

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

CAMILA VIEIRA PINHEIRO

**ALTERAÇÕES NA HOMEOSTASE MITOCONDRIAL EM CAMUNDONGOS
COM MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO II**

Porto Alegre

2024

Camila Vieira Pinheiro

**ALTERAÇÕES NA HOMEOSTASE MITOCONDRIAL EM CAMUNDONGOS
COM MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO II**

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

Orientador: Prof. Dr. Guilhian Leipnitz

Coorientador: Prof. Dr. Guilherme Baldo

Porto Alegre

2024

CIP - Catalogação na Publicação

Pinheiro, Camila Vieira
ALTERAÇÕES NA HOMEOSTASE MITOCONDRIAL EM
CAMUNDONGOS COM MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO II / Camila
Vieira Pinheiro. -- 2024.
113 f.
Orientador: Guilhian Leipnitz.

Coorientador: Guilherme Baldo.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Fisiologia, Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. Mucopolissacaridose tipo II. 2. Homeostase
mitocondrial. 3. Homeostase redox. 4. Fígado. 5.
Córtex cerebral e Coração. I. Leipnitz, Guilhian,
orient. II. Baldo, Guilherme, coorient. III. Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. César Augusto João Ribeiro

Universidade Federal do ABC
Centro de Ciências Naturais e Humanas

Profa. Dra. Ursula da Silveira Matte

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Departamento de Genética

Prof. Dr. Alex Sander da Rosa Araujo

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Departamento de Fisiologia

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo ensino de excelência, ao PPG fisiologia e ao departamento de bioquímica pelo suporte com uma base sólida e de qualidade para o desenvolvimento desse trabalho, a todos os professores e funcionários que passaram por mim durante esse período do doutorado que com certeza acrescentaram em muito na minha experiência.

Ao CNPq, CAPES e FAPERGS pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador, professor Dr. Guilhian Leipnitz, por me aceitar em seu grupo e acreditar no meu trabalho. Muito obrigado por todo suporte dado e por ter aceitado esse projeto um pouco desafiador. Seus ensinamentos, parceria e paciência foram fundamentais para essa jornada.

Ao meu coorientador, professor Dr. Guilherme Baldo. Muito obrigado por não ter desistido de mim e me incentivado a fazer a seleção do doutorado no PPG da Fisiologia (mesmo sem mestrado), me emprestando inclusive o seu próprio Guyton pra que eu pudesse estudar. Um carinho e admiração que se iniciou lá em 2016 na Iniciação Científica e que permanece atual. E obrigado também por ter me apresentado ao prof. Guilhian.

Um agradecimento muito especial também para os professores Alexandre Amaral e Moacir Wajner, pelo acolhimento e suporte científico durante todo esse período.

Aos meus colegas e amigos com quem tive a oportunidade de conviver durante esse tempo, por todos que passaram pelos labs 38, 34 e 27. Ao Rafa e a Ana que foram os primeiros a me receber de forma carinhosa e acolhedora no lab, me ensinando praticamente todas as técnicas, além das conversas profundas e risadas sinceras. A Morgana que logo se tornou parte do clã e junto ao Andrey e o Rafa, formamos nosso grupinho de viagens (que foram de suma importância pra mim). Após veio a convivência e carinho da Manu, Josy e mais recentemente a Jaque; que foram meu ombro amigo para muitas das minhas angustias, obrigada por tornarem as coisas mais leves.

Aos amigos da graduação que permaneceram ao meu lado durante esse trabalho, sempre prontos para escutar um desabafo, dar um conselho, tirar dúvidas e desopilar um pouco desse mundo doido.

As minhas amigas da vida, Karol e Giovana. Nossa amizade é de anos e para muitos anos ainda. Vocês foram fundamentais principalmente no período da pandemia, onde a gente pode se manter presente na vida uma da outra fazendo com que aquela fase fosse menos complicada.

A minha família em geral, mas principalmente aos meus pais Roseli e Lucival, a quem devo tudo! Sou extremamente grata por ter pais tão carinhosos e que sempre me deram suporte para que eu fosse atrás dos meus sonhos, sempre me incentivando e estando ao meu lado. Tudo é por vocês e para vocês!!! Obrigado por tanto amor e orgulho.

“It is sometimes said that scientists are unromantic, that their passion to figure out robs the world of beauty and mystery. But is it not stirring to understand how the world actually works — that white light is made of colors, that color is the way we perceive the wavelengths of light, that transparent air reflects light, that in so doing it discriminates among the waves, and that the sky is blue for the same reason that the sunset is red? It does no harm to the romance of the sunset to know a little bit about it.”

- Carl Sagan (Pale Blue Dot: A Vision of the Human Future in Space).

RESUMO

A mucopolissacaridose do tipo II (MPS II) é uma doença lisossômica de depósito causada por variantes patogênicas no gene que codifica a enzima iduronato-2-sulfatase (IDS). Portanto, na MPS II, a enzima está deficiente, o que resulta no acúmulo de substratos não clivados dentro dos lisossomos, os glicosaminoglicanos (GAGs). Como consequência do acúmulo de GAGs não hidrolisados no interior dos lisossomos, há um aumento do tamanho e número dessa organela, culminando no aumento do tamanho celular. A MPS II é uma doença multissistêmica, tendo como manifestações clínicas hepatoesplenomegalia, comprometimento cognitivo, distúrbios comportamentais, problemas cardiorrespiratórios, dentre outros. Visto que a fisiopatologia da MPS II não é totalmente compreendida, avaliamos nesta tese o papel da homeostase mitocondrial na fisiopatologia dessa doença. As mitocôndrias são organelas importantes para a produção de ATP, homeostase do cálcio, produção de espécies reativas, sinalização e morte celular, além de terem pontos de contato físico com os lisossomos. Enfatize-se aqui que vários distúrbios do sistema periférico e do sistema nervoso central vem sendo associados a alterações na função mitocondrial. Portanto, neste trabalho foram avaliados parâmetros da função mitocondrial em fígado, coração e córtex cerebral de camundongos nocautes para a IDS (camundongos MPS II) de 6 meses de idade. No capítulo I desta tese, foi verificada uma diminuição na atividade da α -cetoglutarato desidrogenase e um aumento nas atividades da succinato desidrogenase, malato desidrogenase e complexo I da cadeia respiratória mitocondrial em fígado de camundongos MPS II, sugerindo alterações na bioenergética. Além disso, foi visto um aumento nos níveis de malondialdeído e na oxidação de 2',7'-diclorofluoresceína, indicando indução de peroxidação lipídica e aumento nos níveis de espécies reativas, respectivamente. Ainda, os níveis de grupamentos sulfidrilas e de glutatona reduzida, bem como as atividades da glutatona peroxidase, superóxido dismutase e catalase foram aumentadas no fígado dos animais nocaute. Finalmente, foi observada uma redução no conteúdo de Drp1, VDAC1 e COX IV bem como aumento de OPA1, indicando alterações na dinâmica e massa mitocondrial. Já no capítulo II, foi verificada uma alteração em proteínas envolvidas na interação entre mitocôndrias e lisossomos. Foi observada diminuição no conteúdo da TBC1D15 no córtex cerebral e coração de animais MPS II, e aumento no conteúdo de Rab7 apenas no coração. Também foram encontradas alterações no controle de qualidade mitocondrial, como a redução dos níveis de Drp1 (diminuição da fissão) e aumento de VDAC e COX IV (aumento da massa mitocondrial) no córtex cerebral e no coração dos animais MPS

II. Já com relação à mitofagia, houve diminuição da Parkin no córtex cerebral e aumento no coração dos animais deficientes. Quanto à bioenergética, foi verificada redução nas atividades da citrato sintase e malato desidrogenase no córtex cerebral, e redução nas atividades da isocitrato desidrogenase, creatina cinase e piruvato cinase, bem como da respiração mitocondrial no coração de camundongos MPS II. Além disso, houve um aumento moderado na peroxidação lipídica apenas no coração. Nossos achados indicam que estresse oxidativo, disfunção bioenergética, e alterações na dinâmica mitocondrial e mitofagia estão envolvidas nas anormalidades hepática e cardíaca bem como nas manifestações neurológicas observadas na MPS II. Além disso, vimos que alterações na comunicação entre mitocôndrias e lisossomos também podem contribuir para explicar o dano neurológico e cardíaco dessa doença.

Palavras-chaves: Mucopolissacaridose tipo II; Homeostase mitocondrial; Homeostase redox; Fígado; Córtex cerebral; Coração.

ABSTRACT

Mucopolysaccharidosis type II (MPS II) is a lysosomal storage disease caused by mutations in the gene that encodes the enzyme iduronate-2-sulfatase (IDS). Therefore, in MPS II, the deficient enzymatic activity results in the accumulation of undegraded substrates within the lysosomes, the glycosaminoglycans (GAGs). As a consequence of GAG accumulation, there is an increase in the size and number of lysosomes, culminating in an increased cell size. MPS II is a multisystemic disorder characterized by hepatosplenomegaly, cognitive impairment, behavioral disorders, and cardiorespiratory abnormalities, among others. Since the pathophysiology of MPS II is not fully understood, this thesis investigated on role of mitochondrial homeostasis in the pathophysiology of this disease. Mitochondria are important organelles for ATP production, calcium homeostasis, production of reactive oxygen species, signaling, and cell death. It should be emphasized here that various disorders of the peripheral and central nervous systems have been associated with alterations in mitochondrial function. Therefore, in this work, we evaluated mitochondrial homeostasis in the liver, heart, and cerebral cortex of 6-month-old IDS knockout mice (MPS II mice). In chapter I of this thesis, we verified a decrease in the activity of α -ketoglutarate dehydrogenase and an increase in the activities of succinate dehydrogenase, malate dehydrogenase, and complex I of the mitochondrial respiratory chain in the liver of MPS II mice, indicating alterations in bioenergetics. Furthermore, an increase in malondialdehyde levels and 2',7'-dichlorofluorescein oxidation was seen, suggesting induction of lipid peroxidation and increased levels of reactive species, respectively. In addition, the levels of sulfhydryl groups and reduced glutathione, as well as the activities of glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase were increased in the liver of the knockout animals. Finally, a reduction in the content of Drp1, VDAC1, and COX IV along with increased OPA1 was seen, indicating alterations in mitochondrial dynamics and mass. In chapter II, changes were observed in proteins involved in the interaction between mitochondria and lysosomes. There was a decrease in TBC1D15 content in the cerebral cortex and heart of MPS II animals, and an increase in Rab7 content only in the heart. Changes in mitochondrial quality control were also found, including reduced Drp1 levels (reduced fission) and increased VDAC and COX IV levels (increased mitochondrial mass) in the cerebral cortex and heart of MPS II animals. Regarding mitophagy, there was a decrease in Parkin levels in the cerebral cortex and an increase of this protein in the heart of deficient animals. As for bioenergetics, there was a reduction in the activities of citrate

synthase and malate dehydrogenase in the cerebral cortex, and a reduction in the activities of isocitrate dehydrogenase, creatine kinase, and pyruvate kinase, as well as mitochondrial respiration in the hearts of MPS II mice. Moreover, there was a moderate increase in lipid peroxidation only in the heart. Our findings indicate that oxidative stress, bioenergetic dysfunction, and changes in mitochondrial dynamics and mitophagy are involved in the hepatic and cardiac abnormalities as well as the neurological manifestations observed in MPS II. Furthermore, we verified that changes in communication between mitochondria and lysosomes can also explain the neurological and cardiac damage caused by this disease.

Keywords: Mucopolysaccharidosis type II; Mitochondrial homeostasis; Redox homeostasis; Liver; Cerebral cortex; Heart.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Ilustração do acúmulo de substratos não hidrolisados no interior dos lisossomos, causando aumento da organela.....16
- Figura 2** – Ilustração das primeiras etapas da degradação dos glicosaminoglicanos (GAGs) dermatan sulfato (DS) e heparan sulfato (HS).....18
- Figura 3** – Esquema mostrando o ciclo do ácido cítrico (CAC) e os complexos da cadeia transportadora de elétrons, junto com a ATP sintase. A representação também mostra o gradiente eletroquímico formado.....23
- Figura 4** – Processos que fazem parte da manutenção e controle de qualidade mitocondrial, sendo eles a dinâmica mitocondrial (fissão e fusão), biogênese mitocondrial e mitofagia.....25
- Figura 5** – Ilustração de EROs e os danos que eles podem causar às células, e o sistema de defesa antioxidante.....27
- Figura 6** – Interações entre mitocôndrias e lisossomos.....28
- Figura 7** – Resumo dos resultados encontrados no córtex cerebral, coração e fígado de animais MPS II aos 6 meses de idade.....99
- Figura 8** – Defesas antioxidantes não enzimáticas e enzimáticas no fígado de camundongos MPS II com 2, 4 e 6 meses de idade.....111
- Figura 9** – Níveis de espécies reativas e dano oxidativo no fígado de camundongos MPS II com 4 e 6 meses de idade.....112

LISTA DE ABREVIATURAS

- ATP – Adenosina trifosfato
- CAC – Ciclo do ácido cítrico
- CAT – Catalase
- CK – Creatina cinase
- CS – Citrato sintase
- CTE – Cadeia transportadora de elétrons
- DCFH – 2',7'- diclorofluoresceína
- DS – Dermatan sulfato
- ERN – Espécies reativas de nitrogênio
- ERO – Espécies reativas de oxigênio
- FADH₂ – Flavina adenina nucleotídeo reduzido
- GAGs – Glicosaminoglicanos
- GPx – Glutaciona peroxidase
- GR – Glutaciona redutase
- GSH – Glutaciona reduzida
- GST – Glutaciona S- transferase
- H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
- HS – Heparan sulfato
- IDH – Isocitrato desidrogenase
- IDS – Iduronato-2-sulfatase
- LDH – Lactato desidrogenase
- LSD – *Lysosomal storage disease*
- MDA – Malondialdeído
- MDH – Malato desidrogenase
- MPS II – Mucopolissacaridose tipo II
- NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
- NO• – Óxido nítrico
- O₂ – Oxigênio molecular

$O_2^{\cdot-}$ – Ânion superóxido

OH^{\cdot} – Radical hidroxila

$ONOO^{\cdot}$ – Peroxinitrito

PK – Piruvato cinase

SDH – Succinato desidrogenase

SNC – Sistema nervoso central

SOD – Superóxido dismutase

WT – *Wild type*

α -KGDH – α -Cetoglutarato desidrogenase

$\Delta\Psi_m$ – Potencial de membrana mitocondrial

SUMÁRIO

PARTE I – <i>Introdução e objetivos</i>	15
1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Mucopolissacaridose tipo II	18
1.1.1. Aspectos gerais.....	18
1.1.2. Sintomatologia.....	19
1.1.3. Diagnóstico e tratamento	19
1.1.4. Modelo animal de MPS II	21
1.2. Homeostase mitocondrial.....	22
1.2.1. Bioenergética mitocondrial.....	22
1.2.2. Controle de qualidade mitocondrial	24
1.2.3. Homeostase redox	26
1.3. Comunicação entre lisossomos e mitocôndrias.....	28
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	29
2.1. Justificativa.....	29
2.2. Objetivo geral.....	29
2.3. Objetivos específicos.....	30
PARTE II – <i>Artigos científicos</i>	31
CAPÍTULO I.....	32
CAPÍTULO II	60
PARTE III – <i>Discussão geral</i>	90
3. DISCUSSÃO	91
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	97
5. REFERÊNCIAS.....	100
6. ANEXOS	109
6.1. Resultados adicionais	109
6.2. Carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).....	113
6.3. Carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)	114

PARTE I – *Introdução e objetivos*

1. INTRODUÇÃO

Os lisossomos são organelas celulares que possuem uma variedade de enzimas hidrolíticas que atuam em ambiente ácido. Essas enzimas hidrolisam uma ampla gama de macromoléculas e desempenham um papel essencial na degradação de materiais extra e intracelulares, os quais são direcionados aos lisossomos por meio dos processos de endocitose ou autofagia, respectivamente (SETTEMBRE *et al.*, 2013). As doenças de depósito lisossômico (LSD, do inglês *lysosomal storage disease*) ocorrem quando há a deficiência de alguma proteína lisossomal, decorrente de mutações genéticas, levando ao acúmulo dos substratos (Figura 1) (PLATT; BOLAND; SPOEL, 2012).

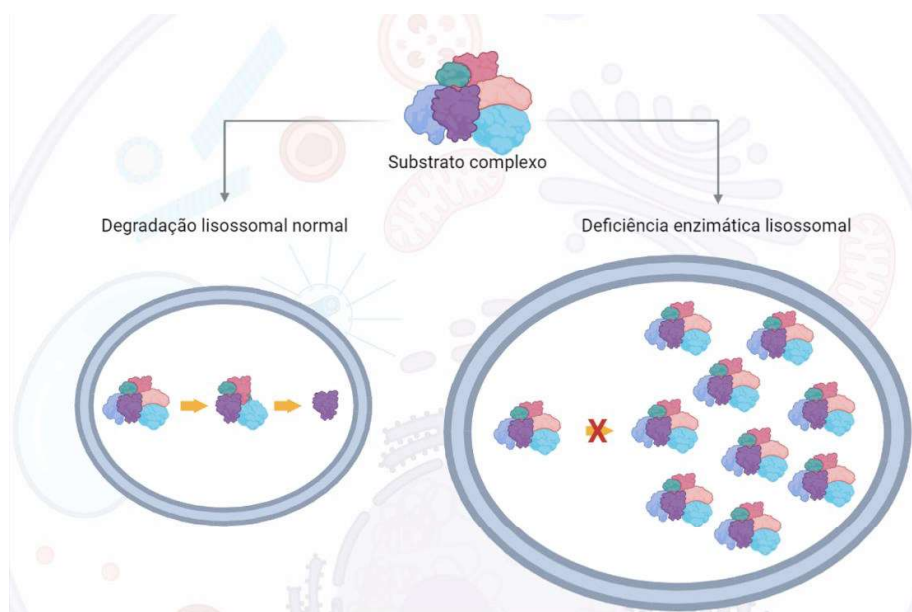


Figura 1: Ilustração do acúmulo de substratos não hidrolisados no interior dos lisossomos, causando aumento da organela. Fonte: A autora. Criada com BioRender.

Segundo o site do *WORLDSymposia*[®], existe um total de 66 doenças classificadas como LSD, dentre as quais existe um grupo chamado de mucopolissacaridoses (MPS). Há sete tipos de MPS causadas pela deficiência de alguma enzima envolvida no processo de hidrólise dos glicosaminoglicanos (GAGs), ocasionando o acúmulo dessas moléculas (NEUFELD; MUENZER, 2001). Os GAGs são componentes importantes na matriz extracelular, atuando na manutenção de diversos processos celulares, como fluidez, locomoção celular e troca de metabólitos (JACKSON; BUSCH; CARDIN, 1991). Em condições fisiológicas, após os GAGs cumprirem seu papel na matriz extracelular, eles são direcionados aos lisossomos, onde serão degradados em partes menores por diferentes

enzimas (GRIFFIN; GLOSTER, 2017). Existem diferentes GAGs que podem estar acumulados nas MPSs, como, por exemplo, o heparan sulfato (HS), dermatan sulfato (DS), queratan sulfato (KS), condroitin sulfato (CS) e ácido hialurônico (HA). Diferentes enzimas estão envolvidas em cada etapa de degradação de cada GAG (NEUFELD; MUENZER, 2001). A tabela 1 abaixo mostra a relação dos diferentes tipos de MPS que existem, com o respectivo gene mutado e enzima deficiente, bem como os GAGs que estão acumulados em cada uma.

Tabela 1: Tipos de mucopolissacaridoses, genes mutados, enzimas codificadas e glicosaminoglicanos (GAGs) acumulados em cada doença.

Tipo	Subtipo	Gene mutado	Enzima deficiente	GAGs acumulado
MPS I	Hurler	<i>IDUA</i>	α -L-iduronidase	HS, DS
	Hurler/Scheie			
	Scheie			
MPS II		<i>IDS</i>	Iduronato-2-sulfatase	HS, DS
MPS III	A	<i>SGSH</i>	Heparan-N-sulfatase	HS
	B	<i>NAGLU</i>	α -N-Acetilglicosaminidase	HS
	C	<i>HGSNAT</i>	α -Glicosaminidase acetiltransferase	HS
	D	<i>GNS</i>	N-Acetilglicosamina-6-sulfatase	HS
MPS IV	A	<i>GALNS</i>	N-Acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatase	KS, C6S
	B	<i>GLBI</i>	β -Galactosidase	KS
MPS VI		<i>ARSB</i>	N-Acetilgalactosamina-4-sulfatase	DS, C4S
MPS VII		<i>GUSB</i>	β -Glicuronidase	DS, HS, C4S, C6S
MPS IX		<i>HYAL1</i>	Hialuronidase 1	HA

GAGs: glicosaminoglicanos, HS: heparan sulfato, DS: dermatan sulfato, KS: queratan sulfato, C4S: condroitin-4-sulfato, C6S: condroitin-6-sulfato, HA: ácido hialurônico.

Adaptado de (ZHOU *et al.*, 2020).

1.1. Mucopolissacaridose tipo II

1.1.1. Aspectos gerais

A mucopolissacaridose tipo II (MPS II) ou Síndrome de Hunter (OMIM #309900) é uma LSD que ocorre devido a mutações no gene *IDS*, levando à deficiência da iduronato-2-sulfatase (IDS) e o consequente acúmulo dos GAGs HS e DS. É uma doença recessiva e ligada ao cromossomo X, em que a maioria dos pacientes afetados é do sexo masculino. No geral, a taxa de incidência é de aproximadamente 0,48 a cada 100.000 recém-nascidos vivos no Brasil, sendo a MPS II a MPS mais prevalente em muitos países como o Japão, Coreia do Sul, Taiwan, Israel, Estônia e Brasil (CELIK *et al.*, 2021).

A enzima IDS é uma das primeiras enzimas no processo de hidrólise dos GAGs HS e DS. Devido a isso, quando há a deficiência dessa enzima, o início da degradação dos GAGs já fica prejudicado e o restante do processo não ocorre, fazendo com que esses substratos permaneçam com uma cadeia grande dentro dos lisossomos. A IDS é uma sulfatase e sua atividade consiste na hidrólise dos grupos sulfato do carbono 2 (C2) das unidades alfa L-idurônicas do HS e DS (Figura 2) (MEIKLE; FULLER; HOPWOOD, 2005).

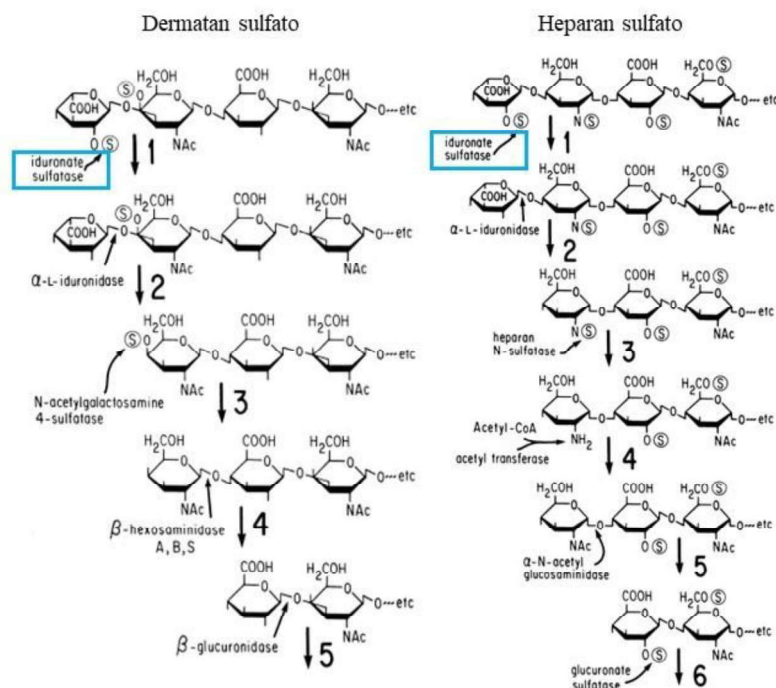


Figura 2: Ilustração das primeiras etapas da degradação dos glicosaminoglicanos dermatan sulfato e heparan sulfato. Fonte: Adaptado de (NEUFELD; MUENZER, 2001).

1.1.2. Sintomatologia

A enzima IDS é uma enzima constitutiva, sendo expressa em todos os tipos celulares e, portanto, está presente em todos os tecidos. Dessa forma, a ausência ou baixa atividade dessa enzima causa o acúmulo de GAGs em todos os órgãos, por isso, ela é considerada uma doença multissistêmica. Como os GAGs acumulados nos lisossomos podem fazer com que essa organela aumente de tamanho e número, alguns dos sintomas da MPS II incluem: espessamento do extrato córneo, aumento do tamanho de alguns órgãos, problemas de crescimento com envolvimento ósseo, cartilaginoso e de articulações, bem como características faciais grosseiras, problemas respiratórios e perda de audição (HAMPE *et al.*, 2021).

Outra manifestação comum é o abdômen aumentado devido à hepatoesplenomegalia (aumento do fígado e do baço) em 60-90% dos pacientes (HAMPE *et al.*, 2021). Embora o tamanho do fígado e do baço possa ser bastante evidente, o armazenamento de GAGs parece não levar à disfunção hepática ou esplênica grave (WRAITH *et al.*, 2008). Contudo, um aumento gradual da fibrose culminando em cirrose hepática também pode ser observado ao longo da vida em alguns pacientes (HAUST, 1968; PARFREY; HUTCHINS, 1986; YOSHIMOTO *et al.*, 2006).

A disfunção cardíaca é outro achado clínico comum e precoce, que geralmente é uma das principais causas de morte dos pacientes (WRAITH *et al.*, 2008). As manifestações cardíacas incluem insuficiência do miocárdio e espessamento valvar (mitral e aórtico), bem como doença arterial coronariana, hipertensão sistêmica por estreitamento arterial, anomalias de condução e taquicardia sinusal (POLETTI *et al.*, 2019; POSWAR *et al.*, 2022). Além disso, nos casos mais graves da doença, há o comprometimento do sistema nervoso central (SNC), de modo que os pacientes apresentam alterações cognitivas, problemas comportamentais e anormalidades neurológicas (D'AVANZO *et al.*, 2020; WRAITH *et al.*, 2008).

1.1.3. Diagnóstico e tratamento

As manifestações clínicas das MPS apresentam grande similaridade entre si e frequentemente se assemelham a outros distúrbios do desenvolvimento e neurológicos. Assim, o diagnóstico preciso da MPS II requer uma abordagem integrada que combine técnicas clínicas, avaliações físicas, análises bioquímicas e moleculares.

O diagnóstico das MPS pode ser iniciado pelo rastreamento dos GAGs acumulados que podem ser excretados pela urina por espectrometria de massas em tandem. Diferenciar os GAGs acumulados nessa etapa pode ajudar na elucidação de qual (ou quais) enzimas estão deficientes (KUBASKI *et al.*, 2017). Contudo, como o mesmo tipo de GAG pode estar acumulado em mais de um tipo de MPS, o padrão-ouro normalmente utilizado para o diagnóstico é a medida da atividade enzimática das hidrolases lisossômicas em fibroblastos, leucócitos ou plasma dos pacientes. Ainda, existem os métodos moleculares para investigar as variantes patogênicas que estão presentes no gene, pois, dependendo da alteração, pode haver variações na relação genotípica e fenotípica (MOHAMED *et al.*, 2020).

No que se refere aos tratamentos disponíveis para a MPS II, eles não são totalmente eficientes em reverter o quadro patológico dos pacientes. Dessa forma, é necessário um manejo de forma multidisciplinar para melhorar a qualidade de vida do paciente ao longo dos anos. O tratamento mais utilizado é a terapia de reposição enzimática (TRE) que consiste na infusão intravenosa da enzima IDS recombinante purificada, conhecida comercialmente como idursulfase (Elaprase®), que tem sido benéfica para a maioria dos pacientes (SCARPA, 2013). Tem sido demonstrado que essa abordagem reduz a excreção urinária dos GAGs, além de diminuir o tamanho de alguns órgãos como o fígado e o baço. A TRE também tem sido associada a melhorias, embora limitadas, na função cardiopulmonar e no desempenho físico. Uma das dificuldades da TRE é a necessidade de fazer a infusão em ambiente hospitalar e periodicamente, acarretando em uma terapia de alto custo ao sistema único de saúde. Outro fator limitante é que a enzima usada na TRE não atravessa a barreira hematoencefálica; portanto, para os casos mais graves, em que há um comprometimento do SNC, a TRE não causa efeito benéfico (MOHAMED *et al.*, 2020).

Outra abordagem terapêutica é o transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH). A terapia com TCTH consiste no transplante de medula óssea de um doador com genótipo normal para o paciente, com o objetivo de substituir uma grande parte das células sanguíneas do paciente por células-tronco provenientes de um doador saudável (GUFFON *et al.*, 2009). Essas células-tronco são capazes de sintetizar e secretar a enzima deficiente, proporcionando ao paciente a enzima funcional. Uma vantagem do TCTH é que as células do doador conseguem atravessar a barreira hematoencefálica e com isso pode haver a melhora o comprometimento neurológico. No entanto, os benefícios e malefícios do TCTH devem ser considerados, visto que o processo de transplante envolve

etapas de imunossupressão, que podem ser fatais para o paciente. Além disso, a doença do enxerto contra hospedeiro (DECH) pode ocorrer no caso de resposta imune do paciente, causando a rejeição do transplante (GYURKOCZA; SANDMAIER, 2014; KEKRE; ANTIN, 2014).

Outros tratamentos promissores têm sido desenvolvidos recentemente. Uma abordagem farmacológica é a utilização de chaperonas, moléculas projetadas para se ligar ao sítio ativo de proteínas lisossomais inativas, visando induzir o dobramento correto da proteína e melhorar sua estabilidade e atividade enzimática (VALENZANO *et al.*, 2011). Além disso, existe a terapia de redução de substrato (TRS), que busca prevenir o acúmulo de GAGs, inibindo a biossíntese sem corrigir o defeito enzimático subjacente (FRISO *et al.*, 2010). Outra estratégia é a realização de terapia gênica, a qual envolve a administração de um vetor contendo uma cópia funcional do gene *IDS*, permitindo sua expressão em vários tecidos celulares (TOMATSU *et al.*, 2016). Inclusive, um estudo de teste clínico com terapia gênica vem sendo desenvolvido pelo RegenxBio (em parceria com algumas universidades dos EUA e com o Hospital de Clínicas de Porto Alegre), em que um vetor de adenovírus associado faz a entrega do gene *IDS* para o paciente, através de injeção intracisternal (terapia RGX-121, ID: NCT03566043) (REGENXBIO, 2023).

1.1.4. Modelo animal de MPS II

O modelo animal utilizado neste trabalho foi o de camundongos nocaute para a iduronato-2-sulfatase (IDS-KO). A geração desses animais nocaute foi desenvolvida por Muenzer, em que a alteração direcionada do gene *IDS* dos camundongos envolveu a eliminação do éxon 4 e de uma porção do éxon 5 por recombinação homóloga, utilizando um vetor de substituição que transporta o gene de resistência à neomicina (MUENZER *et al.*, 2002). Esses camundongos foram desenvolvidos para representar a forma mais grave da MPS II, onde há o comprometimento neurológico, visto que há uma depleção total do gene *IDS*. Algumas características observadas nesses animais foram: aumento da excreção urinária de GAGs a partir da quarta semana de idade, a qual permaneceu alta ao longo da vida, e níveis de GAGs nos tecidos aumentados a partir da sétima semana de idade. Esses animais apresentam hepatomegalia, esplenomegalia e aumento de outros órgãos em comparação com os camundongos do tipo selvagem já a partir da quarta semana de vida. Outras características incluem pelo áspero e alopecia esporádica, limitação articular, dedos curvados, desenvolvimento anormal do crânio e diminuição significativa da expectativa de vida. Além disso, também foram observados esclerose

óssea e aumento de vacuolização em múltiplos órgãos analisados por histologia (GARCIA *et al.*, 2007).

Por representar a forma mais grave da MPS II e apresentar diversas manifestações clínicas que também são encontradas nos pacientes, esses animais nocaute são considerados um bom modelo para o estudo da fisiopatologia da MPS II. Nesse contexto, alguns trabalhos já demonstraram achados neurológicos e cardíacos nesses animais (AZAMBUJA *et al.*, 2018, 2020; TAVARES *et al.*, 2023). No córtex cerebral desses camundongos, foi visto um aumento da atividade da catepsina B, além do aumento da atividade da caspase-1 e dos níveis de IL-1 β aos 5 meses de idade, indicando a ativação do inflamassoma (AZAMBUJA *et al.*, 2020). Também foi observado declínio da memória desses animais aos 6 meses de idade (AZAMBUJA *et al.*, 2018). Em relação ao tecido cardíaco, os achados foram similares às anormalidades encontradas nos pacientes, incluindo insuficiência cardíaca, aumento da espessura das valvas e dilatação aórtica, além de um aumento da atividade das catepsinas B e S (TAVARES *et al.*, 2023).

1.2. Homeostase mitocondrial

1.2.1. Bioenergética mitocondrial

As mitocôndrias são organelas altamente dinâmicas que desempenham um papel central no metabolismo energético celular. Além dessa função essencial, estão envolvidas em diversos processos celulares, como inflamação, regulação da homeostase redox e do cálcio, além de participar ativamente nos mecanismos de morte celular (BOCK; TAIT, 2020; FAAS; DE VOS, 2020; ONISHI *et al.*, 2021; POPOV, 2020). O metabolismo energético diz respeito às rotas mitocondriais que resultam na geração de ATP, como, por exemplo, o ciclo do ácido cítrico (CAC) e a cadeia transportadora de elétrons (CTE).

No CAC, considerado o epicentro do metabolismo celular, a oxidação de ácidos graxos, carboidratos, aminoácidos e piruvato converge principalmente para a formação de acetil-CoA, embora também possam originar outros intermediários do CAC. O acetil-CoA, ao combinar-se com uma molécula de oxaloacetato, inicia o ciclo ao formar citrato. Após uma série de 8 reações enzimáticas em cascata, o ciclo culmina na produção de GTP, NADH e FADH₂, juntamente com a regeneração do oxaloacetato, que pode então combinar-se com outra molécula de acetil-CoA para iniciar um novo ciclo (NELSON, 2017).

As coenzimas reduzidas NADH e FADH₂, produzidas pelo CAC, são utilizadas para alimentar a cadeia transportadora de elétrons (CTE), composta por uma série de complexos enzimáticos (complexos I, II, III e IV) e uma coenzima lipossolúvel ancorada na membrana mitocondrial interna (coenzima Q) (NELSON, 2017). O NADH e o FADH₂ produzido pela succinato desidrogenase fornecem elétrons para os complexos I e II, respectivamente, representando as principais vias de entrada de elétrons na CTE. O fluxo de elétrons através dos complexos resulta no bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana, realizado pelos complexos I, III e IV. Isso gera um gradiente eletroquímico de prótons – potencial de membrana mitocondrial – devido ao acúmulo no espaço intermembrana, que é utilizado então pelo complexo V (ATP sintase) para a síntese de ATP. O oxigênio (O₂) é essencial nesse processo, atuando como receptor final de elétrons do complexo IV, sendo reduzido a água (H₂O). Dessa forma, a oxidação de substratos energéticos é acoplada ao processo de fosforilação oxidativa (OXPHOS), resultando na produção de ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico (NICHOLLS; FERGUSON, 2013).

Todos esses processos de transferência de elétrons, bombeamento de prótons, formação do gradiente eletroquímico e síntese de ATP estão intimamente ligados ao consumo de O₂. Logo, a atividade da respiração mitocondrial pode ser avaliada medindo o consumo de oxigênio (O₂), sendo um indicador preciso da oxidação de substratos pelo CAC e da atividade da CTE (Figura 3) (NICHOLLS; FERGUSON, 2013).

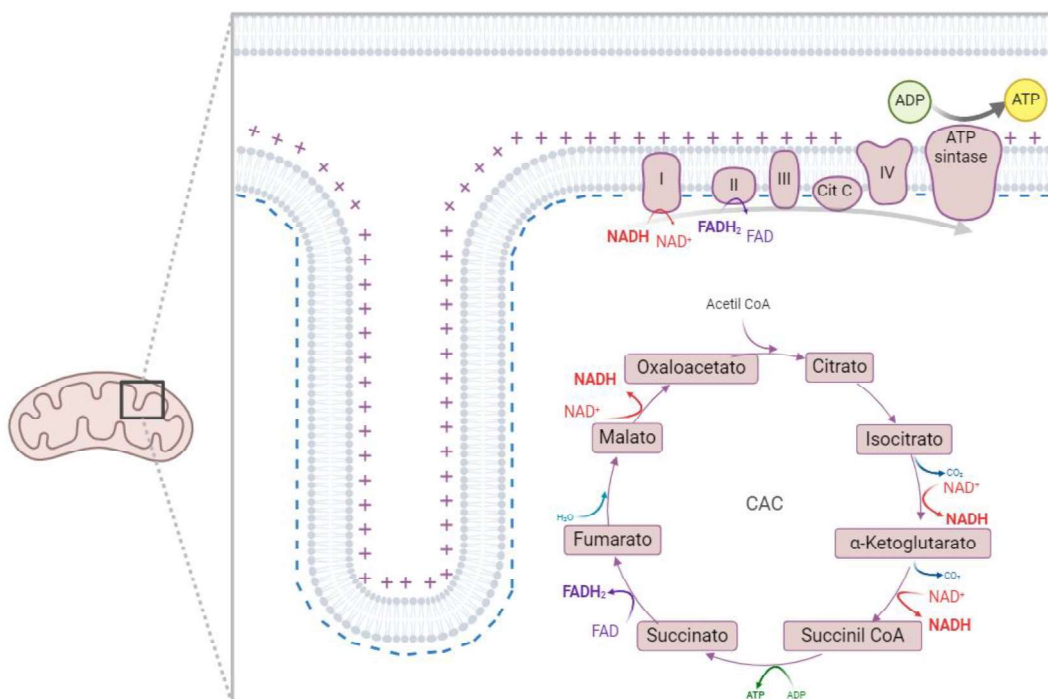


Figura 3: Esquema mostrando o ciclo do ácido cítrico (CAC) e os complexos da cadeia transportadora de elétrons, junto com a ATP sintase. A representação também mostra o gradiente eletroquímico formado. Adaptado de (MARTÍNEZ-REYES; CHANDEL, 2020). Criada com BioRender.

Outro processo para o qual as mitocôndrias são importantes é na manutenção do cálcio celular. Mitocôndrias íntegras e funcionais têm a capacidade de captar o excesso de Ca^{2+} presente no citosol e liberá-lo de seus estoques quando necessário para as funções celulares. Essa contribuição é fundamental para manter a concentração intracelular de Ca^{2+} em níveis ótimos para o funcionamento celular adequado (FIGUEIRA *et al.*, 2013). Entretanto, a excessiva retenção de cálcio, além da capacidade da mitocôndria, pode levar à abertura do poro de transição de permeabilidade (PTP), que leva ao aumento do inchamento mitocondrial, resultando na liberação de Ca^{2+} e fatores apoptóticos intramitocondriais, como o citocromo *c* (LIU *et al.*, 1996).

1.2.2. Controle de qualidade mitocondrial

O controle de qualidade mitocondrial engloba uma variedade de processos destinados a regular o conjunto de mitocôndrias funcionais necessário para a manutenção da integridade celular. Esses processos incluem a biogênese mitocondrial, a dinâmica mitocondrial (fusão e fissão mitocondrial) e a mitofagia (Figura 4). A biogênese é um procedimento complexo que exige a coordenação da expressão de genes nucleares e mitocondriais, o transporte de proteínas do citosol para a mitocôndria e a formação de complexos proteicos. A maior parte da expressão gênica relacionada é regulada pelo coativador de receptores ativados por proliferador de peroxissomos (PGC-1 α), cuja atividade pode ser modulada por modificações covalentes, como deacetilação mediada por sirtuínas e fosforilação induzida pela proteína quinase ativada por AMP (AMPK) (POPOV, 2020). A fusão e fissão mitocondrial são controladas por proteínas do tipo GTPases. A fissão mitocondrial envolve a interação de duas proteínas principais: a proteína 1 relacionada à dinamina (DRP1), uma GTPase localizada no citoplasma, e a fissão 1 (Fis1), uma proteína transmembrana ancorada na membrana mitocondrial externa. A Drp1 é recrutada para a superfície mitocondrial, onde medeia o processo de fissão, esse recrutamento é facilitado pela Fis1 que atua como receptor da DRP1 (SMIRNOVA *et al.*, 2001). O processo de fusão ocorre em duas etapas distintas, em que as membranas externa e interna se fundem separadamente. Após a aproximação das duas

mitocôndrias, mediada pela interação entre as mitofusinas 1 e 2 (MFN1 e MFN2), ocorrem diversas alterações morfológicas possibilitadas pela hidrólise do GTP dessas proteínas, resultando na fusão da membrana mitocondrial externa. Por outro lado, a fusão da membrana mitocondrial interna é predominantemente mediada pela proteína óptica atrofiante 1 (OPA1), que desempenha um papel crucial na manutenção da estrutura das cristas mitocondriais (SONG *et al.*, 2009). A fusão entre duas mitocôndrias permite a recuperação de mitocôndrias danificadas, enquanto a fissão gera duas novas mitocôndrias, geralmente uma funcional e outra danificada, propensa à degradação (SHIRIHAI; SONG; DORN, 2015). Em muitos casos de fissão, a mitocôndria danificada resultante é direcionada para a mitofagia. Durante a mitofagia, a mitocôndria não funcional é reconhecida pela maquinaria de autofagia lisossomal, que a isola em membranas, formando autofagossomos. Além da maquinaria de autofagia, há outras proteínas específicas envolvidas, como Parkin e PINK1, que participam exclusivamente da mitofagia. Os autofagossomos então se fundem com lisossomos para degradar seletivamente a mitocôndria não funcional (DARD *et al.*, 2020).

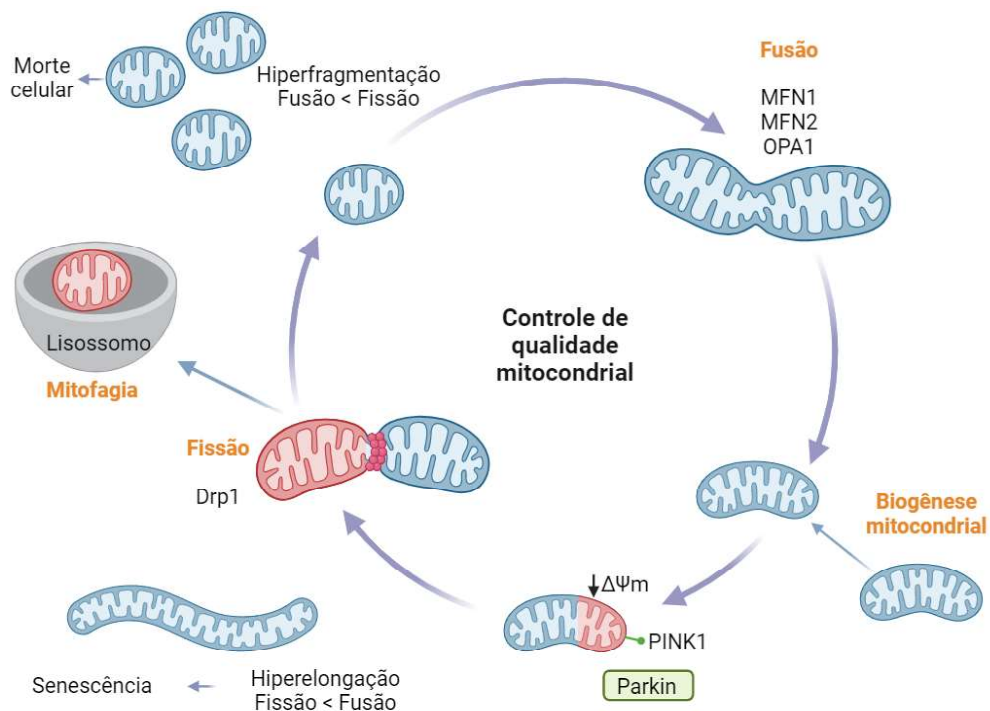


Figura 4: Processos que fazem parte da manutenção e controle de qualidade mitocondrial, sendo eles a dinâmica mitocondrial (fissão e fusão), biogênese mitocondrial e mitofagia. Adaptado de (GARBERN; LEE, 2021). Criado com

BioRender.

1.2.3. Homeostase redox

A homeostase redox se refere ao equilíbrio que deve existir entre a formação de espécies reativas e as defesas antioxidantes. Dentre as espécies reativas, os radicais livres são moléculas ou átomos que possuem elétrons desemparelhados em seus orbitais mais externos, podendo existir de forma independente. Sua instabilidade eletrônica os torna mais propensos a reagir com outras moléculas ou átomos, resultando na oxidação desses (HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, 2015; SOUTHORN; POWIS, 1988). As principais espécies reativas são as de oxigênio (ERO) e as de nitrogênio (ERN).

Em condições fisiológicas, o oxigênio (O_2) sofre redução tetravalente no complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial, resultando na formação de água (H_2O). No entanto, em centros redox presentes nos complexos da cadeia respiratória, como nos complexos I e III, o oxigênio pode ser diretamente reduzido, recebendo um único elétron e gerando o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$). A enzima superóxido dismutase (SOD) é capaz de converter o $O_2^{\bullet-}$ em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), uma espécie reativa que não possui elétrons desemparelhados. O H_2O_2 pode reagir com íons de ferro (Fe^{2+}), resultando na formação do radical hidroxila (OH^{\bullet}), um radical livre altamente reativo. O superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\bullet}) são exemplos das chamadas EROs. Já dentre as ERNs, temos como moléculas mais importantes o óxido nítrico (NO^{\bullet}) e o peroxinitrito ($ONOO^-$) (HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, 2015).

As espécies reativas desempenham um papel crucial como moléculas sinalizadoras em importantes funções fisiológicas, sendo indispensáveis para uma resposta celular adequada. A sinalização celular da insulina, adaptação ao exercício e a defesa contra infecções através da liberação de espécies reativas pelos neutrófilos exemplificam processos que são significativamente influenciados pela geração fisiológica de EROs e ERNs (ARATANI *et al.*, 2012; DELANTY; DICHTER, 1998; HAMANN *et al.*, 2014; IRANI, 2000; WALL *et al.*, 2012; WEBB *et al.*, 2017). As espécies reativas são continuamente produzidas e neutralizadas por mecanismos de defesa antioxidante endógenos. No entanto, quando geradas em excesso, as EROs e ERNs podem causar danos às células por meio da oxidação de biomoléculas, como proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos (HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, 2015).

As defesas antioxidantes, tanto enzimáticas quanto não enzimáticas, proporcionam às células um conjunto altamente especializado de ferramentas para neutralizar os efeitos prejudiciais das espécies reativas. Essas defesas são

estrategicamente distribuídas em vários compartimentos celulares e tecidos e incluem agentes que cataliticamente removem os radicais livres, como as enzimas SOD, catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPx); proteínas que reduzem a disponibilidade de pró-oxidantes, como íons de ferro e cobre, como as transferrinas; substâncias que capturam espécies reativas e servem como substratos para enzimas antioxidantes, como a GSH; além de proteínas que protegem biomoléculas contra danos por outros mecanismos (Figura 5) (HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, 2015).

Em situações em que o aumento das espécies reativas é relativamente pequeno, a resposta antioxidante é capaz de compensar adequadamente esse aumento. No entanto, em certas condições patológicas, a produção de espécies reativas está elevada, e as defesas antioxidantes podem não ser suficientes para restabelecer a homeostase redox. Esse desequilíbrio entre eventos oxidantes e a capacidade antioxidante é conhecido como estresse oxidativo, e pode desempenhar um papel central na fisiopatologia de diversas doenças, principalmente se o dano celular ocorrer de forma exacerbada, causando morte por necrose ou apoptose (HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, 2015; HALLIWELL, Barry, 2006).

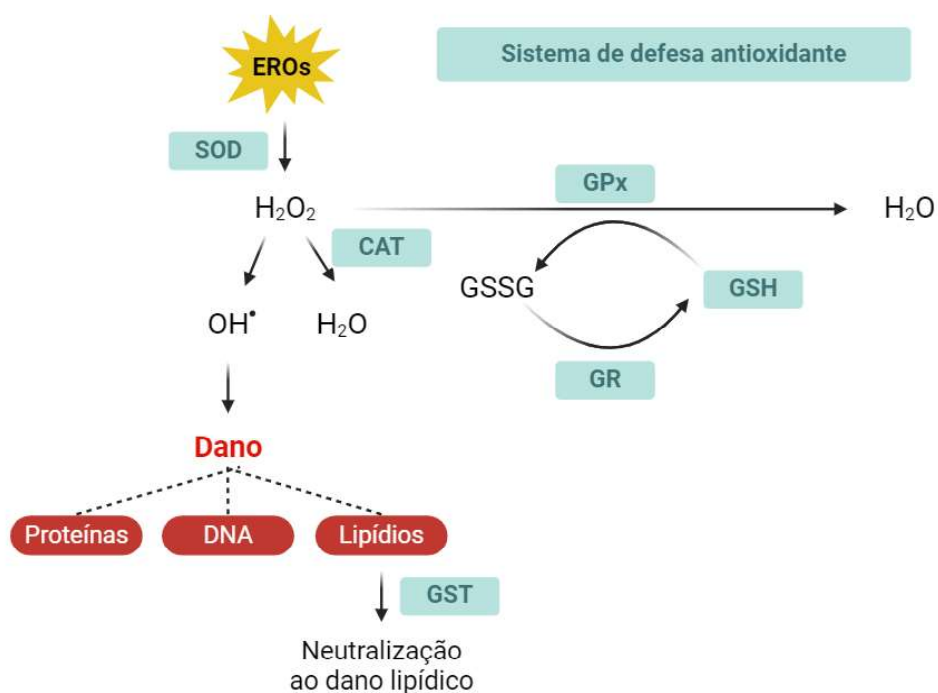


Figura 5: Ilustração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e os danos que eles podem causar às células, e o sistema de defesa antioxidante. Adaptado de (PAK *et al.*, 2020). Criado com BioRender.

1.3. Comunicação entre lisossomos e mitocôndrias

A relevância da interação entre as mitocôndrias e os lisossomos vai além do fato de os lisossomos serem importantes para o processo de degradação de mitocôndrias não funcionais (mitofagia). As interações entre mitocôndrias e lisossomos também desempenham, por exemplo, um papel crucial na regulação bidirecional da dinâmica mitocondrial e lisossômica. Recentemente, foi observado que a proteína lisossomal Rab7-GTP não apenas regula a dinâmica dos lisossomos, mas também exerce influência sobre a dinâmica das mitocôndrias. Assim, essa proteína desempenha um papel na formação de contatos estáveis com a mitocôndria. Em certas circunstâncias, a proteína TBC1D15 é recrutada pela proteína mitocondrial Fis1, e induz a hidrólise de Rab7-GTP em Rab7-GDP. Esse processo interrompe a ação da Rab7 diminuindo os contatos entre as organelas e reduz o transporte, fusão e maturação lisossomal. Além disso, é importante considerar que a interação entre as membranas mitocondriais e lisossomais, por meio da interação entre as proteínas Rab7/TBC1D15/Fis1, desempenha um papel importante na dinâmica mitocondrial ao marcar os locais onde devem ocorrer a fissão mitocondrial (Figura 6) (TRIVEDI; BARTLETT; PULINILKUNNIL, 2020; WONG *et al.*, 2019; WONG; YSSELSTEIN; KRAINIC, 2018).

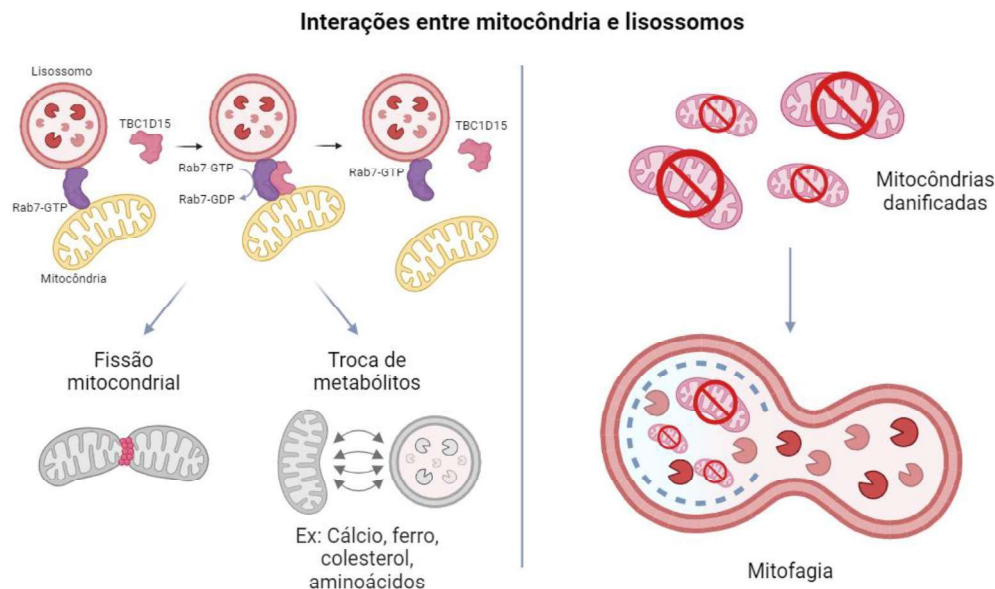


Figura 6: Interações entre mitocôndrias e lisossomos. Adaptado de (CISNEROS *et al.*, 2022; TRIVEDI; BARTLETT; PULINILKUNNIL, 2020). Criado com BioRender.

Essas regiões de comunicação entre as membranas dessas organelas são importantes para a transferência de metabólitos e íons. Contudo, também a diminuição desses contatos é importante para evitar trocas exacerbadas de metabólitos. Um dos íons que tem sua homeostase regulada pelas mitocôndrias e lisossomos é o Ca^{2+} . Essa comunicação entre mitocôndrias e lisossomos necessária para a transferência do cálcio ocorre por meio das proteínas VDAC1 (mitocôndria) e TRPML1 (lisossomo). Assim, a liberação de cálcio lisossomal mediada por TRPML1 modula a homeostase de cálcio na mitocôndria (PENG; WONG; KRAINIC, 2020; TODKAR; ILAMATHI; GERMAIN, 2017; WONG *et al.*, 2019).

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

2.1. Justificativa

Uma das principais funções dos lisossomos é a degradação de componentes que necessitam ser renovados no meio celular no processo de autofagia. Esse processo pode ser direcionado para a degradação especificamente de mitocôndrias danificadas, a qual é uma etapa muito importante para a manutenção da homeostase mitocondrial, sendo conhecida como mitofagia. Visto que os lisossomos estão com a funcionalidade prejudicada em diferentes LSD, incluindo a MPS II, é possível que os processos de autofagia e mitofagia estejam alterados. Com isso, pode haver o acúmulo de mitocôndrias disfuncionais, as quais podem ter alterações em diferentes processos, como na bioenergética, homeostase redox e dinâmica mitocondrial. Além disso, devemos considerar que uma disfunção lisossomal pode causar danos diretos na mitocôndria, uma vez que os contatos entre mitocôndria e lisossomos podem estar alterados. Acreditamos que o estudo desses mecanismos relacionados à homeostase mitocondrial pode contribuir para o entendimento dos mecanismos patológicos envolvidos na MPS II. Ainda deve ser considerado que os pacientes com MPS II apresentam grave dano hepático, cardíaco e neurológico, cuja fisiopatologia específica deve ser melhor estudada a fim de contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficientes para essa doença.

2.2. Objetivo geral

Investigar possíveis alterações na homeostase mitocondrial no fígado, coração e córtex cerebral de camundongos nocaute para a IDS (MPS II) de 6 meses de idade, comparando com camundongos *wild type* (WT).

2.3. Objetivos específicos

- a. Avaliar a bioenergética mitocondrial, mensurando as atividades das enzimas do ciclo do ácido cítrico (CAC) e dos complexos da cadeia transportadora de elétrons (CTE) bem como a respiração mitocondrial e a produção de ATP;
- b. Mensurar o potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$) e a capacidade de retenção de cálcio mitocondrial;
- c. Investigar o controle de qualidade mitocondrial por meio da medida do conteúdo das proteínas envolvidas nesses processos por western blotting. As proteínas a serem avaliadas foram: Drp1 (fissão), OPA1 e Mfn1 (fusão), VDAC1 e COX IV (massa mitocondrial), parkin (mitofagia) e LC3 (autofagia);
- d. Avaliar a homeostase redox por meio da medida da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e da capacidade antioxidante. Os parâmetros analisados foram: oxidação de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH), níveis de malondialdeído (MDA), conteúdo de sulfidrilas, níveis de glutatona reduzida (GSH) e a atividade das enzimas glutatona peroxidase (GPx), glutatona redutase (GR), glutatona-S-transferase (GST), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD).
- e. Estudar a interação entre mitocôndrias e lisossomos mediante a determinação do conteúdo das proteínas TBC1D15, Fis1 e Rab7 por western blotting.

PARTE II – *Artigos científicos*

CAPÍTULO I

Disturbances in mitochondrial bioenergetics and control quality and unbalanced redox homeostasis in the liver of a mouse model of mucopolysaccharidosis type II

Camila Vieira Pinheiro, Rafael Teixeira Ribeiro, Ana Cristina Roginski, Morgana Brondani, Ângela Zemniçak, Christofer Ian Hernandez Hoffmann, Alexandre Umpierrez Amaral, Moacir Wajner, Guilherme Baldo, Guilhian Leipnitz.

Artigo científico aceito para publicação em
Molecular and Cellular Biochemistry (2024)

CAPÍTULO II

**Mitochondrial alterations underlie the cerebral cortex and heart damage of MPS
II mice**

Camila Vieira Pinheiro, Rafael Teixeira Ribeiro, Ana Cristina Roginski, Morgana Brondani, Ângela Beatris Zemniçak, Christofer Ian Hernandez Hoffmann, Adriana Fernanda K. Vizuete, Carlos Alberto Gonçalves, Alexandre Umpierrez Amaral, Moacir Wajner, Guilherme Baldo, Guilhian Leipnitz.

Artigo científico que será submetido para publicação na
Biochimica et Biophysica Acta: Molecular Basis of Disease

PARTE III – *Discussão geral*

3. DISCUSSÃO

A MPS II é um erro inato do metabolismo multissistêmico causado por mutações no gene *IDS*, responsável pela síntese da enzima lisossomal IDS. A ausência dessa enzima causa o acúmulo de GAGs nos lisossomos, levando ao aumento do tamanho e da quantidade dessa organela. Alguns dos sintomas incluem aumento do tamanho do fígado, coração e baço, problemas ósseos e cartilagosos, diminuição da capacidade auditiva e espessura da córnea ocular, bem como insuficiência cardíaca e comprometimento do SNC (NEUFELD; MUENZER, 2001). As terapias existentes possuem algumas limitações, como por exemplo a TRE, que não é eficaz nos casos mais graves da MPS II por não atravessar a barreira hematoencefálica e não prevenir os danos ao SNC, e o TCTH, que tem alta morbidade e mortalidade associada no Brasil (GYURKOCZA; SANDMAIER, 2014; KEKRE; ANTIN, 2014; MOHAMED *et al.*, 2020). Logo, como as terapias disponíveis não são eficientes para todos os casos de MPS II e como a fisiopatologia por trás dessa doença não está totalmente elucidada, é interessante investigar as alterações celulares que ocorrem na MPS II para melhor elucidar os mecanismos envolvidos e contribuir para o desenvolvimento de outras abordagens terapêuticas para os pacientes.

Sabe-se que o acúmulo de GAGs leva à disfunção lisossômica, o que contribui significativamente para a fisiopatologia de alguns dos sintomas (PLATT; BOLAND; SPOEL, 2012). Visto que uma das funções dos lisossomos é a autofagia, fazendo a degradação de diversas moléculas celulares, incluindo mitocôndrias danificadas, é importante averiguar se esse processo celular pode estar afetado, além de avaliar a homeostase das mitocôndrias em tecidos afetados na doença. Portanto, neste trabalho, investigamos algumas funções mitocondriais importantes para a homeostase mitocondrial em fígado, coração e córtex cerebral de camundongos MPS II (nocautes para o gene *IDS*) com 6 meses de idade. Estes três órgãos foram escolhidos pelas manifestações clínicas observadas nos mesmos, pelo seu papel no metabolismo, e por terem responsividade variada à terapia (o fígado por exemplo, responde bem à TRE, enquanto o cérebro não).

A disfunção mitocondrial tem sido relacionada a uma variedade de condições, abrangendo desde doenças mitocondriais até câncer, distúrbios metabólicos, condições inflamatórias, neuropatias e doenças neurodegenerativas como as doenças de Alzheimer, Parkinson e Huntington (LLOYD-EVANS; HASLETT, 2016). Tem sido mostrado que os distúrbios neurodegenerativos podem compartilhar semelhanças no que se refere aos mecanismos patogênicos com as LSD. Por exemplo, mitocôndrias disfuncionais, comprometimento da autofagia e acúmulo de agregados proteicos citoplasmáticos são

alterações frequentemente observados e compartilhados tanto por LSD quanto por distúrbios neurodegenerativos mais comuns (KISELYOV *et al.*, 2007).

Dentre as diversas funções das mitocôndrias que podem estar alteradas em algumas doenças, destacam-se aquelas relacionadas ao controle de qualidade mitocondrial. Este processo consiste em uma gama de eventos responsáveis por controlar as funções mitocondriais mantendo a sua homeostase e, por consequência, das células. Dentre esses eventos, destacam-se a biogênese, a dinâmica (que compreende a fusão e fissão desta organela) e a mitofagia. Tais processos podem ser avaliados analisando o conteúdo proteico de proteínas-chave em cada uma dessas rotas (BAI *et al.*, 2022). Deve ser considerado ainda que a mitofagia compartilha parte da maquinaria celular responsável pela autofagia. Outros processos mitocondriais importantes que podem estar alterados em doenças se referem à bioenergética mitocondrial, como consumo de oxigênio, potencial da membrana mitocondrial e capacidade mitocondrial de retenção de cálcio (AVRAM *et al.*, 2022; ROGINSKI *et al.*, 2020), além da homeostase redox (WAJNER; VARGAS; AMARAL, 2020).

O envolvimento de alterações em parâmetros mitocondriais na fisiopatologia das MPS ainda não foi muito estudado. Uma investigação mostrou que, em camundongos nocautes com MPS IIC, o acúmulo lisossômico de sulfato de heparan nas células da microglia causou sua ativação e liberação de citocinas, resultando em disfunção mitocondrial em neurônios desses animais. Além disso, foi visto que as mitocôndrias dos neurônios desses animais eram pleomorfas e estavam em quantidade aumentada, mostrando, além de seu acúmulo, características como inchamento mitocondrial e cristas desorganizadas (PSHEZHETSKY, 2015). Ainda, foi visto um excesso de mitocôndrias fragmentadas e morte celular em fibroblastos de pacientes com MPS VI e em tecidos de ratos MPS VI (TESSITORE; PIROZZI; AURICCHIO, 2009). Em relação à MPS II, alguns dados anteriores mostraram peroxidação lipídica, dano proteico e alterações nas defesas antioxidantes no sangue dos pacientes, que foram atenuadas após TRE (FILIPPON *et al.*, 2011). Outra investigação demonstrou EROs elevadas, danos ao DNA e alterações nas defesas antioxidantes enzimáticas em células HEK 293 deficientes em IDS (JACQUES *et al.*, 2022). Esses achados são os primeiros indícios na literatura de alterações do metabolismo e função mitocondrial nas MPS.

Nessa tese, investigamos essas possíveis alterações em órgãos específicos de camundongos nocautes para a IDS (modelo animal de MPS II), incluindo fígado, coração e córtex cerebral, por serem órgãos bastante acometidos nessa doença. No capítulo I desta

tese, mostramos os dados obtidos no fígado de animais nocaute. Os resultados encontrados mostraram algumas disfunções na bioenergética mitocondrial e alterações na homeostase redox. Um de nossos achados revelou uma redução na atividade da enzima α -KGDH no fígado de camundongos nocaute, sugerindo disfunção no CAC. (MAILLOUX *et al.*, 2009). A redução da atividade da α -KGDH pode levar ao acúmulo de α -cetoglutarato e redução de succinil-CoA, potencialmente afetando processos como metabolismo de aminoácidos e heme (GUO *et al.*, 2022; HUNTER; FERREIRA, 2011). Foi visto também que essa enzima pode ser sensível ao ataque de EROs, causando sua inibição. Porém essa inibição, com concomitante aumento de succinil-CoA e diminuição de NADH, parece ser uma importante estratégia de defesa antioxidante (MAILLOUX *et al.*, 2009). No entanto, são necessários mais estudos para entender completamente o mecanismo por trás dessa inibição. Por outro lado, as atividades de outras enzimas do CAC, como SDH e MDH, foram aumentadas, possivelmente como uma adaptação compensatória, para manter o NADH e FADH₂ da CTE. Além disso, o aumento da atividade do complexo I indica um possível mecanismo compensatório na CTE (ZHAO *et al.*, 2019). Não foram observadas mudanças significativas em outros parâmetros mitocondriais, sugerindo que a inibição de α -KGDH pode estar sendo compensada por diferentes mecanismos.

No fígado de camundongos nocautes com 6 meses de idade, também foram observados níveis elevados de grupos sulfidrilas e GSH, juntamente com atividades enzimáticas aumentadas de GPx e GST. Esses resultados indicam possíveis mecanismos compensatórios contra o aumento da produção de radicais livres e o estresse oxidativo, evidenciado também pelo aumento na oxidação do DCFH. Neste contexto, os grupos sulfidrila de proteínas podem contribuir para a eliminação de espécies reativas, reforçando a hipótese de mecanismos compensatórios (HANSEN; ROTH; WINTHER, 2008; THOMAS; POLAND; HONZATKO, 1995). Além disso, foi observado um aumento nos níveis de MDA, indicativo de peroxidação lipídica, e um aumento nas atividades da SOD e CAT, sugerindo uma resposta adaptativa para combater os níveis elevados de EROs. Embora não tenha sido investigado o mecanismo específico envolvido no aumento das atividades das enzimas antioxidantes, especula-se que a sinalização Nrf2 possa estar ativada (SEMINOTTI *et al.*, 2021).

Além de examinar a bioenergética e a homeostase redox mitocondrial, foram investigados processos de controle de qualidade mitocondrial. O conteúdo proteico de VDAC1 e COX IV, indicativos de massa mitocondrial, diminuiu significativamente, sugerindo uma redução na quantidade de mitocôndrias. Embora sejam necessários mais estudos, esses dados indicam uma possível diminuição no número de mitocôndrias. A diminuição da subunidade COX IV não afetou a atividade do complexo IV e a respiração mitocondrial, possivelmente devido ao chamado limiar de energia mitocondrial, onde reduções nos níveis de subunidades só influenciam a atividade de um determinado complexo CTE após atingir um limiar específico (ROSSIGNOL *et al.*, 2003). Por outro lado, estudos anteriores em fibroblastos de pacientes com MPS II não mostraram diferenças no número de mitocôndrias, o que pode ser atribuído às variações nos tipos de tecidos ou células analisadas (GAFFKE *et al.*, 2021).

Ainda, foi observada uma redução nos níveis das proteínas reguladoras Drp1 e OPA1, que controlam, respectivamente, a fissão e fusão da membrana mitocondrial interna. A diminuição do Drp1 foi mais significativa que a do OPA1, o que, juntamente com a não alteração nos níveis de MFN2, sugere uma possível predominância da fusão para reduzir o número de mitocôndrias danificadas. No entanto, a redução da OPA1 também pode influenciar a densidade das cristas mitocondriais (BENNETT; LATORRE-MURO; PUIGSERVER, 2022). Esses resultados indicam possíveis alterações na morfologia mitocondrial no fígado de camundongos com MPS II, mas são necessários mais estudos para confirmar essa hipótese.

No capítulo II, investigamos diferentes processos da homeostase mitocondrial em coração e córtex cerebral dos camundongos MPS II aos 6 meses de idade. Enquanto no fígado dos camundongos MPS II vimos um desbalanço na homeostase redox, em coração e córtex cerebral praticamente não verificamos alterações na homeostase redox. Apenas o coração dos animais nocaute apresentou um aumento nos níveis de MDA, indicando um aumento da peroxidação lipídica. Mais investigações são necessárias para compreender por que esse efeito foi induzido apenas em coração.

No coração e no córtex cerebral, investigamos também a interação entre mitocôndrias e lisossomos (mit-lis). Uma das regiões de contato entre as membranas dessas duas organelas ocorre pela interação das proteínas Rab7/TBC1D15/Fis1. Após a proteína Rab7-GTP formar essas regiões, é necessário que a proteína TBC1D15 (através de recrutamento pela proteína mitocondrial Fis1) induza a hidrólise de Rab7-GTP em Rab7-GDP para desfazer as regiões de contato mit-lis (TRIVEDI; BARTLETT;

PULINILKUNNIL, 2020). Essas regiões são importantes para a troca de metabólitos entre as duas organelas e também já foi verificado que essa interação através da TBC1D15 marca na membrana mitocondrial pontos onde a proteína Drp1 deve oligomerizar para promover a fissão mitocondrial (SUN *et al.*, 2022). Nossos dados mostraram uma redução nos níveis de TBC1D15 no córtex cerebral e no coração de camundongos MPS II, sugerindo distúrbios na comunicação mit-lis. Esses dados sugerem uma maior interação entre essas organelas. Além disso, os níveis de Rab7 aumentaram no coração juntamente com TBC1D15, sugerindo maiores interações mit-lis neste tecido em comparação com o córtex. No entanto, com base nos nossos resultados, não podemos estabelecer se existe um aumento do número de lisossomos em contato com as mitocôndrias ou se existe uma alteração na duração dos contatos em animais com MPS II.

Como essa interação mit-lis estava alterada e ela pode interferir na dinâmica mitocondrial, principalmente na fissão, avaliamos os níveis da proteína Drp1. Encontramos uma diminuição nos níveis de Drp1 em ambos os tecidos (coração e córtex cerebral) dos animais com MPS II, indicativo de redução da fissão mitocondrial e esse resultado se mostrou de acordo com a redução de TBC1D15, uma vez que esta proteína demonstrou combinar-se com Drp1 para o processo de fissão (SUN *et al.*, 2022). Apesar de não termos analisado as interações mit-lis no fígado dos camundongos MPS II (capítulo I), encontramos diminuição da proteína Drp1 também no tecido hepático, sugerindo que as regiões de contato entre mit-lis também estão alteradas no fígado.

Nossos resultados referentes à autofagia e mitofagia no córtex cerebral e no coração de camundongos com MPS II revelaram padrões distintos. No córtex, observamos uma diminuição nos níveis de parkin, associada à mitofagia, e um aumento na LC3, indicativo de aumento na autofagia. No entanto, no coração, houve um aumento na parkin, sem alterações na LC3. Além disso, foi observado um aumento na fusão da membrana mitocondrial interna no córtex, sugerindo um mecanismo compensatório para as mudanças observadas, possivelmente visando recuperar a homeostase mitocondrial. Assim, sugerimos que a maquinaria responsável pelo controle de qualidade mitocondrial está respondendo de diferentes formas nos tecidos de animais nocaute. Outra hipótese é que, como mecanismos comuns a outras doenças neurodegenerativas têm sido encontrados nas MPS, de forma que a alteração nos níveis de parkin, encontrada em doenças como Parkinson, também possam contribuir para a patogênese da MPS II (KISELYOV *et al.*, 2007; LLOYD-EVANS; HASLETT, 2016). Por exemplo, uma diminuição da parkin em neurônios dopaminérgicos de pacientes com doença de

Parkinson também foi observada e essa alteração prejudicou o metabolismo de aminoácidos nesses neurônios, que é dependente das interações mit-lis (PENG *et al.*, 2023).

A seguir, buscamos identificar outros mecanismos mitocondriais afetados, além da dinâmica e mitofagia mitocondrial, avaliando a bioenergética. Observamos uma diminuição nas atividades da CS e MDH no córtex cerebral, enquanto no coração houve uma diminuição apenas na atividade de IDH. Além disso, o consumo de oxigênio, usado para avaliar a respiração mitocondrial, diminuiu apenas no coração, sem alterações nos complexos da CTE. As atividades da CK e PK também estavam diminuídas no coração. Contudo, não foram observadas alterações no potencial de membrana mitocondrial e na capacidade de retenção de cálcio. Dessa forma, nossos resultados indicam um comprometimento do metabolismo energético no coração mais acentuado do que no córtex cerebral. Isso pode explicar o aumento seletivo da mitofagia no tecido cardíaco, corroborando com as maiores interações mit-lis nesse tecido.

Como alterações diferenciais no controle de qualidade mitocondrial foram observadas nos diferentes tecidos, avaliamos a densidade de mitocôndrias através de duas proteínas abundantes nas mitocôndrias, a VDAC e COX IV, as quais podem indicar um aumento da biogênese mitocondrial (GARBERN; LEE, 2021; NIÑO *et al.*, 2020). A biogênese, junto com a dinâmica mitocondrial e a mitofagia, fazem parte do controle de qualidade mitocondrial e esses mecanismos funcionam de forma conjunta para manter o número adequado de mitocôndrias saudáveis para a célula (PICCA *et al.*, 2018). Tanto no coração quanto no córtex cerebral, ambas as proteínas estavam aumentadas. Portanto, o aumento do conteúdo mitocondrial pode servir para compensar a desregulação no controle de qualidade mitocondrial observada em ambos os tecidos.

Nossas descobertas indicam um aumento nas interações mit-lis em coração e córtex de animais MPS II, afetando os processos de controle de qualidade mitocondrial e resultando em comprometimento bioenergético no córtex cerebral e no coração dos camundongos deficientes. Embora não possamos determinar os mecanismos exatos por trás dessas mudanças nos contatos mit-lis, hipotetizamos que o aumento no número e tamanho dos lisossomos induzidos pelos GAGs possa estar reduzindo a distância entre as organelas, permitindo mais interações mit-lis. No entanto, são necessários mais estudos para confirmar essa hipótese e entender se o número e a duração dos contatos são afetados na MPS II.

Os resultados observados neste trabalho contribuíram, ao menos em parte, com informações sobre a fisiopatologia do dano hepático, cardíaco e cerebral observado na MPS II. Esses tecidos são bastante afetados na MPS II de diferentes formas, e vimos aqui que o metabolismo mitocondrial, a homeostase redox e a interação entre lisossomos e mitocôndrias estão afetadas, porém, cada tecido apresentou danos e mecanismos compensatórios diferentes para cada processo.

Nossas descobertas mostram que as alterações no metabolismo energético, dinâmica e massa mitocondrial, juntamente com distúrbios na homeostase redox, podem estar subjacentes à fisiopatologia das anormalidades hepáticas observadas em pacientes com MPS II. Sugerimos também que a maioria das alterações observadas nas defesas antioxidantes do fígado de camundongos nocaute consistem em mecanismos compensatórios em resposta a níveis elevados de espécies reativas que podem ter sido induzidos mais cedo na vida dos camundongos deficientes. Embora seja difícil extrapolar nossos dados para os pacientes, a maioria deles apresenta aumento do fígado sem maiores complicações, o que é consistente com nossos achados que mostram a indução de mecanismos adaptativos. No entanto, deve-se notar que alguns pacientes desenvolvem cirrose (HAUST, 1968; PARFREY; HUTCHINS, 1986; YOSHIMOTO *et al.*, 2006). Especulamos que esse resultado diferencial pode depender da alta capacidade regenerativa das células hepáticas e dos níveis de acúmulo de GAGs no fígado de cada paciente.

Também vimos pela primeira vez que alterações na comunicação mit-lis, dinâmica, massa e bioenergética mitocondrial e mitofagia ocorrem em camundongos MPS II e podem estar envolvidas na fisiopatologia da disfunção neurológica e dano cardíaco. Além disso, o coração parece mais vulnerável ao dano mitocondrial do que o córtex cerebral, o que pode estar relacionado à maior interação mit-lis observada no tecido cardíaco. Embora de formas diferentes, alterações nas mitocôndrias e no contato mit-lis parecem estar envolvidas na fisiopatologia desses danos na MPS II.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos na presente tese permitem as seguintes conclusões, e que estão sumarizadas na figura 7:

- a. A bioenergética mitocondrial estava alterada nos três tecidos, embora de diferentes formas. No córtex cerebral encontramos a diminuição da atividade enzimática de CS e MDH, porém sem alterações nos complexos da CTE, respiração mitocondrial e produção de ATP. No coração, foi vista uma diminuição da atividade da enzima IDH e diminuição da respiração mitocondrial (sem prejuízos na formação de ATP e atividade dos complexos da CTE). Já no fígado, houve o aumento da atividade das enzimas SDH e MDH, diminuição da α KGDH, aumento da atividade do complexo I da CTE. Contudo, não houve alterações na respiração mitocondrial e produção de ATP;
- b. Não houve alteração no potencial de membrana mitocondrial e na capacidade de retenção de cálcio em nenhum dos tecidos dos animais com MPS II aos 6 meses de idade;
- c. O controle de qualidade mitocondrial também se mostrou alterado de diferentes formas nos tecidos avaliados. No córtex cerebral, encontramos uma diminuição de Drp1 (fissão mitocondrial), aumento de OPA1 (fusão mitocondrial da membrana interna), porém sem alteração de Mfn1 (fusão da membrana mitocondrial externa). Ainda vimos aumento de VDAC e COX IV (massa mitocondrial) e uma diminuição do conteúdo proteico de parkin (mitofagia) e aumento de LC3 (autofagia). No coração, houve a diminuição de Drp1 (fissão) sem alteração na fusão mitocondrial, aumento do conteúdo proteico de VDAC e COX IV, além do aumento de parkin. Já no fígado, houve diminuição de Drp1 e OPA1 (diminuição da fissão e da fusão mitocondrial) e diminuição de VDAC e COX IV (massa mitocondrial);
- d. Não observamos alterações na homeostase redox no córtex cerebral de camundongos MPS II aos 6 meses de idade. No coração desses animais, apenas os níveis de MDA estavam aumentados, indicando lipoperoxidação. Já no fígado houve um aumento da oxidação de DCFH e aumento de MDA (indicativos do aumento de ROS e danos aos lipídeos, respectivamente), concomitante ao aumento das defesas antioxidantes como atividades da SOD, CAT, GPx, GR e GST e níveis de GSH;
- e. No córtex cerebral dos camundongos MPS II aos 6 meses de idade, foi observado uma diminuição do conteúdo proteico de TBC1D15, sem alteração de Fis1 e Rab7. Embora só a primeira proteína tenha estado diminuída, esse resultado já sugere um aumento da interação entre mitocôndrias e lisossomos (mit-lis). No

coração desses animais, houve diminuição de TBC1D15 e aumento de Rab7, indicando uma interação mit-lis ainda maior do que no córtex cerebral.

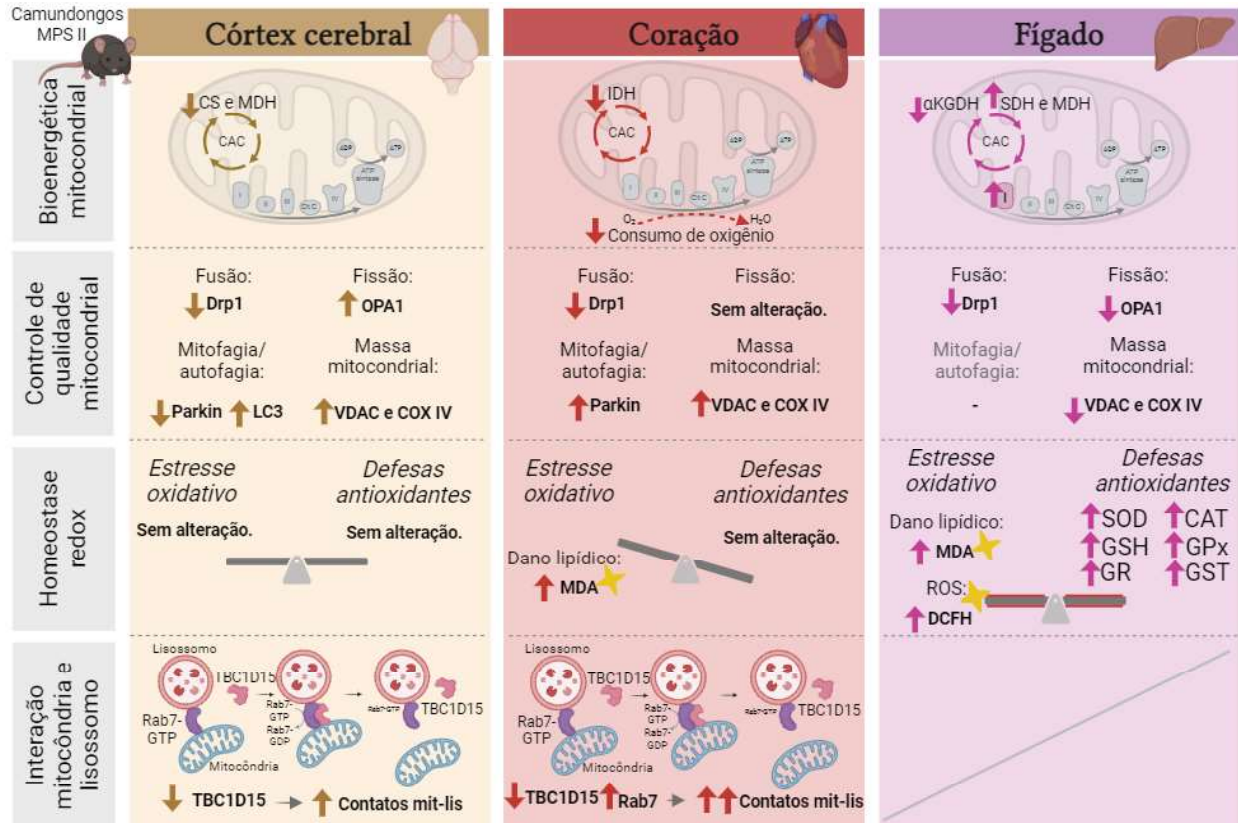


Figura 7: Resumo dos resultados encontrados no córtex cerebral, coração e fígado de animais MPS II aos 6 meses de idade. CAC: Ciclo do ácido cítrico. CAT: Catalase. CS: Citrato sintase. DCFH: 2',7'- diclorofluoresceína. GPx: Glutationa peroxidase. GR: Glutationa redutase. GSH: Glutationa reduzida. GST: Glutationa-S-transferase. IDH: Isocitrato desidrogenase. MDA: Malondialdeído. MDH: Malato desidrogenase. SDH: Succinato desidrogenase. SOD: Superóxido dismutase. αKGDH: α-cetoglutarato desidrogenase. Criado com BioRender.

5. REFERÊNCIAS

- ARATANI, Y.; MIURA, N.; OHNO, N.; SUZUKI, K. [Role of neutrophil-derived reactive oxygen species in host defense and inflammation]. **Medical Mycology Journal**, vol. 53, p. 123–128, 2012. <https://doi.org/10.3314/mmj.53.123>.
- AVRAM, V. F.; MERCE, A. P.; HANCU, I. M.; BATRÂN, A. D.; KENNEDY, G.; ROSCA, M. G.; MUNTEAN, D. M. Impairment of Mitochondrial Respiration in Metabolic Diseases: An Overview. **International Journal of Molecular Sciences Review**, vol. 23, p. 1–25, 2022. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ijms23168852>.
- AZAMBUJA, A. S.; CORREA, L.; GABIATTI, B. P.; MARTINS, G. R.; DE OLIVEIRA FRANCO, Á.; RIBEIRO, M. F. M.; BALDO, G. Aversive and non-aversive memory impairment in the mucopolysaccharidosis II mouse model. **Metabolic Brain Disease**, vol. 33, n° 1, p. 343–345, 1 fev. 2018. <https://doi.org/10.1007/s11011-017-0110-5>.
- AZAMBUJA, A. S.; PIMENTEL-VERA, L. N.; GONZALEZ, E. A.; POLETTI, E.; PINHEIRO, C. V.; MATTE, & U.; GIUGLIANI, & R.; BALDO, G. Evidence for inflammasome activation in the brain of mucopolysaccharidosis type II mice. **Metabolic Brain Disease**, vol. 35, p. 1231–1236, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11011-020-00592-5>.
- BAI, Y.; WU, J.; YANG, Z.; WANG, X.; ZHANG, D.; MA, J. Mitochondrial quality control in cardiac ischemia / reperfusion injury: new insights into mechanisms and implications. **Cell Biology and Toxicology**, vol. 11, p. 1–19, 2022. DOI 10.1007/s10565-022-09716-2. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10565-022-09716-2>.
- BENNETT, C. F.; LATORRE-MURO, P.; PUIGSERVER, P. Mechanisms of mitochondrial respiratory adaptation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, vol. 23, p. 817–835, 1 dez. 2022. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00506-6>.
- BOCK, F. J.; TAIT, S. W. G. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, vol. 21, n° 2, p. 85–100, 1 fev. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0173-8>.
- BROWNE, R. W.; ARMSTRONG, D. Reduced Glutathione and Glutathione Disulfide. **Methods in Molecular Biology**, vol. 108, p. 347–352, 1998. <https://doi.org/10.1385/0-89603-472-0:347>.
- CALBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione Reductase. **Methods in Enzymology**, vol. 113, p. 484–490, 1985. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(85\)13062-4](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(85)13062-4).
- CELIK, B.; TOMATSU, S. C.; TOMATSU, S.; KHAN, S. A. Epidemiology of mucopolysaccharidoses Update. **Diagnostics**, vol. 11, p. 1–37, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2017.12.311>.
- CISNEROS, J.; BELTON, T. B.; SHUM, G. C.; MOLAKAL, C. G.; WONG, Y. C. Mitochondria-lysosome contact site dynamics and misregulation in neurodegenerative

- diseases. **Trends in Neurosciences**, vol. 45, p. 312–322, 1 abr. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2022.01.005>.
- D'AVANZO, F.; RIGON, L.; ZANETTI, A.; TOMANIN, R. Mucopolysaccharidosis type II: One hundred years of research, diagnosis, and treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 21, p. 1–38, 1 fev. 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21041258>.
- DARD, L.; BLANCHARD, W.; HUBERT, C.; LACOMBE, D.; ROSSIGNOL, R. Mitochondrial functions and rare diseases. **Molecular Aspects of Medicine**, vol. 71, p. 100842, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2019.100842>.
- DELANTY, N.; DICHTER, M. Oxidative injury in the nervous system. **Acta Neurologica Scandinavica**, vol. 3, p. 145–153, 1998. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.1998.tb07285.x>.
- FAAS, M. M.; DE VOS, P. Mitochondrial function in immune cells in health and disease. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, vol. 1866, n° 10, 1 out. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165845>.
- FIGUEIRA, T. R.; BARROS, M. H.; CAMARGO, A. A.; CASTILHO, R. F.; FERREIRA, J. C. B.; KOWALTOWSKI, A. J.; SLUSE, F. E.; SOUZA-PINTO, N. C.; VERCESI, A. E. Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: From molecular mechanisms to human health. **Antioxidants and Redox Signaling**, vol. 18, n° 16, p. 2029–2074, 1 jun. 2013. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4729>.
- FILIPPON, L.; VANZIN, C. S.; BIANCINI, G. B.; PEREIRA, I. N.; MANFREDINI, V.; SITTA, A.; PERALBA, M. do C. R.; SCHWARTZ, I. V.D.; GIUGLIANI, R.; VARGAS, C. R. Oxidative stress in patients with mucopolysaccharidosis type II before and during enzyme replacement therapy. **Molecular Genetics and Metabolism**, vol. 103, p. 121–127, jun. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2011.02.016>.
- FRISO, A.; TOMANIN, R.; SALVALAIO, M.; SCARPA, M. Genistein reduces glycosaminoglycan levels in a mouse model of mucopolysaccharidosis type II. **British Journal of Pharmacology**, vol. 159, p. 1082–1091, mar. 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00565.x>.
- GAFFKE, L.; PIERZYNOWSKA, K.; RINTZ, E.; CYSKE, Z.; GIECEWICZ, I.; WEGRZYN, G. Gene expression-related changes in morphologies of organelles and cellular component organization in mucopolysaccharidoses. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 22, p. 1–23, 1 mar. 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms22052766>.
- GARBERN, J. C.; LEE, R. T. Mitochondria and metabolic transitions in cardiomyocytes: lessons from development for stem cell-derived cardiomyocytes. **Stem Cell Research and Therapy**, vol. 12, p. 1–25, 1 dez. 2021. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02252-6>.
- GARCIA, A. R.; PAN, J.; LAMSA, J. C.; MUENZER, J. The characterization of a murine model of mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome). **Journal of Inherited**

Metabolic Disease, vol. 30, p. 924–934, nov. 2007. <https://doi.org/10.1007/s10545-007-0641-8>.

GRIFFIN, L. S.; GLOSTER, T. M. The Enzymatic Degradation of Heparan Sulfate. **Protein & Peptide Letters**, vol. 8, p. 710–722, 2017. <https://doi.org/10.2174/0929866524666170724113452>.

GUFFON, N.; BERTRAND, Y.; FOREST, I.; FOUILHOUX, A.; FROISSART, R. Bone Marrow Transplantation in Children with Hunter Syndrome: Outcome after 7 to 17 Years. **Journal of Pediatrics**, vol. 154, p. 733–737, maio 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2008.11.041>.

GUO, L.; CHEN, S.; OU, L.; LI, S.; YE, Z. N.; LIU, H. F. Disrupted Alpha-Ketoglutarate Homeostasis: Understanding Kidney Diseases from the View of Metabolism and Beyond. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity**, vol. 15, p. 1961–1974, 2022. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S369090>.

GYURKOCZA, B.; SANDMAIER, B. M. Conditioning regimens for hematopoietic cell transplantation: One size does not fit all. **Blood**, vol. 124, p. 344–353, 17 jul. 2014. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-02-514778>.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. [S. l.]: Oxford Academic, 2015. vol. 5, .

HALLIWELL, Barry. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**, vol. 141, p. 312–322, 2006. <https://doi.org/10.1104/pp.106.077073>.

HAMANN, I.; PETROLL, K.; GRIMM, L.; HARTWIG, A.; KLOTZ, L. O. Insulin-like modulation of Akt/FoxO signaling by copper ions is independent of insulin receptor. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, vol. 558, p. 42–50, 15 set. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.06.004>.

HAMPE, C. S.; YUND, B. D.; ORCHARD, P. J.; LUND, T. C.; WESLEY, J.; SCOTT MCIVOR, R. Differences in MPS I and MPS II disease manifestations. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 22, p. 1–25, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms22157888>.

HANSEN, R. E.; ROTH, D.; WINTHER, J. R. Quantifying the global cellular thiol-disulfide status. **PNAS**, vol. 106, p. 422–427, 2008. DOI 10.1073/pnas.0812149106. Disponível em: www.pnas.org/cgi/content/full/.

HAUST, M. D. Mitochondrial budding and morphogenesis of cytoplasmic vacuoles in hepatocytes of children with the hurler syndrome and sanfilippo disease. **Experimental and Molecular Pathology**, vol. 9, p. 242–257, 1968. [https://doi.org/10.1016/0014-4800\(68\)90039-7](https://doi.org/10.1016/0014-4800(68)90039-7).

HUNTER, G. A.; FERREIRA, G. C. Molecular enzymology of 5-Aminolevulinate synthase, the gatekeeper of heme biosynthesis. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, vol. 1814, p. 1467–1473, nov. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.12.015>.

IRANI, K. Oxidant Signaling in Vascular Cell Growth, Death, and Survival: A Review of the Roles of Reactive Oxygen Species in Smooth Muscle and Endothelial Cell Mitogenic and Apoptotic Signaling. **Circulation Research**, vol. 87, p. 179–183, 2000. <https://doi.org/10.1161/01.res.87.3.179>.

JACKSON, R. L.; BUSCH, S. J.; CARDIN, A. D. Glycosaminoglycans: Molecular Properties, Protein Interactions, and Role in Physiological Processes. **PHYSIOLOGICAL REVIEWS**, vol. 71, p. 481–539, 1991. <https://doi.org/10.1152/physrev.1991.71.2.481>.

JACQUES, C. E. D.; LOPES, F. F.; POLETTI, E.; VERA, L. N. P.; VIANNA, P.; REINHARDT, L. S.; BALDO, G.; VARGAS, C. R. Evaluation of oxidative stress and mitochondrial function in a type II mucopolysaccharidosis cellular model: in vitro effects of genistein and coenzyme Q10. **Metabolic Brain Disease**, 1 fev. 2022. <https://doi.org/10.1007/s11011-022-01062-w>.

KEKRE, N.; ANTIN, J. H. Hematopoietic stem cell transplantation donor sources in the 21st century: choosing the ideal donor when a perfect match does not exist. **Blood**, vol. 124, p. 334–343, 2014. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-02>.

KISELYOV, K.; JENNIGS, J. J. J.; RBAIBI, Y.; CHU, C. T. Autophagy, Mitochondria and Cell Death in Lysosomal Storage Diseases. **Autophagy**, vol. 3, p. 259–262, 2007. <https://doi.org/10.4161/auto.3906>.

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

LEBEL, C. P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDYS, S. C. Evaluation of the Probe 2',7'-Dichlorofluorescein as an Indicator of Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress. **Chemical Research in Toxicology**, vol. 5, p. 227–231, 1992. <https://doi.org/10.1021/tx00026a012>.

LIU, X.; KIM, C. N.; YANG, J.; JEMMERSON, R.; WANG, X. **Induction of Apoptotic Program in Cell-Free Extracts: Requirement for dATP and Cytochrome c**. [S. l.: s. n.], 1996.

LLOYD-EVANS, E.; HASLETT, L. J. The lysosomal storage disease continuum with ageing- related neurodegenerative disease. **Ageing Research Reviews**, vol. 32, p. 104–121, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.07.005>.

MAILLOUX, R. J.; SINGH, R.; BREWER, G.; AUGER, C.; LEMIRE, J.; APPANNA, V. D. α -ketoglutarate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase work in tandem to modulate the antioxidant α -ketoglutarate during oxidative stress in *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Bacteriology**, vol. 191, p. 3804–3810, jun. 2009. <https://doi.org/10.1128/JB.00046-09>.

MANNERVIK, B.; GUTHENBERG, C. Glutathione Transferase (Human Placenta). **Methods in Enzymology**, vol. 77, p. 231–235, 1981. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(81\)77030-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(81)77030-7).

- MARTÍNEZ-REYES, I.; CHANDEL, N. S. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. **Nature Communications**, vol. 11, p. 1–11, 1 dez. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13668-3>.
- MEIKLE, P. J.; FULLER, M.; HOPWOOD, J. J. Chapter 10 – Lysosomal Degradation of Heparin and Heparan Sulfate. [*S. l.: s. n.*], 2005. <https://doi.org/10.1016/B978-008044859-6/50011-3>.
- MOHAMED, S.; HE, Q. Q.; SINGH, A. A.; FERRO, V. Mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): Clinical and biochemical aspects of the disease and approaches to its diagnosis and treatment. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**. [*S. l.*]: Academic Press Inc., 2020. vol. 77, p. 71–117. <https://doi.org/10.1016/bs.accb.2019.09.001>.
- MUENZER, J.; LAMSA, J. C.; GARCIA, A.; DACOSTA, J.; GARCIA, J.; TRECO, D. A. Enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): a preliminary report. **Acta Paediatr Suppl**, vol. 439, p. 91–98, 2002. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2002.tb03115.x>.
- NELSON, D. L. Lehninger principles of biochemistry. **Lehninger principles of biochemistry**. 7^o ed. New York: W.H. Freeman, 2017.
- NEUFELD, E. F.; MUENZER, J. The Mucopolysaccharidoses. *In*: THE MCGRAW–HILL COMPANIES (org.). **OMMBID- The Online Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease**. New York: [*s. n.*], 2001. p. 3421–3452. <https://doi.org/10.1036/ommbid.165>.
- NICHOLLS, D. G.; FERGUSON, S. J. **Bioenergetics 4**. 4^o ed. [*S. l.*]: Academic Press, 2013.
- NIÑO, S. A.; CHI-AHUMADA, E.; ORTÍZ, J.; ZARAZUA, S.; CONCHA, L.; JIMÉNEZ-CAPDEVILLE, M. E. Demyelination associated with chronic arsenic exposure in Wistar rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, vol. 393, p. 1–9, 15 abr. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2020.114955>.
- ONISHI, M.; YAMANO, K.; SATO, M.; MATSUDA, N.; OKAMOTO, K. Molecular mechanisms and physiological functions of mitophagy. **The EMBO Journal**, vol. 40, n^o 3, fev. 2021. <https://doi.org/10.15252/embj.2020104705>.
- PAK, J. H.; KIM, Y.; YI, J.; CHUNG, J. W. Antioxidant therapy against oxidative damage of the inner ear: Protection and preconditioning. **Antioxidants**, vol. 9, p. 1–21, 1 nov. 2020. <https://doi.org/10.3390/antiox9111076>.
- PARFREY, N. A.; HUTCHINS, G. M. Hepatic fibrosis in the mucopolysaccharidoses. **The American Journal of Medicine**, vol. 81, p. 825–829, 1986. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(86\)90353-0](https://doi.org/10.1016/0002-9343(86)90353-0).
- PENG, W.; SCHRÖDER, L. F.; SONG, P.; WONG, Y. C.; KRAINIC, D. Parkin regulates amino acid homeostasis at mitochondria-lysosome (M/L) contact sites in Parkinson's disease. **Science Advances**, vol. 9, p. 1–14, 2023. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adh3347>.

- PENG, W.; WONG, Y. C.; KRAINIC, D. Mitochondria-lysosome contacts regulate mitochondrial Ca²⁺ dynamics via lysosomal TRPML1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol. 117, p. 19266–19275, 2020. <https://doi.org/10.1073/pnas.2003236117>.
- PICCA, A.; MANKOWSKI, R. T.; BURMAN, J. L.; DONISI, L.; KIM, J. S.; MARZETTI, E.; LEEUWENBURGH, C. Mitochondrial quality control mechanisms as molecular targets in cardiac ageing. **Nature Reviews Cardiology**, vol. 15, p. 543–554, 1 set. 2018. <https://doi.org/10.1038/s41569-018-0059-z>.
- PLATT, F. M.; BOLAND, B.; SPOEL, A. C. Lysosomal storage disorders : The cellular impact of lysosomal dysfunction. **The Journal Of Cell Biology**, vol. 199, p. 723–734, 2012. <https://doi.org/10.1083/jcb.201208152>.
- POLETO, E.; PASQUALIM, G.; GIUGLIANI, R.; MATTE, U.; BALDO, G. Effects of gene therapy on cardiovascular symptoms of lysosomal storage diseases. **Genetics and Molecular Biology**, vol. 42, p. 261–285, 2019. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2018-0100>.
- POPOV, L.-D. Mitochondrial biogenesis: An update. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, vol. 24, p. 4892–4899, 2020. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15194>.
- POSWAR, F. de O.; SANTOS, H. S.; SANTOS, A. B. S.; BERGER, S. V.; SOUZA, C. F. M. de; GIUGLIANI, R.; BALDO, G. Progression of Cardiovascular Manifestations in Adults and Children With Mucopolysaccharidoses With and Without Enzyme Replacement Therapy. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, vol. 8, p. 1–11, 12 jan. 2022. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.801147>.
- PSHEZHETSKY, A. V. Crosstalk between 2 organelles: Lysosomal storage of heparan sulfate causes mitochondrial defects and neuronal death in mucopolysaccharidosis III type C. **Rare Diseases**, vol. 3, p. 1–7, 2015. <https://doi.org/10.1080/21675511.2015.1049793>.
- REGENXBIO. CAMPSIITE™ RGX-121 Gene Therapy in Subjects With MPS II (Hunter Syndrome). 2023. <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03566043>. .
- ROGINSKI, A. C.; WAJNER, A.; CECATTO, C.; WAJNER, S. M.; CASTILHO, R. F.; WAJNER, M.; AMARAL, A. U. Disturbance of bioenergetics and calcium homeostasis provoked by metabolites accumulating in propionic acidemia in heart mitochondria of developing rats. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, vol. 1866, n° 5, p. 165682, 2020. DOI 10.1016/j.bbadis.2020.165682. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165682>.
- ROSSIGNOL, R.; FAUSTIN, B.; ROCHER, C.; MALGAT, M.; MAZAT, J.-P.; LETELLIER, T. Mitochondrial threshold effects. **Biochemical Journal**, vol. 370, p. 751–762, 2003. <https://doi.org/10.1042/BJ20021594>.
- SCARPA, M. Evaluation of idursulfase for the treatment of mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome). **Expert Opinion on Orphan Drugs**, vol. 1, p. 89–98, 2013. <https://doi.org/10.1517/21678707.2013.738182>.

- SEMINOTTI, B.; GRINGS, M.; TUCCI, P.; LEIPNITZ, G.; SASO, L. Nuclear Factor Erythroid-2-Related Factor 2 Signaling in the Neuropathophysiology of Inherited Metabolic Disorders. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, vol. 15, p. 1–14, 26 nov. 2021. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.785057>.
- SETTEMBRE, C.; FRALDI, A.; MEDINA, D. L.; BALLABIO, A. Signals from the lysosome: A control centre for cellular clearance and energy metabolism. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, vol. 14, p. 283–296, maio 2013. <https://doi.org/10.1038/nrm3565>.
- SHIRIHAI, O. S.; SONG, M.; DORN, G. W. How mitochondrial dynamism orchestrates mitophagy. **Circulation Research**, vol. 116, p. 1835–1849, 2015. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.306374>.
- SMIRNOVA, E.; GRIPARIC, L.; SHURLAND, D.-L.; VAN DER BLIEK, A. M. Dynamin-related Protein Drp1 Is Required for Mitochondrial Division in Mammalian Cells. **Molecular Biology of the Cell**, vol. 12, p. 2245–2256, 2001. .
- SONG, Z.; GHOCHANI, M.; MCCAFFERY, J. M.; FREY, T. G.; CHAN, D. C.; SHAW, J. M. Mitofusins and OPA1 Mediate Sequential Steps in Mitochondrial Membrane Fusion. **Molecular Biology of the Cell**, vol. 20, p. 3525–3532, 2009. <https://doi.org/10.1091/mbc.E09>.
- SOUTHORN, P. A.; POWIS, G. Free Radicals in Medicine. I. Chemical Nature and Biologic Reactions. **Mayo Clinic Proceedings**, vol. 63, p. 381–389, 1988. [https://doi.org/10.1016/S0025-6196\(12\)64861-7](https://doi.org/10.1016/S0025-6196(12)64861-7).
- SUN, S.; YU, W.; XU, H.; LI, C.; ZOU, R.; WU, N. N.; WANG, L.; GE, J.; REN, J.; ZHANG, Y. TBC1D15-Drp1 interaction-mediated mitochondrial homeostasis confers cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury. **Metabolism: Clinical and Experimental**, vol. 134, p. 1–21, 1 set. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2022.155239>.
- TAVARES, A. M. V.; GONZALEZ, E. A.; VIANA, I. S.; VISIOLI, F.; VERA, L. N. P.; BALDO, G. Characterization of heart disease in mucopolysaccharidosis type II mice. **Cardiovascular Pathology**, vol. 67, p. 1–9, 1 nov. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2023.107575>.
- TESSITORE, A.; PIROZZI, M.; AURICCHIO, A. Abnormal autophagy, ubiquitination, inflammation and apoptosis are dependent upon lysosomal storage and are useful biomarkers of mucopolysaccharidosis VI. **PathoGenetics**, vol. 2, p. 1–12, 2009. <https://doi.org/10.1186/1755-8417-2-4>.
- THOMAS, A. J.; POLAND, B.; HONZATKO, R. Protein sulfhydryls and their role in the antioxidant function of protein S-thiolation. **Archives of Biochemistry and biophysics**, vol. 319, p. 1–9, 1995. <https://doi.org/10.1006/abbi.1995.1261>.
- TODKAR, K.; ILAMATHI, H. S.; GERMAIN, M. Mitochondria and Lysosomes : Discovering Bonds. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, vol. 5, p. 1–7, 2017. <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00106>.

- TOMATSU, S.; AZARIO, I.; SAWAMOTO, K.; PIEVANI, A. S.; BIONDI, A.; SERAFINI, M. Neonatal cellular and gene therapies for mucopolysaccharidoses: the earlier the better? **Journal of Inherited Metabolic Disease**, vol. 39, p. 189–202, 1 mar. 2016. <https://doi.org/10.1007/s10545-015-9900-2>.
- TRIVEDI, P. C.; BARTLETT, J. J.; PULINILKUNNIL, T. Lysosomal Biology and Function: Modern View of Cellular Debris Bin. **Cells**, vol. 9, p. 1–37, maio 2020. <https://doi.org/10.3390/cells9051131>.
- VALENZANO, K. J.; KHANNA, R.; POWE, A. C.; BOYD, R.; LEE, G.; FLANAGAN, J. J.; BENJAMIN, E. R. Identification and characterization of pharmacological chaperones to correct enzyme deficiencies in lysosomal storage disorders. **Assay and Drug Development Technologies**, vol. 9, p. 213–235, 1 jun. 2011. <https://doi.org/10.1089/adt.2011.0370>.
- WJNER, M.; VARGAS, C. R.; AMARAL, A. U. Disruption of mitochondrial functions and oxidative stress contribute to neurologic dysfunction in organic acidurias. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, vol. 696, p. 108646, 2020. DOI 10.1016/j.abb.2020.108646. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108646>.
- WALL, S. B.; OH, J. Y.; DIERS, A. R.; LANDAR, A. Oxidative modification of proteins: An emerging mechanism of cell signaling. **Frontiers in Physiology**, vol. 3, p. 1–9, 2012. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00369>.
- WEBB, R.; HUGHES, M. G.; THOMAS, A. W.; MORRIS, K. The ability of exercise-associated oxidative stress to trigger redox-sensitive signalling responses. **Antioxidants**, vol. 6, p. 1–21, 1 set. 2017. <https://doi.org/10.3390/antiox6030063>.
- WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, vol. 77, p. 325–333, 1981. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(81\)77046-0](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(81)77046-0).
- WONG, Y. C.; KIM, S.; PENG, W.; KRAINC, D. Regulation and Function of Mitochondria – Lysosome Membrane Contact Sites in Cellular Homeostasis. **Trends in Cell Biology**, vol. 29, p. 500–513, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.02.004>.
- WONG, Y. C.; YSSELSTEIN, D.; KRAINC, D. Mitochondria–lysosome contacts regulate mitochondrial fission via RAB7 GTP hydrolysis. **Nature**, vol. 554, p. 382–386, 2018. <https://doi.org/10.1038/nature25486>.
- WRAITH, J. E.; SCARPA, M.; BECK, M.; BODAMER, O. A.; DE MEIRLEIR, L.; GUFFON, N.; MELDGAARD LUND, A.; MALM, G.; VAN DER PLOEG, A. T.; ZEMAN, J. Mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): A clinical review and recommendations for treatment in the era of enzyme replacement therapy. **European Journal of Pediatrics**, vol. 167, p. 267–277, mar. 2008. <https://doi.org/10.1007/s00431-007-0635-4>.
- YAGI, K. Simple Procedure for Specific Assay of Lipid Hydroperoxides in Serum or Plasma. **Methods in Molecular Biology**, vol. 108, p. 107–110, 1998. <https://doi.org/10.1385/0-89603-472-0:107>.
- YOSHIMOTO, T.; NAKAMUTA, M.; KOTOH, K.; KOHJIMA, M.; MORIZONO, S.; MIYAGI, Y.; SAKAI, H.; ENJOJI, M. An adult case with Hunter’s syndrome presenting

prominent hepatic failure: Light and electron microscopic features of the liver. **Internal Medicine**, vol. 45, p. 1133–1135, 2006.
<https://doi.org/10.2169/internalmedicine.45.6005>.

ZHAO, R. Z.; JIANG, S.; ZHANG, L.; YU, Z. Bin. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, vol. 44, p. 3–15, 2019. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4188>.

ZHOU, J.; LIN, J.; LEUNG, W. T.; WANG, L. A basic understanding of mucopolysaccharidosis: Incidence, clinical features, diagnosis, and management. **Intractable and Rare Diseases Research**, vol. 9, p. 1–9, 2020.
<https://doi.org/10.5582/irdr.2020.01011>.

6. ANEXOS

6.1. Resultados adicionais

6.1.1 Metodologia

Animais: Camundongos machos C57BL/6 MPS II (IDS-KO, os animais foram adquiridos do Jackson's Lab, EUA – www.jax.org/strain/024744) e camundongos normais C57BL/6 (tipo selvagem – WT) foram usados para os experimentos. A criação do camundongo knockout de iduronato-2-sulfatase (IDS-KO) foi previamente descrita por Muenzer. Esses animais foram mantidos na Unidade de Experimentação Animal (UEA-HCPA, Brasil) em caixas plásticas com no máximo 4 animais por caixa, em ambiente controlado (temperatura 20–24 °C, umidade relativa 40–60% e sistemas de exaustão de ar) com ciclos de 12 h de luz/12 h de escuro e ração comercial padrão para a espécie e água ad libitum. Aos 2, 4 e 6 meses, os animais foram eutanasiados, e o fígado foi removido para a determinação dos parâmetros.

Preparo da amostra: Para a avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo, os fígados foram homogeneizados (1:10, p/v) em tampão de fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4, contendo 140 mM de KCl. Os homogeneizados foram centrifugados a 1000 g por 20 min a 4 °C para eliminar núcleos e restos celulares presentes no pellet, e os sobrenadantes foram usados nos ensaios. A absorbância e a fluorescência foram lidas no leitor de microplacas SpectraMax M5 (CA, EUA).

Concentrações de glutathiona reduzida (GSH): A determinação das concentrações de glutathiona reduzida (GSH) foi realizada de acordo com Browne e Armstrong. As amostras foram tratadas com ácido metafosfórico a 2% (1:1, v/v) e centrifugadas a 7.000 g por 10 min. Os sobrenadantes foram incubados com tampão de fosfato de sódio 100 mM contendo 5 mM de EDTA (pH 8,0) e 0,75 µg/mL de o-ftaldialdeído (1 mg/mL, preparado em metanol) por 15 min em temperatura ambiente no escuro. A fluorescência foi medida a 350 (excitação) e 420 (emissão) nm, e os resultados foram expressos como nmol de GSH por mg de proteína. Uma curva de calibração foi preparada com uma solução comercial de GSH (0,001–1 mM).

Atividade das enzimas antioxidantes: A atividade da glutathiona peroxidase (GPx) foi medida usando terc-butilhidroperóxido como substrato e determinada pelo monitoramento do decaimento de NADPH a 340 nm. A atividade específica foi expressa

como U por mg de proteína. A atividade da glutathione S-transferase (GST) foi medida monitorando a taxa de formação de dinitrofenil-S-glutathione a 340 nm, usando 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato. Os resultados foram expressos como U por mg de proteína. A atividade da glutathione redutase (GR) foi determinada pelo monitoramento do consumo de NADPH a 340 nm. A atividade específica foi expressa como U por mg de proteína.

Oxidação de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH): Os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) nos sobrenadantes do fígado foram determinados de acordo com o método de Lebel, usando diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCF-DA). As amostras foram incubadas por 30 min a 37 °C com DCF-DA, que é finalmente convertido no produto fluorescente DCF por ROS. A fluorescência foi medida usando comprimentos de onda de 480 nm (excitação) e 535 nm (emissão). Uma curva de calibração foi realizada com DCF padrão (1–10 µM), e a concentração de ROS foi expressa como µmol de DCF formado por mg de proteína.

Níveis de malondialdeído (MDA): Os níveis de MDA foram medidos para avaliar a peroxidação lipídica. Os sobrenadantes do fígado foram incubados a 100 °C por 1 h na presença de 10% de ácido tricloroacético e 0,67% de ácido tiobarbitúrico em 7,1% de sulfato de sódio. Após o resfriamento, o butanol foi usado para extrair o complexo rosa formado durante a reação, e a fluorescência foi medida em comprimentos de onda de 515 nm (excitação) e 553 nm (emissão). Uma curva de calibração foi realizada com 1,1,3,3-tetrametoxipropano. Os resultados foram expressos como nmol de MDA por mg de proteína.

6.1.2 Resultados

Foi verificado nos resultados em fígado dos camundongos de 6 meses deste trabalho, melhor explorados no capítulo I, que há um desequilíbrio da homeostase redox. Visto isso, gostaríamos de tentar identificar em que momento da vida desse animal esse desbalanço redox estivesse iniciando. Para isso, foi feita a avaliação de alguns desses parâmetros em tecidos de animais mais jovens (2 meses e 4 meses). Foi verificado que os níveis de GSH e a atividade da GPx já estavam aumentados no fígado de camundongos MPS II aos 4 meses de idade (Figuras 8A e 8B) embora as atividades da GST e GR só estavam aumentadas aos 6 meses de idade (Figuras 8C e 8D).

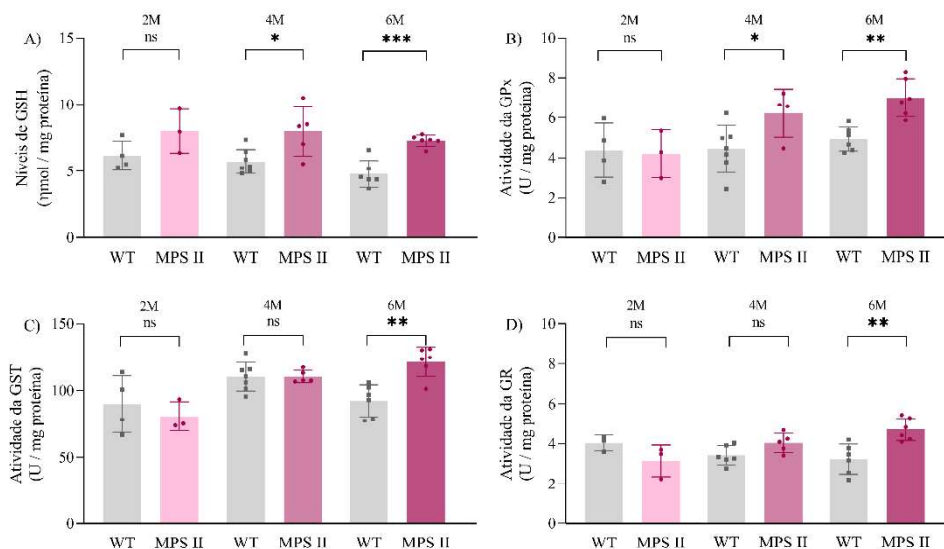


Figura 8: Defesas antioxidantes não enzimáticas e enzimáticas no fígado de camundongos MPS II com 2, 4 e 6 meses de idade (2M, 4M e 6M, respectivamente). A) Níveis de glutathiona reduzida (GSH), B) atividade da glutathiona peroxidase (GPx), C) atividade da glutathiona S-transferase (GST) e D) atividade da glutathiona redutase (GR). Os dados são representados como média \pm desvio padrão de 3 a 7 animais independentes por grupo. ns: sem significância; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, em comparação com camundongos wild type (WT) (teste t de Student para amostras não pareadas). Os níveis de GSH foram medidos conforme (BROWNE; ARMSTRONG, 1998), a atividade da GPx conforme (WENDEL, 1981), atividade da GST de acordo com (MANNERVIK; GUTHENBERG, 1981) e a GR conforme (CALBERG; MANNERVIK, 1985).

Também determinamos a oxidação de DCFH como medida de produção de EROs e os níveis de MDA como medida de peroxidação lipídica em tecido de animais mais jovens (4 meses) para compararmos com os resultados obtidos nos animais de 6 meses. Nossos resultados indicaram que aos 4 meses ainda não existe diferença nos dois parâmetros, ou seja, não tem aumento significativo de EROs nem dano aos lipídeos (Figura 9A e 9B). Contudo, como pode ser observado, algumas defesas antioxidantes já estão elevadas aos 4 meses de idade nesses camundongos, então é possível que não tenhamos detectado diferença de EROs e dano aos lipídeos por limitações das técnicas disponíveis. Também não podemos descartar que os tecidos tenham ficado armazenados em ultra freezer por tempo longo demais, influenciando nos resultados obtidos. Portanto,

uma investigação mais acurada deveria ser realizada para determinar em que momento (período da vida) começa o aumento das espécies reativas e danos decorrentes que levam à ativação do sistema antioxidante.

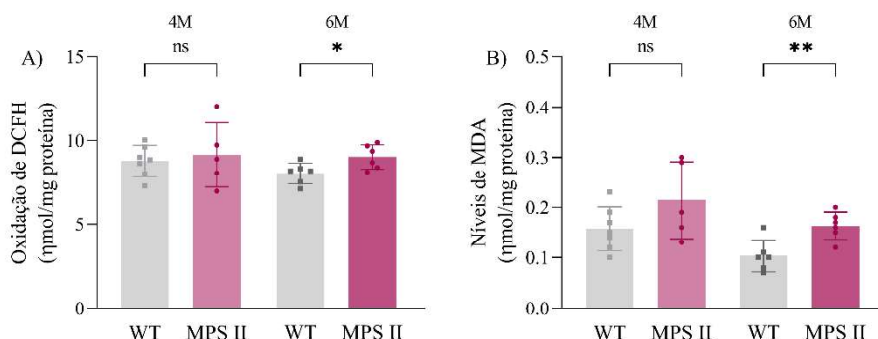




Figura 9: Níveis de espécies reativas de oxigênio e dano oxidativo lipídico no fígado de camundongos MPS II com 4 (4M) e 6 (6M) meses de idade. A) Oxidação da 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH) e B) níveis de malondialdeído (MDA). Os dados são representados como média \pm desvio padrão de 5 a 7 animais independentes por grupo. ns: sem significância; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, em comparação com camundongos wild type (WT) (teste t de Student para amostras não pareadas). A oxidação de DCFH foram determinados conforme (LEBEL; ISCHIROPOULOS; BONDYS, 1992) e os níveis de MDA de acordo com (YAGI, 1998).

6.2. Carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

	UFRGS UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL	PRÓ-REITORIA DE PESQUISA Comissão De Ética No Uso De Animais	
---	--	--	---

CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 38842
Título: ALTERACOES MITOCONDRIAIS EM UMA DOENÇA DE DEPOSITO LISOSSOMICO ? MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO II


Vigência: 01/12/2020 à 30/12/2024

Pesquisadores:
Equipe UFRGS:

GUILHIAN LEIPNITZ - coordenador desde 01/12/2020
CAMILA VIEIRA PINHEIRO - desde 01/12/2020
GUILHERME BALDO - pesquisador desde 01/12/2020

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 25/01/2021 - Reunião via webconferência - Mconf UFRGS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 63 camundongos machos IDS-KO/MPS II (JAX número 024744) de 6 meses de idade e 63 camundongos machos controle (wild-type) de 6 meses de idade, provenientes da Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Segunda-Feira, 1 de Fevereiro de 2021


ALEXANDRE TAVARES DUARTE DE OLIVEIRA
Coordenador da comissão de ética

1

6.3. Carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)



HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

Grupo de Pesquisa e Pós Graduação

Carta de Aprovação

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

Projeto: 2020/0113

Título: Alterações mitocondriais em uma doença de depósito lisossômico - Mucopolissacaridose tipo II

Pesquisador Responsável: GUILHERME BALDO

Equipe de Pesquisa:

CAMILA VIEIRA PINHEIRO

LUISA NATALIA PIMENTEL VERA

GUILHIAN LEIPNITZ

Data de Aprovação: 14/04/2021

Data de Término: 10/12/2023

Espécie/Linhagem	Sexo/Idade	Quantidade	Data Reunião	Documento
CAMUNDONGO KNOCKOUT	M/6 Mês(es)	126	13/04/2021	Projeto

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



Assinado digitalmente por:
PATRICIA ASHTON PROLLA

Grupo de Pesquisa e Pós-graduação
03/05/2021 17:28:22

<https://portal.informacao.ufrgs.br/portal/informacao/publicacoes/detalhes/publicacao/147811/c2>