *Circulation* 31:132–141.

<https://doi.org/10.1161/01.CIR.31.1.132>

Krstic J, Santibanez JF (2014) Transforming growth factor-beta and matrix metalloproteinases: Functional interactions in tumor stroma-infiltrating myeloid cells. *Sci World J* 2014:.. <https://doi.org/10.1155/2014/521754>

Kubaski F, de Oliveira Poswar F, Michelin-Tirelli K, et al (2020) Mucopolysaccharidosis type I. *Diagnostics* 10:1–23. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10030161>

Lacro R V, Dietz HC, Wruck LM, et al (2007) Rationale and design of a randomized clinical trial of  $\beta$ -blocker therapy (atenolol) versus angiotensin II receptor blocker therapy (losartan) in individuals with Marfan syndrome.

<https://doi.org/10.1016/j.ahj.2007.06.024>

Leal GN, De Paula AC, Leone C, Kim CA (2010) Echocardiographic study of paediatric patients with mucopolysaccharidosis. *Cardiol Young* 20:254–261.

<https://doi.org/10.1017/S104795110999062X>

Lin HY, Chuang CK, Huang YH, et al (2016) Causes of death and clinical characteristics of 34 patients with Mucopolysaccharidosis II in Taiwan from 1995-2012 Dr.

Segolene Ayme. *Orphanet J Rare Dis* 11:1–7. <https://doi.org/10.1186/s13023-016-0471-6>

Lin SM, Lin HY, Chuang CK, et al (2014) Cardiovascular abnormalities in Taiwanese patients with mucopolysaccharidosis. *Mol Genet Metab* 111:493–498.

<https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2014.02.009>

Lindsay ME, Dietz HC (2011) Lessons on the pathogenesis of aneurysm from heritable conditions. *Nature* 473:308–316. <https://doi.org/10.1038/nature10145>

Liu CL, Guo J, Zhang X, et al (2018) Cysteine protease cathepsins in cardiovascular

- disease: From basic research to clinical trials. *Nat Rev Cardiol* 15:351–370.  
<https://doi.org/10.1038/s41569-018-0002-3>
- Lyle AN, Taylor WR (2019) The pathophysiological basis of vascular disease. *Lab Invest* 99:284–289. <https://doi.org/10.1038/s41374-019-0192-2>
- Lymperopoulos A, Rengo G, Koch WJ (2013) Adrenergic nervous system in heart failure: Pathophysiology and therapy. *Circ Res* 113:739–753.  
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.300308>
- Lyons J a, Dickson PI, Wall JS, et al (2011) Arterial pathology in canine mucopolysaccharidosis-I and response to therapy. *Lab Invest* 91:665–674.  
<https://doi.org/10.1038/labinvest.2011.7>
- Ma X, Tittiger M, Knutsen RH, et al (2008) Upregulation of elastase proteins results in aortic dilatation in mucopolysaccharidosis I mice. *Mol Genet Metab* 94:298–304.  
<https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2008.03.018>
- Matt P, Habashi J, Carrel T, et al (2008) Recent advances in understanding Marfan syndrome: Should we now treat surgical patients with losartan? *J Thorac Cardiovasc Surg* 135:389–394. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2007.08.047>
- Matte U, Yogalingam G, Brooks D, et al (2003) Identification and characterization of 13 new mutations in mucopolysaccharidosis type I patients. *Mol Genet Metab* 78:37–43. [https://doi.org/10.1016/S1096-7192\(02\)00200-7](https://doi.org/10.1016/S1096-7192(02)00200-7)
- Mazurek R, Dave JM, Chandran RR, et al (2017) *Vascular Cells in Blood Vessel Wall Development and Disease*, 1st edn. Elsevier Inc.
- Melo LG, Gnecci M, Ward CA, Dzau VJ (2007) *Vascular Remodeling in Health and Disease*. In: *Cardiovascular Medicine*. Springer London, London, pp 1541–1565
- Metcalfe J a, Linders B, Wu S, et al (2010) Upregulation of elastase activity in aorta in mucopolysaccharidosis I and VII dogs may be due to increased cytokine expression. *Mol Genet Metab* 99:396–407.  
<https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2009.12.003>
- Mohan UR, Hay a a, Cleary M a, et al (2002) Cardiovascular changes in children with mucopolysaccharide disorders. *Acta Paediatr* 91:799–804.  
<https://doi.org/10.1080/08035250213211>
- Muenzer J, Wraith JE, Clarke LA (2009) Mucopolysaccharidosis I: Management and treatment guidelines. *Pediatrics* 123:19–29. <https://doi.org/10.1542/peds.2008-0416>
- Müller AL, Dhalla NS (2012) Role of various proteases in cardiac remodeling and progression of heart failure. *Heart Fail Rev* 17:395–409.  
<https://doi.org/10.1007/s10741-011-9269-8>
- Mulvany MJ, Baumbach GL, Aalkjaer C, et al (1996) Vascular remodeling. *Hypertens (Dallas, Tex 1979)* 28:505–506
- Nataf P, Lansac E (2006) Dilation of the thoracic aorta: Medical and surgical management. *Heart* 92:1345–1352. <https://doi.org/10.1136/hrt.2005.074781>

- Nemes A, Timmermans RGM, Wilson JHP, et al (2008) The mild form of mucopolysaccharidosis type I (Scheie syndrome) is associated with increased ascending aortic stiffness. *Heart Vessels* 23:108–111. <https://doi.org/10.1007/s00380-007-1013-x>
- Neufeld EF, Muenzer J (2001) The Mucopolysaccharidoses. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. pp 3421–3454
- Osborn MJ, Webber BR, McElmurry RT, et al (2017) Angiotensin receptor blockade mediated amelioration of mucopolysaccharidosis type I cardiac and craniofacial pathology. *J Inherit Metab Dis* 40:281–289. <https://doi.org/10.1007/s10545-016-9988-z>
- Ostman-Smith I (2014) Beta-Blockers in Pediatric Hypertrophic Cardiomyopathies. *Rev Recent Clin Trials* 9:82–85. <https://doi.org/10.2174/1574887109666140908125158>
- Palpant NJ, Bedada FB, Peacock B, et al (2011) Cardiac disease in mucopolysaccharidosis type I attributed to catecholaminergic and hemodynamic deficiencies. *Am J Physiol Circ Physiol* 300:H356–H365. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00774.2010>
- Parenti G, Andria G, Ballabio A (2015) Lysosomal Storage Diseases: From Pathophysiology to Therapy. *Annu Rev Med* 66:471–486. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-122313-085916>
- Pastores GM, Arn P, Beck M, et al (2007) The MPS I registry: Design, methodology, and early findings of a global disease registry for monitoring patients with Mucopolysaccharidosis Type I. *Mol Genet Metab* 91:37–47. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2007.01.011>
- Platt FM, Boland B, van der Spoel AC (2012) Lysosomal storage disorders: The cellular impact of lysosomal dysfunction. *J Cell Biol* 199:723–734. <https://doi.org/10.1083/jcb.201208152>
- Platt FM, D’Azzo A, Davidson BL, et al (2018) Lysosomal storage diseases. *Nat Rev Dis Prim* 4:27. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0025-4>
- Poletto E, Pasqualim G, Giugliani R, et al (2018) Worldwide distribution of common IDUA pathogenic variants. *Clin Genet* 94:95–102. <https://doi.org/10.1111/cge.13224>
- Poswar F de O, de Souza CFM, Giugliani R, Baldo G (2019a) Aortic root dilatation in patients with mucopolysaccharidoses and the impact of enzyme replacement therapy. *Heart Vessels* 34:290–295. <https://doi.org/10.1007/s00380-018-1242-1>
- Poswar F, Vairo F, Burin M, et al (2019b) Lysosomal diseases: Overview on current diagnosis and treatment. *Genet Mol Biol* 42:165–177. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2018-0159>
- Purcell NH, Wilkins BJ, York A, et al (2007) Genetic inhibition of cardiac ERK1/2 promotes stress-induced apoptosis and heart failure but has no effect on hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 104:14074–14079.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0610906104>

- Rawla P, El Helou ML, Vellipuram AR (2019) Fluoroquinolones and the Risk of Aortic Aneurysm or Aortic Dissection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 17:3–10. <https://doi.org/10.2174/1871525717666190402121958>
- Renna NF, De Las Heras N, Miatello RM (2013) Pathophysiology of vascular remodeling in hypertension. *Int J Hypertens* 2013:. <https://doi.org/10.1155/2013/808353>
- Rentería VG, Ferrans VJ, Roberts WC (1976) The heart in the Hurler syndrome. *Am J Cardiol* 38:487–501. [https://doi.org/10.1016/0002-9149\(76\)90468-9](https://doi.org/10.1016/0002-9149(76)90468-9)
- Rosenkranz S (2004) TGF- $\beta$  1 and angiotensin networking in cardiac remodeling. *63:423–432*. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.04.030>
- Salim MA, Alpert BS, Ward JC, Pyeritz RE (1994) Effect of beta-adrenergic blockade on aortic root rate of dilation in the Marfan syndrome. *Am J Cardiol* 74:629–633. [https://doi.org/10.1016/0002-9149\(94\)90762-5](https://doi.org/10.1016/0002-9149(94)90762-5)
- Shi Y, Massagué J (2003) Mechanisms of TGF- $\beta$  signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113:685–700. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00432-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00432-X)
- Shimizu I, Minamino T (2016) Physiological and pathological cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 97:245–262. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2016.06.001>
- Shiojima I, Walsh K (2006) Regulation of cardiac growth and coronary angiogenesis by the Akt/PKB signaling pathway. *Genes Dev* 20:3347–3365. <https://doi.org/10.1101/gad.1492806>
- Simonaro CM, Haskins ME, Schuchman EH (2001) Articular chondrocytes from animals with a dermatan sulfate storage disease undergo a high rate of apoptosis and release nitric oxide and inflammatory cytokines: A possible mechanism underlying degenerative joint disease in the mucopolysaccharidoses. *Lab Invest* 81:1319–1328. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3780345>
- Siryk-Bathgate A, Dabul S, Lympelopoulos A (2013) Current and future G protein-coupled receptor signaling targets for heart failure therapy. *Drug Des Devel Ther* 7:1209–1222. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S35905>
- Sleeper MM, Kusiak CM, Shofer FS, et al (2008) Clinical characterization of cardiovascular abnormalities associated with feline mucopolysaccharidosis I and VI. *J Inher Metab Dis* 31:424–431. <https://doi.org/10.1007/s10545-008-0821-1>
- Taylor DB, Blaser SI, Burrows PE, et al (1991) Arteriopathy and coarctation of the abdominal aorta in children with mucopolysaccharidosis: imaging findings. *Am J Roentgenol* 157:819–823. <https://doi.org/10.2214/ajr.157.4.1909834>
- Ten Dijke P, Arthur HM (2007) Extracellular control of TGF $\beta$  signalling in vascular development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:857–869. <https://doi.org/10.1038/nrm2262>
- Tolar J, Braunlin E, Riddle M, et al (2009) Gender-related dimorphism in aortic insufficiency in murine mucopolysaccharidosis type I. *J Heart Valve Dis* 18:524–

- Unlu O, I. Almarzooq Z, Steitieh D, et al (2019) Diagnosis and Surveillance of Aortic Root Dilation. In: Aortic Aneurysm and Aortic Dissection [Working Title]. IntechOpen, p 38
- Van Varik BJ, Rennenberg RJMW, Reutelingsperger CP, et al (2012) Mechanisms of arterial remodeling: Lessons from genetic diseases. *Front Genet* 3:1–10. <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00290>
- Vellodi A (2005) Lysosomal storage disorders. *Br J Haematol* 128:413–431. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2004.05293.x>
- Vidal M, Wieland T, Lohse MJ, Lorenz K (2012)  $\beta$ -Adrenergic receptor stimulation causes cardiac hypertrophy via a G $\beta$ y/Erk-dependent pathway. *Cardiovasc Res* 96:255–264. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvs249>
- Volpi N, Maccari F, Galeotti F, et al (2013) Plasmatic dermatan sulfate and chondroitin sulfate determination in mucopolysaccharidoses. *J Pharm Biomed Anal* 85:40–45. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.06.026>
- Wang J, Gareri C, Rockman HA (2018) G-Protein–Coupled Receptors in Heart Disease. *Circ Res* 123:716–735. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.311403>
- White J V., Mazzacco SL (1996) Formation and growth of aortic aneurysms induced by adventitial elastolysis. *Ann N Y Acad Sci* 800:97–120. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1996.tb33302.x>
- Winchester B (2012) Classification of Lysosomal Storage Diseases. In: *Lysosomal Storage Disorders*. John Wiley & Sons, Ltd, Oxford, pp 37–46
- Wiseman DH, Mercer J, Tylee K, et al (2013) Management of mucopolysaccharidosis type IH (Hurler’s syndrome) presenting in infancy with severe dilated cardiomyopathy: A single institution’s experience. *J Inherit Metab Dis* 36:263–270. <https://doi.org/10.1007/s10545-012-9500-3>
- Wu L, Iwai M, Nakagami H, et al (2001) Roles of angiotensin II type 2 receptor stimulation associated with selective angiotensin II type 1 receptor blockade with valsartan in the improvement of inflammation-induced vascular injury. *Circulation* 104:2716–2721. <https://doi.org/10.1161/hc4601.099404>
- Xu F, Mao C, Hu Y, et al (2009) Cardiovascular Effects of Losartan and Its Relevant Clinical Application. *Curr Med Chem* 16:3841–3857. <https://doi.org/10.2174/092986709789178046>
- Yano S, Li C, Pavlova Z (2012) The Transforming Growth Factor-Beta Signaling Pathway Involvement in Cardiovascular Lesions in Mucopolysaccharidosis-I. *JIMD Rep* 4:55–58. [https://doi.org/10.1007/8904\\_2012\\_141](https://doi.org/10.1007/8904_2012_141)
- Yano S, Moseley K, Pavlova Z (2009) Postmortem studies on a patient with mucopolysaccharidosis type I: Histopathological findings after one year of enzyme replacement therapy. *J Inherit Metab Dis* 32:53–57. <https://doi.org/10.1007/s10545-009-1057-4>



- Zeng Z, Wang Q, Yang X, et al (2019) Phytomedicine Qishen granule attenuates cardiac fibrosis by regulating TGF- $\beta$  / Smad3 and GSK-3 $\beta$  pathway. *Phytomedicine* 62:152949. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.152949>
- Zhang YE (2009) Non-Smad pathways in TGF- $\beta$  signaling. *Cell Res* 19:128–139. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.328>
- Zhou Y, Poczatek MH, Berecek KH, Murphy-Ullrich JE (2006) Thrombospondin 1 mediates angiotensin II induction of TGF- $\beta$  activation by cardiac and renal cells under both high and low glucose conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 339:633–641. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.11.060>

## **ANEXOS**

---

## **PRODUÇÃO CIENTÍFICA RELACIONADA**

Neste item constam seis artigos publicados durante o período do doutorado na área de estudo.

# Progressive eye pathology in mucopolysaccharidosis type I mice and effects of enzyme replacement therapy

Esteban A. Gonzalez MSc<sup>1,2</sup> | Fernanda Visioli PhD<sup>3</sup> |  
Gabriela Pasqualim PhD<sup>1,2</sup> | Carolina F. M. de Souza MD PhD<sup>4</sup> |  
Diane R. Marinho MD PhD<sup>5,6</sup> | Roberto Giugliani MD PhD<sup>1,2,4</sup> |  
Ursula Matte PhD<sup>1,2</sup> | Guilherme Baldo PhD<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Gene Therapy Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

<sup>2</sup>Postgraduate Program in Genetics and Molecular Biology, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

<sup>3</sup>Oral Pathology, School of Dentistry, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

<sup>4</sup>Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

<sup>5</sup>Department of Ophthalmology, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

<sup>6</sup>Ophthalmology Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

## Correspondence

Guilherme Baldo, Gene Therapy Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre RS 90035-903, Brazil.  
Email: gbaldo@hcpa.edu.br

## Abstract

**Background:** Mucopolysaccharidosis type I (MPS I) is a lysosomal storage disorder caused by  $\alpha$ -L-iduronidase deficiency, resulting in accumulation of glycosaminoglycans (GAG). Ophthalmological manifestations are common in MPS I patients and often lead to visual impairment. Accumulation of GAG in corneal or retinal tissues reduces vision causing corneal opacity and neurosensory complications. One available treatment for MPS I patients is enzyme replacement therapy (ERT), but the results of such treatment on eye disease are still debatable. Therefore, we aimed to determine the progression of ocular manifestations as well as the effectiveness of intravenous ERT in MPS I.

**Methods:** Corneal and retinal analyses were performed in eyes from 2- to 8-month normal and MPS I mice. Some MPS I mice received ERT (1.2 mg/kg of laronidase) every 2 weeks from 6 to 8 months and histological findings were compared with controls. Additionally, cornea from two MPS I patients under ERT were evaluated.

**Results:** Mouse corneal tissues had GAG accumulation early in life. In the retina, we found a progressive loss of photoreceptor cells, starting at 6 months. ERT did not improve or stabilize the histological abnormalities. MPS I patients, despite being on ERT for over a decade, presented GAG accumulation in the cornea, corneal thickening, visual loss and needed corneal transplantation.

**Conclusion:** We provide data on the time course of ocular alteration in MPS I mice. Our results also suggest that ERT is not effective in treating the progressive ocular manifestations in MPS I mice and fails to prevent corneal abnormalities in patients.

## KEYWORDS

corneal opacity, enzyme replacement therapy, mucopolysaccharidosis type I, retinal abnormality, Scheie, Hurler and Hurler-Scheie syndrome



Acesso versão digital disponível no QR Code

DOI: 10.1111/ceo.13713



Article

# Cathepsin B-associated Activation of Amyloidogenic Pathway in Murine Mucopolysaccharidosis Type I Brain Cortex

Gustavo Monteiro Viana <sup>1,\*</sup>, Esteban Alberto Gonzalez <sup>2</sup>, Marcela Maciel Palacio Alvarez <sup>1</sup>, Renan Pelluzzi Cavalheiro <sup>1</sup>, Cinthia Castro do Nascimento <sup>3</sup>, Guilherme Baldo <sup>2</sup>, Vânia D'Almeida <sup>3</sup>, Marcelo Andrade de Lima <sup>4</sup>, Alexey V. Pshezhetsky <sup>5,\*</sup> and Helena Bonciani Nader <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Biochemistry, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, SP 04044-020, Brazil; mpalvarez.marcela@gmail.com (M.M.P.A.); rpcavalheiro@gmail.com (R.P.C.); hbnader@unifesp.br (H.B.N.)

<sup>2</sup> Gene Therapy Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS 90035-903, Brazil; esteban078@gmail.com (E.A.G.); gbaldo@hcpa.edu.br (G.B.)

<sup>3</sup> Department of Psychobiology, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, SP 04024-002, Brazil; cinthiacn@gmail.com (C.C.d.N.); vaniadalmeida@uol.com.br (V.D.)

<sup>4</sup> Molecular & Structural Biosciences, School of Life Sciences, Keele University, Huxley Building, Keele, Staffordshire ST5 5BG, UK; mlimagb@gmail.com

<sup>5</sup> Division of Medical Genetics, CHU Ste-Justine Research Centre, Montreal, QC H3T 1C5, Canada

\* Correspondence: gviana@unifesp.br (G.M.V.); alexei.pchejetski@umontreal.ca (A.V.P.); Tel.: +55-11-55764438 (ext. 1188) (G.M.V.); Tel.: +1 (514)-345-4931 (ext. 2736) (A.V.P.)

Received: 22 January 2020; Accepted: 12 February 2020; Published: 20 February 2020



**Abstract:** Mucopolysaccharidosis type I (MPS I) is caused by genetic deficiency of  $\alpha$ -L-iduronidase and impairment of lysosomal catabolism of heparan sulfate and dermatan sulfate. In the brain, these substrates accumulate in the lysosomes of neurons and glial cells, leading to neuroinflammation and neurodegeneration. Their storage also affects lysosomal homeostasis-inducing activity of several lysosomal proteases including cathepsin B (CATB). In the central nervous system, increased CATB activity has been associated with the deposition of amyloid plaques due to an alternative pro-amyloidogenic processing of the amyloid precursor protein (APP), suggesting a potential role of this enzyme in the neuropathology of MPS I. In this study, we report elevated levels of protein expression and activity of CATB in cortex tissues of 6-month-old MPS I (*Idua*<sup>-/-</sup> mice). Besides, increased CATB leakage from lysosomes to the cytoplasm of *Idua*<sup>-/-</sup> cortical pyramidal neurons was indicative of damaged lysosomal membranes. The increased CATB activity coincided with an elevated level of the 16-kDa C-terminal APP fragment, which together with unchanged levels of  $\beta$ -secretase 1 was suggestive for the role of this enzyme in the amyloidogenic APP processing. Neuronal accumulation of Thioflavin-S-positive misfolded protein aggregates and drastically increased levels of neuroinflammatory glial fibrillary acidic protein (GFAP)-positive astrocytes and CD11b-positive activated microglia were observed in *Idua*<sup>-/-</sup> cortex by confocal fluorescent microscopy. Together, our results point to the existence of a novel CATB-associated alternative amyloidogenic pathway in MPS I brain induced by lysosomal storage and potentially leading to neurodegeneration.

**Keywords:** glycosaminoglycans; cathepsin B; Alzheimer's disease; amyloid precursor protein; lysosomes; neuroinflammation



Acesso versão digital disponível no QR Code

DOI: 10.3390/ijms21041459





## ORIGINAL ARTICLE

## Estimated birth prevalence of mucopolysaccharidoses in Brazil

Andressa Federhen<sup>1</sup> | Gabriela Pasqualim<sup>2,3</sup> | Talita Freitas de Freitas<sup>4</sup> |  
 Esteban Alberto Gonzalez<sup>2</sup> | Franciele Trapp<sup>3,5</sup> | Ursula Matte<sup>1,2,6</sup> |  
 Roberto Giugliani<sup>1,2,3,5,6,7</sup>

<sup>1</sup>Postgraduate Program in Child and Adolescent Health, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>2</sup>Postgraduate Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>3</sup>Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

<sup>4</sup>School of Chemistry, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>5</sup>Postgraduate Program in Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>6</sup>Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>7</sup>Instituto Nacional de Genética Médica Populacional/INAGEMP, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

**Correspondence**

Andressa Federhen, Rua Castilho 155/243A, São Paulo, SP, 04568-010 Brazil.  
 Email: andressa.federhen@gmail.com

**Funding information**

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Grant/Award Numbers: 166712/2014-0, 465549/2014, 573993/2008-4; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Grant/Award Number: 88887.136366/2017-00; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul, Grant/Award Number: 16/2014-4; Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Grant/Award Numbers: 15-0450, 16-0398; Instituto Nacional de Genética Médica Populacional

**Abstract**

Several studies have been published on the frequency of the mucopolysaccharidoses (MPS) in different countries. The objective of the present study was to estimate the birth prevalence (BP) of MPS in Brazil. MPS diagnosis registered at MPS-Brazil Network and in Instituto Vidas Raras were reviewed. BP was estimated by (a) the number of registered patients born between 1994 and 2015 was divided by the number of live births (LBs), and (b) a sample of 1,000 healthy individuals was tested for the most frequent variant in *IDUA* gene in MPS I (p.Trp402Ter) to estimate the frequency of heterozygosity and homozygosity. (a) The BP based on total number of LBs was (cases per 100,000 LBs): MPS overall: 1.25; MPS I: 0.24; MPS II: 0.37; MPS III: 0.21; MPS IV: 0.14; MPS VI: 0.28; MPS VII: 0.02. (b) The overall frequency of p.Trp402Ter was 0.002. Considering the frequency of heterozygotes for the p.Trp402Ter *IDUA* variant in the RS state, the frequency of this variant among MPS I patients and the relative frequency of the different MPSs, we estimated the birth prevalence of MPS in total and of each MPS type, as follows: MPS overall: 4.62; MPS I: 0.95; MPS II: 1.32; MPS III: 0.56; MPS IV: 0.57; MPS VI: 1.02; MPS VII: 0.05. This study provided original data about BP and relative frequency of the MPS types, in Brazil, based on the frequency of the commonest *IDUA* pathogenic variant and in the records of two large patient databases.

**KEYWORDS**

birth prevalence, epidemiology, frequency, heterozygosity, mucopolysaccharidoses




Acesso versão digital disponível no QR Code

DOI: 10.1002/ajmg.a.61456



## Evidence for inflammasome activation in the brain of mucopolysaccharidosis type II mice

A. S. Azambuja<sup>1,2</sup> · L. N. Pimentel-Vera<sup>2,3</sup> · E. A. Gonzalez<sup>2,3</sup> · E. Poletto<sup>2,3</sup> · C. V. Pinheiro<sup>2</sup> · U. Matte<sup>2,3</sup> · R. Giugliani<sup>2,3</sup> · Guilherme Baldo<sup>1,2,3</sup> 

Received: 9 January 2020 / Accepted: 23 June 2020  
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020

### Abstract

Hunter syndrome or mucopolysaccharidosis type II (MPS II) is an X-linked recessive disease caused by the deficiency of iduronate 2-sulfatase (IDS), leading to storage of undegraded heparan and dermatan sulfate. Patients with the severe form present neurological abnormalities, but the mechanisms of such alterations are unknown. Here, we hypothesized that the undegraded substances found in this disease could be recognized as damage-associated molecular patterns (DAMPs), leading to activation of the inflammasome. Brains from 2 and 5 months normal and MPS II mice were studied. We observed an increase in cathepsin B activity in the brain tissue and leakage of this enzyme from the lysosome to the cytoplasm in a MPS II neuronal cell line, which is a known activator of the inflammasome. Furthermore, Caspase-1 activity and IL-1-beta levels were elevated at 5 months, confirming that this pathway is indeed altered. Our results suggest that undegraded GAG activate the inflammasome pathway in MPS II and future studies could focus on blocking such pathway to better understand the role of this process to the pathogenesis of MPS II.

**Keywords** Mucopolysaccharidosis type II · Hunter syndrome · Inflammasome · NRLP3 · Caspase-1 · Interleukin-1-beta · CRISPR-Cas9



Acesso versão digital disponível no QR Code

DOI: 10.1007/s11011-020-00592-5



# Neonatal nonviral gene editing with the CRISPR/Cas9 system improves some cardiovascular, respiratory, and bone disease features of the mucopolysaccharidosis I phenotype in mice

Roselena Silvestri Schuh<sup>1,2</sup> · Esteban Alberto Gonzalez<sup>1,3</sup> · Angela Maria Vicente Tavares<sup>1,4</sup> · Bruna Gazzi Seolin<sup>4</sup> · Lais de Souza Elias<sup>1</sup> · Luisa Natalia Pimentel Vera<sup>1,3</sup> · Francyne Kubaski<sup>3</sup> · Edina Poletto<sup>1,3</sup> · Roberto Giugliani<sup>1,3</sup> · Helder Ferreira Teixeira<sup>2</sup> · Ursula Matte<sup>1,3</sup> · Guilherme Baldo<sup>1,3,4</sup>

Received: 30 October 2018 / Revised: 9 October 2019 / Accepted: 19 November 2019  
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Limited 2019

## Abstract

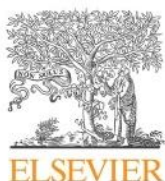
Mucopolysaccharidosis type I (MPS I) is caused by deficiency of alpha-L-iduronidase (IDUA), leading to multisystemic accumulation of glycosaminoglycans (GAG). Untreated MPS I patients may die in the first decades of life, mostly due to cardiovascular and respiratory complications. We previously reported that the treatment of newborn MPS I mice with intravenous administration of liposomal CRISPR/Cas9 complexes carrying the murine *Idua* gene aiming at the *ROSA26* locus resulted in long-lasting IDUA activity and GAG reduction in various tissues. Following this, the present study reports the effects of gene editing in cardiovascular, respiratory, bone, and neurologic functions in MPS I mice. Bone morphology, specifically the width of zygomatic and femoral bones, showed partial improvement. Although heart valves were still thickened, cardiac mass and aortic elastin breaks were reduced, with normalization of aortic diameter. Pulmonary resistance was normalized, suggesting improvement in respiratory function. In contrast, behavioral abnormalities and neuroinflammation still persisted, suggesting deterioration of the neurological functions. The set of results shows that gene editing performed in newborn animals improved some manifestations of the MPS I disorder in bone, respiratory, and cardiovascular systems. However, further studies will be imperative to find better delivery strategies to reach “hard-to-treat” tissues to ensure better systemic and neurological effects.



Acesso versão digital disponível no QR Code

DOI: 10.1038/s41434-019-0113-4





## *In vivo* genome editing of mucopolysaccharidosis I mice using the CRISPR/Cas9 system

Roselena Silvestri Schuh<sup>a,b</sup>, Édina Poletto<sup>a,d</sup>, Gabriela Pasqualim<sup>a,d</sup>,  
Angela Maria Vicente Tavares<sup>a,c</sup>, Fabíola Shons Meyer<sup>a</sup>, Esteban Alberto Gonzalez<sup>a,d</sup>,  
Roberto Giugliani<sup>a,d</sup>, Ursula Matte<sup>a,d</sup>, Helder Ferreira Teixeira<sup>b</sup>, Guilherme Baldo<sup>a,c,d,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Terapia Gênica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, R. Ramiro Barcelos 2350, 90035-903 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Faculdade de Farmácia, Av. Ipiranga 2752, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup> Programa de Pós-Graduação em Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Instituto de Ciências Básicas da Saúde, R. Sarmento Leite, 500, 90035-190 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>d</sup> Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Departamento de Genética, Campus do Vale, Av. Bento Gonçalves, 9500, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

CRISPR/Cas  
Genome editing  
Liposome  
Lysosomal storage disease  
Mucopolysaccharidosis type I  
Nonviral vector

### ABSTRACT

Mucopolysaccharidosis type I (MPS I) is a multisystemic disorder caused by the deficiency of alpha-L-iduronidase (IDUA) that leads to intracellular accumulation of glycosaminoglycans (GAG). In the present study we aimed to use cationic liposomes carrying the CRISPR/Cas9 plasmid and a donor vector for *in vitro* and *in vivo* MPS I gene editing, and compare to treatment with naked plasmids. The liposomal formulation was prepared by microfluidization. Complexes were obtained by the addition of DNA at +4/−1 charge ratio. The overall results showed complexes of about 110 nm, with positive zeta potential of +30 mV. The incubation of the complexes with fibroblasts from MPS I patients led to a significant increase in IDUA activity and reduction of lysosomal abnormalities. Hydrodynamic injection of the liposomal complex in newborn MPS I mice led to a significant increase in serum IDUA levels for up to six months. The biodistribution of complexes after hydrodynamic injection was markedly detected in the lungs and heart, corroborating the results of increased IDUA activity and decreased GAG storage especially in these tissues, while the group that received the naked plasmids presented increased enzyme activity especially in the liver. Furthermore, animals treated with the liposomal formulation presented improvement in cardiovascular parameters, one of the main causes of death observed in MPS I patients. We conclude that the IDUA production in multiple organs had a significant beneficial effect on the characteristics of MPS I disease, which may bring hope to gene therapy of Hurler patients.



Acesso versão digital disponível no QR Code

DOI: 10.1016/j.jconrel.2018.08.031

