

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**FARMACÊUTICAS**

**Avaliação do Dano a Proteínas, a Lipídios e ao DNA em Pacientes  
com Mucopolissacaridoses tipos II e IVA: Efeito *In Vivo* da Terapia de  
Reposição Enzimática e *In Vitro* da Genisteína**

**GIOVANNA WEBSTER NEGRETTO**

**PORTO ALEGRE, 2013**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**FARMACÊUTICAS**

**Avaliação do Dano a Proteínas, a Lipídios e ao DNA em Pacientes  
com Mucopolissacaridoses tipos II e IVA: Efeito *In Vivo* da Terapia de  
Reposição Enzimática e *In Vitro* da Genisteína**

Dissertação apresentada por **Giovanna Webster Negretto**  
para obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Carmen Regla Vargas

Porto Alegre, 2013

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 24.09.2013, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Crsitiane Matte  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Guilhian Leipnitz  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Sharon Ladgraff Schlup  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul

#### CIP - Catalogação na Publicação

Negretto, Giovanna Webster

Avaliação do dano a proteínas, a lipídios e ao DNA em pacientes com mucopolissacaridoses tipos II e IVA: efeito in vivo da terapia de reposição enzimática e in vitro da genisteína / Giovanna Webster Negretto. -- 2013.  
113 f.

Orientadora: Carmen Regla Vargas.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Mucopolissacaridoses. 2. Estresse Oxidativo. 3. Genisteína. 4. Terapia de Reposição Enzimática. 5. Glicosaminoglicanos. I. Vargas, Carmen Regla, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análise de Metabólitos do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, com financiamento da CAPES e do FIPE/HCPA.



## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dra. Carmen Regla Vargas, pelos ensinamentos, dedicação, flexibilidade, confiança e oportunidade.

Ao Dr. Roberto Giugliani pela disponibilidade e apoio na realização do mestrado.

Ao Serviço de Genética Médica e Centro de Pesquisa Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela disponibilização da infra-estrutura e recursos humanos para a realização das coletas de amostras e experimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS pela oportunidade de desenvolver o mestrado em um programa de qualidade;

Aos pacientes e familiares, pela disponibilidade, amizade e troca de experiências.

Aos colegas do Laboratorio de Análise de Metabólitos, pela amizade e apoio na realização do mestrado.

Ao colegas do Hospital Mãe de Deus e Hospital de Clínicas de Porto Alegre, por todo o apoio e flexibilização de horários.

As minhas grandes amigas Gabriela, Luiza, Sara e Ana pela amizade e torcida.

Ao meu amor, Lucas, pela cumplicidade, carinho, compreensão e por me fazer mais feliz.

À minha avó, Maria, pelo carinho, companheirismo e amor.

Aos meus pais e irmã pelo amor imensurável, incentivo, carinho e dedicação.

À Deus, por me dar força, coragem e proteção.





“A mente que se abre a uma  
nova idéia jamais voltará ao  
seu tamanho original.”

Albert Einstein



## RESUMO

**Objetivos:** Investigar o dano a lipídios, proteínas e ao DNA, níveis de glicosaminoglicanos (GAGs) e as concentrações de interleucina 1- $\beta$  (IL1- $\beta$ ) em sangue de pacientes com Mucopolissacaridose (MPS) tipo II no diagnóstico e durante a terapia de reposição enzimática (TRE) e correlacioná-los com parâmetros de estresse oxidativo, bem como analisar o efeito *in vitro* da genisteína sob o dano ao DNA em leucócitos de pacientes com MPS tipo IVA.

**Métodos:** Amostras de sangue e urina de doze pacientes com MPS II no diagnóstico e sob tratamento com TRE, além de controles saudáveis foram utilizados para avaliar: índice de lipoperoxidação e oxidação de proteínas (medida a partir do conteúdo de grupamentos carbonila e SH) em plasma, GAGs urinários, níveis de IL1- $\beta$  plasmáticos, bem como índice de dano ao DNA em leucócitos através do ensaio cometa, também utilizada para avaliar o dano ao DNA em leucócitos de pacientes com MPS IVA, previamente incubados em diferentes concentrações de genisteína ou em tampão fosfato salino e dimetilsulfóxido. **Resultados e Discussão:** Foi observada a presença de dano oxidativo a biomoléculas em sangue de pacientes com MPS II, com altos níveis de lipoperoxidação, conteúdo de grupamentos carbonila, dano ao DNA e redução de grupos sulfidril. Houve redução no dano ao DNA e na lipoperoxidação após TRE, além de aumento de grupamentos sulfidril, embora a terapia não tenha sido capaz de reverter o dano a carbonila. Nossos resultados sugerem que o aumento dos GAGs induz o dano aos lipídios e ao DNA. A adição *in vitro* de genisteína (10, 30 e 50  $\mu$ M) em amostras de sangue de pacientes MPS IVA acarretou em um aumento estatisticamente significativo no índice de dano ao DNA. **Conclusões:** Estresse oxidativo e inflamação estão envolvidos na fisiopatologia da MPS II. Além disso, a TRE mostrou ter papel protetor contra o dano ao DNA e a lipídios. A genisteína nas doses 10, 30 e 50  $\mu$ M aumentou *in vitro* o índice de dano ao DNA em leucócitos de pacientes MPS IVA, demonstrando citotoxicidade.

**Palavras-Chave:** Estresse Oxidativo, Mucopolissacaridoses, Inflamação, Terapia de Reposição Enzimática, Genisteína e Glicosaminoglicanos.



## ABSTRACT

**Objectives:** Investigate lipid, protein and DNA damage, glycosaminoglycans (GAGs) levels and the inflammatory marker interleukin 1- $\beta$  (IL1- $\beta$ ) concentration of mucopolysaccharidosis (MPS) II patients at the moment of diagnosis and during enzyme replacement therapy (ERT), correlate these findings with oxidative stress parameters, as well as investigate the *in vitro* effect of genistein on DNA injury in leukocytes from MPS IVA patients. **Material and Methods:** Blood and urine samples from twelve MPS II patients at diagnosis and under ERT and healthy controls were evaluated regarding the parameters: lipid peroxidation index and protein oxidation (carbonyl and SH group contents) in plasma, urinary GAGs, as well as IL-1 $\beta$  in plasma and DNA damage index in leukocytes. Besides, blood samples from MPS IVA patients were incubated with different concentrations of genistein or phosphate buffered saline (PBS) and dimethylsulfoxide (DMSO), and the DNA damage index in leukocytes was evaluated by the comet assay. **Results and Discussion:** MPS II patients presented oxidative damage to biomolecules with high levels of lipid peroxidation, carbonyl content and DNA damage, as well as a reduction on SH groups. There was a decrease in DNA damage and lipid oxidative injury after ERT, and an increase in SH levels, although this therapy was not able to reverse carbonyl content. The high levels of urinary GAGs in MPS II patients were reduced after ERT and positively correlated with DNA and lipid oxidative injury, suggesting that GAGs accumulation induce lipid peroxidation and DNA damage. MPS IVA patients blood treated *in vitro* with genistein (10, 30 e 50  $\mu$ M) had higher DNA damage index when compared to samples treated with PBS buffer and DMSO. **Conclusions:** Oxidative stress and inflammation process are involved in MPS II pathophysiology, and ERT protects against DNA and lipid injury, probably by reducing GAGs accumulation. Genistein increased *in vitro* DNA damage in leukocytes from MPS IVA patients, demonstrating cytotoxicity.

**Keywords:** Oxidative Stress, Mucopolysacchadosis, Inflammation, Enzyme Replacement Therapy, Genistein and Glycosaminoglycans.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1. Rota de Degradação dos Glicosaminoglicanos .....</b>	<b>4</b>
<b>Figura 2. Estruturas Químicas dos Glicosaminoglicanos .....</b>	<b>5</b>
<b>Figura 3. Estrutura Química da Genistéína.....</b>	<b>10</b>
<b>Figura 4. Estresse Oxidativo.....</b>	<b>15</b>
<b>Figura 5. Ensaio Cometa Alcalino em Leucócitos .....</b>	<b>19</b>





## LISTA DE ABREVIATURAS

- DLDs – Doenças Lisossômicas de Depósito
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- ERN – Espécies Reativas de Nitrogênio
- ERO – Espécies Reativas de Oxigênio
- GAGs – Glicosaminoglicanos
- GLB1 – Galactosidase- $\beta$ 1
- GSH – Glutathiona Reduzida
- GSH-Px – Glutathiona Peroxidase
- IDS – Iduronato-2-sulfatase
- IL1- $\beta$  – Interleucina 1- $\beta$
- MDA - Malondialdeído
- MPS – Mucopolissacaridose
- MPS II – Mucopolissacaridose tipo II
- MPS III – Mucopolissacaridose tipo III
- MPS IV – Mucopolissacaridose tipo IV
- MPS IVA – Mucopolissacaridose tipo IVA
- NAGLS - N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatase
- NAGLU -  $\alpha$ -N-acetilglicosaminidase
- NPC – Niemann-Pick tipo C
- PBS – Tampão Fosfato Salino
- RL – Radical Livre
- SOD – Superóxido Dismutase
- SH – Grupamento Sulfidríla
- TAR – Reatividade Antioxidante Total
- TAS – Status Antioxidante Total
- TBA-RS – Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
- TRE – Terapia de Reposição Enzimática



## SUMÁRIO

RESUMO .....	X
ABSTRACT.....	XII
LISTA DE FIGURAS.....	XIV
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XVI
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 MUCOPOLISSACARIDOSES.....</b>	<b>3</b>
<i>1.1.1 Mucopolissacaridose tipo II.....</i>	<i>6</i>
<i>1.1.2 Mucopolissacaridose tipo IVA.....</i>	<i>7</i>
<i>1.1.3 Terapia de Reposição Enzimática.....</i>	<i>8</i>
<i>1.1.4 Tratamento com Genisteína.....</i>	<i>9</i>
<i>1.1.5 Outros Tratamentos.....</i>	<i>11</i>
<b>1.2 RADICAIS LIVRES E ESTRESSE OXIDATIVO.....</b>	<b>12</b>
<i>1.2.1 Estresse Oxidativo e Doenças Lisossômicas de Depósito.....</i>	<i>15</i>
<b>1.3 MEDIADORES INFLAMATÓRIOS EM DOENÇAS LISOSSÔMICAS DE DEPÓSITO.....</b>	<b>17</b>
<b>1.4 DANO AO DNA.....</b>	<b>18</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
<b>2.1 OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>23</b>
<b>2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>23</b>
<b>3 RESULTADOS.....</b>	<b>25</b>
<i>3.1 Capítulo 1.....</i>	<i>27</i>
<i>3.2 Capítulo 2.....</i>	<i>55</i>
<b>4 DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>69</b>
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>81</b>
<b>6 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>85</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>89</b>
<b>8 ANEXOS.....</b>	<b>109</b>
<b>8.1 Anexo 1.....</b>	<b>111</b>
<b>8.2 Anexo 2.....</b>	<b>113</b>



## **1. INTRODUÇÃO**

---



## **1.1. MUCOPOLISSACARIDOSES**

As mucopolissacaridoses (MPS) são um grupo heterogêneo de doenças de lisossômicas de depósito (DLDs) causadas pela deficiência das enzimas envolvidas na degradação de glicosaminoglicanos (GAGs) ou mucopolissacarídeos (figura 1). Como consequência ocorre o acúmulo de GAGs nos lisossomos, levando à disfunção celular, tecidual e orgânica. Em todas as MPS o curso é crônico e progressivo, com envolvimento multissistêmico, sendo acometidos principalmente os sistemas esquelético e cardiopulmonar, bem como pele, córnea, fígado, baço e cérebro. Baixa estatura, perímetro cefálico aumentado, face sugestiva de doença de depósito, envolvimento ocular, cardiopatia, organomegalia, infecções respiratórias, alterações cutâneas, comprometimento auditivo e neurológico são algumas das manifestações clínicas apresentadas por esses pacientes (NEUFELD e MUENZER, 2001).

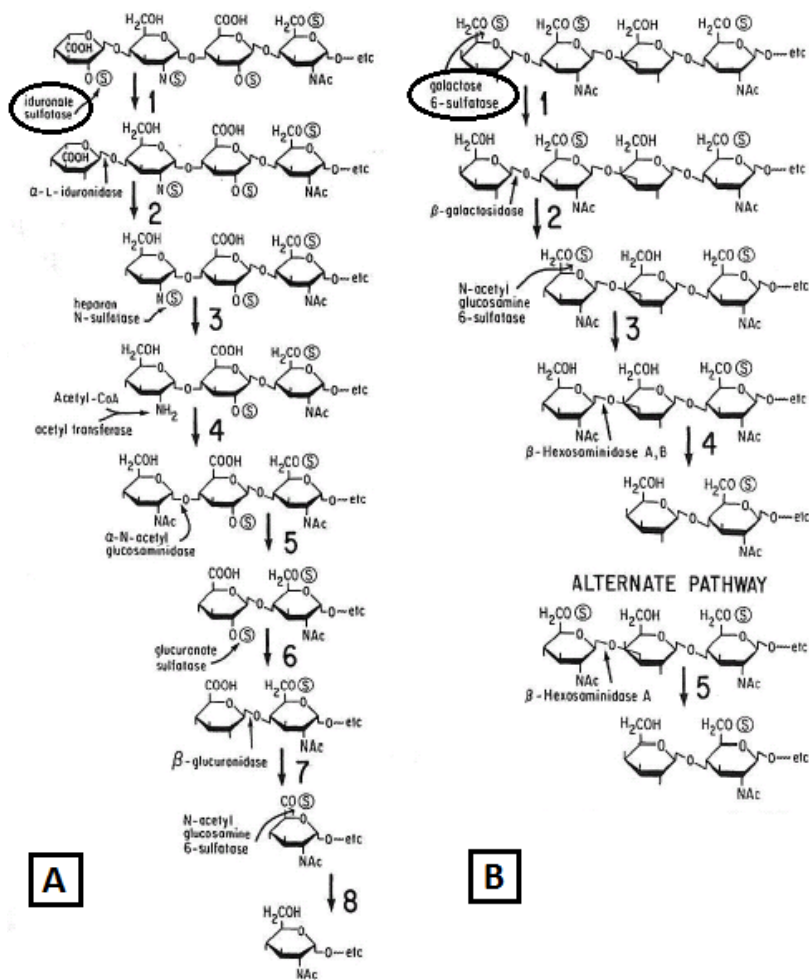


Figura 1. Rota de degradação dos glicosaminoglicanos. [A] degradação do heparan sulfato; [B] degradação do queratano sulfato (adaptado de NEUFELD e MUENZER, 2001).

A grande maioria das MPS possui padrão de herança autossômico recessivo, com exceção da MPS II, que apresenta um padrão recessivo ligado ao cromossomo X. As MPS são classificadas em 11 fenótipos clínicos, de acordo com o tipo de enzima deficiente: tipo I ( $\alpha$ -L-iduronidase), tipo II (iduronato-2-sulfatase ou IDS), tipo IIIA (heparan-N-sulfatase), tipo IIIB ( $\alpha$ -N-acetilglicosaminidase), tipo IIIC ( $\alpha$ -glicosamida acetiltransferase), tipo IIID (N-acetilglicosamina 6-sulfatase), tipo IVA (N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatase), tipo IVB ( $\beta$ -galactosidase), tipo VI (N-acetilgalactosamina 4-sulfatase), tipo VII ( $\beta$ -glicuronidase) e tipo IX (hialuronidase). A estrutura dos GAGs e os sítios de ação das enzimas responsáveis pela sua degradação estão esquematizados na figura 2. Cabe ressaltar que, além dos fenótipos supracitados,



uma mesma deficiência enzimática pode ocasionar diferentes graus de comprometimento clínico que variam desde quadros mais leves a moderados e graves (NEUFELD e MUENZER, 2001).

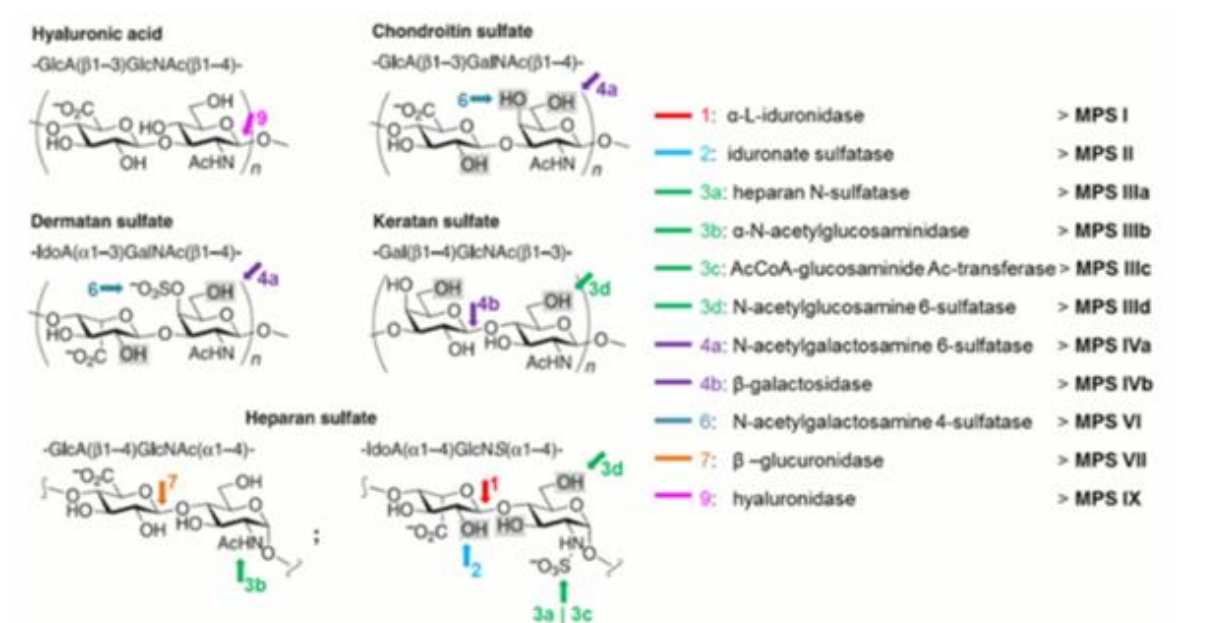


Figura 2. Estruturas químicas dos glicosaminoglicanos (GAGs). Os números de 1 a 9 correspondem às enzimas responsáveis pela degradação dos GAGs e seus respectivos sítios de ação (INSTITUT FÜR ANGEWANDTE SYNTHESCHEMIE, 2013).

Os testes de triagem permitem identificar e quantificar o aumento dos GAGs urinários, característico das MPS. As técnicas mais empregadas para este fim são o uso do azul de toluidina, em que há a formação de manchas metacromáticas resultantes da reação do corante com os GAGs, a cromatografia em camada delgada e a eletroforese de GAGs, bem como a quantificação de GAGs urinários a partir do método do azul de dimetilmetileno, seguido de análise espectrofotométrica. Os testes de triagem, juntamente com os dados clínicos dos pacientes, auxiliam no diagnóstico das MPS, porém o padrão-ouro no diagnóstico é a medida da atividade da enzima deficiente. Testes moleculares são também utilizados na confirmação do diagnóstico das MPS, além de serem

ferramentas importantes no estudo das alterações genéticas mais frequentes (NEUFELD e MUENZER, 2001; VOZNYI et al., 2001; BERRY, 1987; MABE et al., 2004; DE JONG et al., 1989).

### **1.1.1. Mucopolissacaridose tipo II**

Dentre os diversos tipos de MPS ocorre a MPS tipo II, também conhecida como Síndrome de Hunter, em que a enzima IDS encontra-se deficiente, acarretando em um déficit no catabolismo dos GAGs dermatan sulfato e heparan sulfato (NEUFELD e MUENZER, 2001). Este tipo de MPS é o único caracterizado por um padrão de herança recessivo ligado ao cromossomo X e, portanto, ocorre mais frequentemente em homens e as mães dos indivíduos acometidos por esta doença são portadoras (NEUFELD e MUENZER, 2001; BECK, 2011). A alteração genética que acarreta a MPS II localiza-se no cromossomo X (Xq28) (BERG et al., 1968). A MPS II pode ser dividida em dois subtipos, de acordo com a clínica do paciente, em Hunter A, que consiste em um fenótipo mais grave representado por atraso no desenvolvimento e sintomas neurológicos iniciado na infância, e Hunter B, caracterizado por um fenótipo mais brando, cujo início e progressão da doença ocorrem de forma mais tardia (HAMANO et al., 2008). Embora exista a subdivisão da MPS II em A e B, os fenótipos clínicos apresentados pelos pacientes são variados e essa heterogeneidade de fenótipos pode ser explicada pelo grande número de alterações genéticas no gene da IDS, com mais de 330 alterações que compreendem mutações grandes e pequenas (FROISSART et al., 2007).

Pacientes com MPS II comumente apresentam problemas cardíacos e pulmonares, bem como outras manifestações encontradas em outros tipos de MPS, tais como baixa estatura, perda auditiva e face grosseira, podendo apresentar dano neurológico (NEUFELD e MUENZER, 2001; YOUNG, et al., 1982; VIEIRA, et al., 2008.; MARTIN et al., 2008; BECK, 2011; PINTO et al., 2010).

São raros os casos de MPS II acometendo indivíduos do sexo feminino, sendo a maioria destes casos fenótipos mais graves. Infelizmente, a dosagem da atividade enzimática da IDS não permite identificar mulheres heterozigotas para MPS II de forma fidedigna, bem como a quantificação de GAGs urinários não é capaz de auxiliar nesta identificação, sendo de extrema importância, portanto, a análise molecular. O aconselhamento genético de uma família que apresenta um indivíduo com MPS II é essencial para auxiliar e educar a família sobre a chance de possíveis novos casos (PINTO et al., 2010). A incidência mundial estimada desta MPS está entre 1:92.000 e 1:320.000 nascidos vivos (MEIKLE et al., 1999; NELSON et al., 2003; BAEHNER et al., 2005; POUPĚTOVÁ et al., 2010; PINTO et al., 2004). Em nosso país não há informações oficiais acerca da incidência, porém é sabido que a MPS tipo II encontra-se entre os tipos mais frequentes de MPS em brasileiros (MEIKLE et al., 1999; VIEIRA, et al., 2008).

### **1.1.2. Mucopolissacaridose tipo IVA**

A MPS tipo IV é causada pela mutação dos genes da N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatase (NAGLS) ou Galactosidase- $\beta$ 1 (GL $\beta$ 1), responsáveis pela produção de enzimas envolvidas na degradação dos GAGs, sendo dividida em MPS IVA quando a mutação ocorre no gene da NAGLS e MPS IVB quando a mutação encontra-se no gene da GL $\beta$ 1. A análise molecular é recomendada e auxilia no diagnóstico destas MPS, porém cabe ressaltar que o fenótipo destes dois subtipos de MPS IV não é diferenciável. Tais mutações podem acarretar a redução total ou parcial da atividade enzimática de degradação de GAGs, levando ao acúmulo intralisossomal dos mucopolissacarídeos (SANTAMARIA et al., 2006; MONTAÑO et al., 2007).

A alteração genética que acarreta a MPS tipo IVA localiza-se em 16q24 (TOMATSU et al., 1992). Neste subtipo de MPS IV, a dificuldade está na degradação de condroitina-6-sulfato e queratan sulfato (MONTAÑO et al., 2007; DVORAK-EWELL et al., 2010; MARTELL et al., 2011). A primeira descrição da MPS IVA ocorreu no final da década de 20, pelo pediatra Luis Morquio. Este

subtipo de MPS IV também é conhecido como Síndrome Morquio A (MONTAÑO et al., 2007)]. A deficiência de NAGLS gera uma quantidade exacerbada de GAGs que por sua vez acarreta patologias em tecidos conjuntivos onde há muito queratan sulfato, tais como: cartilagem, córnea e válvulas cardíacas (DVORAK-EWELL et al., 2010). Relatos na literatura citam mais de 150 mutações no gene responsável por codificar esta enzima, explicando a heterogeneidade clínica significativa encontrada em diferentes pacientes com MPS IVA, que varia de casos mais brandos até outros mais severos, de acordo com a atividade enzimática residual [21,24]. (MONTAÑO et al., 2007; LANKESTER et al., 2006). O fenótipo considerado mais ameno pode atingir os 70 anos, porém o mais severo sobrevive até 30 anos, muitas vezes devido ao comprometimento pulmonar e a instabilidade cervical que acomete estes pacientes (MONTAÑO et al., 2007; TOMATSU et al., 2011). Este último, infelizmente, representa aproximadamente 70% do total de pacientes com MPS IVA (MARTELL et al., 2011; TOMATSU et al., 2011). Geralmente os pacientes com esta MPS iniciam com sinais e sintomas da doença por volta dos três anos de idade, sendo alguns deles: *pectus carinatum*, hipermobilidade das articulações e hipoplasia odontóide (MONTAÑO et al., 2007; MARTELL et al., 2011; TOMATSU et al., 2011). Outros comprometimentos frequentes na MPS IVA são *genu valgum* e compressão da medula espinhal. Por outro lado, a manutenção da inteligência é uma particularidade deste tipo de MPS que a difere de outras (MONTAÑO et al., 2007).

### **1.1.3. Terapia de Reposição Enzimática**

A terapia de reposição enzimática (TRE), realizada por infusão intravenosa de uma forma ativa e recombinante da enzima deficiente, está licenciada como tratamento para alguns tipos de MPS, tais como MPS I, MPS II e MPS VI. Esta terapia é efetiva no tratamento de sintomas somáticos, porém não é capaz de tratar o envolvimento neurológico, devido a uma distribuição ineficiente de proteínas através da barreira hematoencefálica (NEUFELD e

MUENZER, 2001; KAKKIS et al., 2001; WRAITH et al., 2004). Ainda assim, a TRE tem sido o tratamento mais bem sucedido para as desordens de depósito lisossômico, sendo utilizada não somente nas MPS como também no tratamento de outros erros inatos do metabolismo, como a Doença de Fabry e Doença de Gaucher (DESNICK, 2004; SCHIFFMANN e BRADY, 2002). A TRE (idursulfase), quando utilizada em pacientes MPS II, resultou em aumento da mobilidade, melhora no teste de caminhada de 6 minutos, bem como apresentou melhores medidas de função pulmonar e redução da hepatoesplenomegalia (GERMAIN, 2005; MUENZER et al., 2007). A TRE para MPS tipo IVA encontra-se na fase de ensaio clínico (TOMATSU et al., 2011). Vale ressaltar que a resposta à terapia é influenciada pelo grau de severidade da doença, bem como pela idade do paciente e grau de progressão da doença no início da TRE (TOMATSU et al., 2011; VALAYANNOPOULOS et al., 2011).

Em um estudo realizado em condrócitos de pacientes MPS IVA foi observado que o uso da enzima recombinante acarretou em normalização da atividade enzimática e diminuição de queratan sulfato, bem como alterações no padrão da expressão de genes de modulação (DVORAK-EWELL et al., 2010). A literatura mostra que a administração de laronidase ( $\alpha$ -L-iduronidase) em pacientes com MPS I aumentou de forma significativa a função respiratória e a capacidade física desses pacientes (KAKKIS et al., 2001; GERMAIN, 2005; GIUGLIANI et al., 2009). Além disso, foram verificadas uma redução de 25% na hepatoesplenomegalia e uma redução de 80% nos níveis de GAGs urinários (KAKKIS et al., 2001). Em pacientes com MPS VI, a administração de galsulfase (arilsulfatase B) reduziu significativamente os níveis de GAGs urinários e acarretou em melhoria dos resultados do teste de caminhada realizados por estes pacientes (HARMATZ et al., 2008).

#### **1.1.4. Tratamento com Genisteína**

A terapia de redução do substrato foi outra proposta de tratamento apontada para pacientes com MPS, uma vez que a mesma possivelmente poderia

ser efetiva no manejo dos sintomas neurológicos apresentados por esses pacientes (PIOTROWSKA, 2008). Há evidências na literatura que mostram que a genisteína (4,5,7-tri-hidroxi-isoflavona), representada na figura 3, é capaz de inibir a atividade de uma proteína quinase tirosina-específica do receptor do fator de crescimento da epiderme, o qual é requerido para a expressão de genes que codificam enzimas envolvidas na produção de GAGs (TIRONE et al., 1997; AKIYAMA et al., 1987; KIM et al., 1998; JAKÓBKIEWICZ-BANECKA et al., 2009). Foi demonstrada que essa isoflavona é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, uma habilidade que possivelmente explica os seus efeitos benéficos em relação aos parâmetros neurológicos em animais e seres humanos (TSAI, 2005).

Friso et al. (2010) realizaram um estudo em modelo animal de MPS II para avaliar o tratamento com genisteína nas doses de 5 ou 25 mg/Kg/dia por 10 ou 20 semanas. O resultado encontrado foi a redução do nível de GAGs urinários após tratamento com genisteína em ambas as concentrações por 10 semanas. Além disso, em amostras de tecidos hepático, renal e esplênico também foi verificada a diminuição do depósito de GAGs após 10 semanas de tratamento em ambas as doses de genisteína (FRISO et al., 2010).

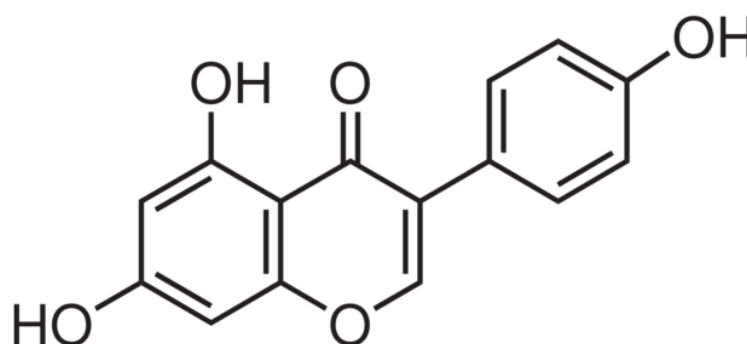


Figura 3. Estrutura química da genisteína (4',5,7-Trihidroxisoflavona) (SIGMA-ALDRICH, 2013).

Um estudo mostrou a inibição da síntese de GAGs induzida pela genisteína (10 a 30 $\mu$ M) em fibroblastos de pacientes com MPS tipos I, II, IIIA e IIIB, uma vez que ocorreu uma importante diminuição no armazenamento de GAGs lisossomais após a incubação dessas células com genisteína (PIOTROWSKA et al., 2006). Outro estudo, realizado em pacientes com MPS tipo III que utilizaram extrato contendo genisteína (5mg/kg/dia), mostrou que a dose escolhida dessa isoflavona não foi suficiente para melhorar a incapacidade dos pacientes, medida através do uso de uma escala que avalia parâmetros tais como a deambulação, comportamento, linguagem, deglutição e epilepsia. Por outro lado, foi verificada uma melhoria na textura da pele e do cabelo e, ainda, que possivelmente doses mais elevadas de genisteína poderiam acarretar em resultados satisfatórios no que diz respeito aos sintomas neurológicos apresentados por esses pacientes. O extrato de isoflavonas rico em genisteína, na dose estudada, não acarretou em efeitos adversos nos pacientes com MPS III e não resultou em alterações significativas nos níveis de GAGs urinários (DELGADILLO et al., 2011).

O papel da genisteína na prevenção ou indução do dano ao DNA permanece duvidoso. A literatura apresenta diversos estudos diferentes entre si no que diz respeito ao tempo de incubação empregado, linhagens celulares e concentrações de genisteína, dificultando a interpretação correta do papel desta isoflavona. Em 2007, Wu e Chan verificaram um efeito protetor da genisteína na prevenção da formação de dano oxidativo (WU e CHAN, 2007). Outros estudos demonstraram um efeito indutor de dano ao DNA *in vitro* quando da adição de genisteína (KULLING e METZLER, 1997; DI VIRGILIO et al., 2004; KULLING et al., 1999; BIANCO ET AL, 2005).

### **1.1.5. Outros Tratamentos**

Os tratamentos empregados previamente ao advento da TRE são ainda atualmente utilizados, porém concomitante ao uso de TRE nos casos em que a mesma está aprovada para uso. Tais tratamentos são focados no manejo dos

sintomas clínicos do paciente, como é o caso do tratamento de infecções pulmonares, dores nas articulações, através do emprego da farmacoterapia, fisioterapia e, muitas vezes, intervenções cirúrgicas, de acordo com o grau de severidade da doença (MONTAÑO et al., 2007; TOMATSU et al., 2011). O diagnóstico precoce é essencial, pois permite o tratamento de complicações e melhoria da qualidade de vida. Além disso, estes pacientes necessitam de um seguimento regular para monitoramento da progressão da doença e da resposta ao tratamento (TOMATSU et al., 2011; VALAYANNOPOULOS et al., 2011).

## 1.2. RADICAIS LIVRES E ESTRESSE OXIDATIVO

Radical livre (RL) é uma estrutura química que possui um ou mais elétrons desemparelhados, característica que o torna muito instável, extremamente reativo e com uma enorme capacidade para combinar-se de forma rápida e inespecífica com as diversas moléculas integrantes da estrutura celular, tais como proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos. Os RL em geral são formados por absorção de radiação (ultravioleta ou visível), por reações redox ou por processos de catálise enzimática (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; RAMOS-VASCONCELOS et al., 2000).

Em nosso organismo são produzidos RL de carbono, enxofre, nitrogênio (espécies reativas de nitrogênio ou ERN) e oxigênio (espécies reativas de oxigênio ou ERO), sendo esses últimos os que ganham mais destaque devido à reatividade e aos danos que podem causar. As ERO e outros RL podem ser produzidos por fontes exógenas, tais como a radiação, cigarro, solventes orgânicos, paraquat e paracetamol. Além de fontes externas, o organismo encontra-se continuamente exposto de forma endógena a estas moléculas, uma vez que processos como a degradação de ácidos graxos, a fagocitose, o citocromo P-450 e a cadeia de transporte de elétrons são capazes de gerar RL e espécies reativas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). As ERO mais conhecidas são o radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e o oxigênio *singlet* ( $O'_2$ ). O termo ERO é utilizado tanto para RL de oxigênio, como para alguns não radicais



derivados do  $O_2$  capazes de gerar RL, tais como o ácido hipocloroso (HClO) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), sendo este último um não radical capaz formar o radical hidroxila ( $HO^\bullet$ ) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

A ação dos radicais livres tem seus danos minimizados pelo sistema de defesa antioxidante, cuja função é a conversão das espécies reativas em compostos inativos. Um antioxidante é definido como uma substância capaz de retardar ou inibir a oxidação de um substrato (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Os sistemas de defesa antioxidantes podem ser divididos em sistema não enzimático e enzimático. O primeiro age reparando a lesão ocorrida, sendo constituído por vitaminas (ácido ascórbico, por exemplo), glutathiona, carotenóides, dentre outros. O segundo atua como detoxificador do agente, antes que ele promova uma lesão, sendo constituído pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathiona-peroxidase (GSH-Px) dentre outras (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Antioxidantes não-enzimáticos como as vitaminas possuem diversos mecanismos de ação, tais como a capacidade de sequestrar ou inibir a formação de ERO, bem como a remoção do oxigênio presente no meio (HALLIWELL, 1994). Antioxidantes enzimáticos são capazes de impedir a geração e remover espécies reativas. A enzima GSH-Px é responsável por catalisar a decomposição de hidroperóxidos, enquanto a enzima SOD é capaz de catalisar a dismutação de radicais superóxidos e formar  $H_2O_2$  e  $O_2$ . Já a catalase é a enzima responsável por formar água e  $O_2$  a partir da degradação de  $H_2O_2$  (BONNEFOY et al., 2002; HALLIWELL, 2001).

A reação do organismo frente ao estresse oxidativo pode ser de adaptação ou de dano celular, onde o nível de estresse oxidativo é o responsável por essa variação de resposta. Em casos mais amenos, as células são capazes de se adaptar e responder ao estresse oxidativo através do aumento da produção de defesas antioxidantes. Quando o estresse oxidativo é muito acentuado, as células não conseguem suportar e os danos podem ser irreversíveis e acarretar morte celular (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Os RL e ERO são normalmente encontrados nos organismos vivos em baixas concentrações, de forma equilibrada (DRÖGE, 2002). Quando há uma diminuição nas defesas antioxidantes e/ou um aumento na concentração intracelular de espécies reativas, ocorre o estado denominado de estresse oxidativo (figura 4), onde os RL em excesso começam a produzir danos às macromoléculas biológicas como lipídios, acarretando na alteração da permeabilidade de membranas celulares, proteínas, desencadeando a oxidação destas, e lesões no DNA, promovendo, dessa forma, dano tecidual e até mesmo morte celular (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; RAMOS-VASCONCELOS et al., 2000; BECKMAN e AMES, 1998). Distúrbios do equilíbrio entre a formação e a remoção de ERO são importantes na patogênese de muitas doenças, tais como a aterosclerose, diabetes, desordens neurológicas e envelhecimento, doenças de Parkinson e de Alzheimer, esclerose múltipla, enfisema pulmonar, cirrose hepática e vários tipos de câncer, bem como em alguns erros inatos do metabolismo (BECKMAN e AMES, 1998; LATINI et al., 2002; SITTA et al., 2006; DEON et al., 2006; VARGAS et al., 2004; SIRTORI et al., 2005; BARSCHAK et al., 2006).

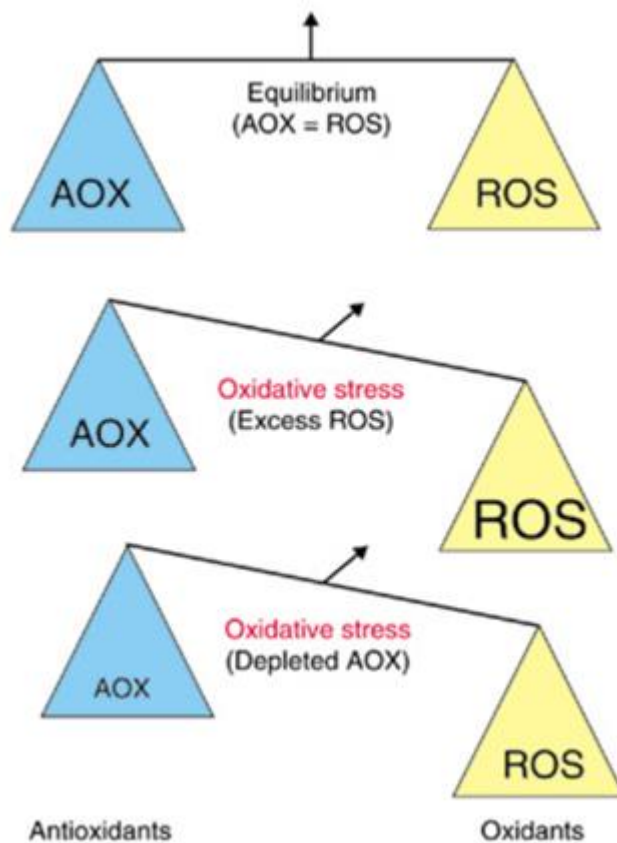


Figura 4. Estresse Oxidativo. O desequilíbrio que acarreta o estado de estresse oxidativo está representado pelos antioxidantes (AOX) e espécies reativas do oxigênio (ERO – Reactive Oxygen Species – “ROS”) (SCANDALIOS, 2002).

### 1.2.1. Estresse Oxidativo e Doenças Lisossômicas de Depósito (DLDs)

Estudos em humanos mostraram que o estresse oxidativo ocorre em erros inatos do metabolismo, tais como fenilcetonúria, adrenoleucodistrofia ligada ao X, na doença do xarope do bordo e em algumas DLDs. Nessas três primeiras doenças foi verificado um aumento das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), bem como uma diminuição da reatividade antioxidante total no plasma (TAR) (SITTA et al., 2006; DEON et al., 2006; BARSCHAK et al., 2006). Em pacientes portadores da doença de Gaucher, uma DLD, foi verificado aumento da atividade da catalase e diminuição da atividade da SOD quando comparado com o grupo controle, sugerindo que há um desequilíbrio nas defesas antioxidantes enzimáticas desses pacientes (ROVERSI et al., 2006).

A literatura relata trabalhos sobre estresse oxidativo em modelos animais de DLDs, como é o caso de um estudo cujos experimentos foram realizados em camundongos MPS IIIB com 1, 3 e 6 meses de idade, no qual foi demonstrada a ocorrência de peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e DNA no cerebelo desses animais, sugerindo que o estresse oxidativo já se encontra presente em um estágio inicial do curso da MPS IIIB (VILLANI et al., 2009). Este mesmo autor, em 2007, publicou um artigo em camundongos com MPS IIIB, onde foram analisados alguns componentes do complexo fagocítico enzimático denominado oxidase dependente de NADPH, sendo esta oxidase considerada a maior fonte de EROs durante a inflamação. A expressão da NADPH oxidase ocorre principalmente na micróglia, acarretando a produção de íon superóxido e, conseqüentemente, levando à neurodegeneração (VILLANI et al., 2007). Foi observado, em outro artigo científico, que em modelo animal de MPS tipo I (camundongos) existe um desequilíbrio oxidativo resultante de um aumento da atividade da SOD no pulmão, cerebelo, rins, fígado e baço destes animais, além do aumento de grupamentos carbonila no cerebelo, pulmão e baço (REOLON et al., 2009).

Um estudo realizado em cultura de fibroblastos de pacientes com doença de Gaucher demonstrou que os níveis de ERO e conteúdo de grupamentos carbonilas eram significativamente maiores nestes pacientes quando comparado com células de indivíduos saudáveis, sugerindo que as células com Gaucher desenvolveram uma resposta de adaptação à condição crônica de estresse oxidativo, visando à sobrevivência (DEGANUTO et al., 2007). Outro estudo em amostras biológicas de pacientes com doença de Fabry submetidos à TRE verificou que houve uma diminuição dos níveis de defesa antioxidante nos eritrócitos destes pacientes, avaliadas através da medida da glutathiona reduzida, bem como da atividade das enzimas glutathiona peroxidase, SOD e catalase. Além disso, foi observado um aumento dos níveis plasmáticos de malondialdeído (MDA) e de grupamentos carbonila em proteínas plasmáticas e aumento dos níveis de di-tirosina na urina destes pacientes. O MDA é o produto final da lipoperoxidação refletindo, portanto, dano a lipídios, enquanto o conteúdo de

grupamentos carbonilas plasmático e os níveis de di-tirosina urinários são utilizados como parâmetros de dano oxidativo a proteínas (BIANCINI et al., 2012).

Amostras biológicas (sangue e fibroblastos) de pacientes com Niemann-Pick tipo C (NPC-1) foram estudadas no diagnóstico e durante o tratamento com miglustate, tendo sido demonstrado que o estresse oxidativo encontra-se aumentado em pacientes com NPC-1. No momento do diagnóstico, estes pacientes apresentaram um aumento significativo de TBA-RS refletindo dano a lipídios, bem como um aumento no conteúdo de grupamentos carbonila e uma redução no status antioxidante total (TAS) plasmático, quando comparados com um grupo controle. Foi verificado que os níveis de TBA-RS e TAS foram normalizados após tratamento com miglustate, protegendo estes pacientes contra os danos advindos do estresse oxidativo resultante da própria doença (RIBAS et al., 2012).

A literatura também relata que pacientes com MPS I apresentaram altos níveis de peroxidação lipídica e a TRE induziu algumas alterações na atividade de enzimas antioxidantes (aumento da atividade da catalase e diminuição da SOD), o que sugere que o estresse oxidativo possa ter um importante papel na fisiopatologia desta doença (PEREIRA et al., 2008). Dois estudos recentes analisaram diferentes parâmetros de estresse oxidativo em plasma de pacientes com MPS II antes e durante 6 meses de TRE. Os resultados obtidos mostraram que esses pacientes estão sujeitos a dano oxidativo a proteínas, lipídios e ao DNA, bem como sugerem que a TRE parece protegê-los contra esses danos observados (FILIPPON et al., 2011a; FILIPPON et al., 2011b).

### **1.3. MEDIADORES INFLAMATÓRIOS EM DOENÇAS LISOSSÔMICAS DE DEPÓSITO**

Estudos mostraram envolvimento de mediadores inflamatórios na fisiopatologia de algumas DLDs, tais como Doença de Gaucher, Doença de Fabry e gangliosidoses (ALTARESCU et al., 2005; ALTARESCU et al., 2008;

JEYAKUMAR et al., 2003; OHMI et al., 2003). Além disso, no que diz respeito aos sintomas neurológicos de DLDs e outras doenças neurodegenerativas, evidências apontam para o envolvimento de uma resposta inflamatória que inclui a ativação da micróglia. A ativação patológica da micróglia pode desencadear a liberação de citocinas e quimiocinas e o desenvolvimento de um processo inflamatório, bem como a secreção de substâncias neurotóxicas, tais como as ERO e ERN (JEYAKUMAR et al., 2003; OHMI et al., 2003). Esta é uma das possíveis explicações para o envolvimento e ocorrência de processos inflamatórios juntamente com danos oxidativos em diversas doenças. A correlação entre inflamação e estresse oxidativo foi evidenciada em um estudo realizado em 14 pacientes com doença de Fabry em tratamento com TRE, onde foi verificado um aumento dos níveis de interleucina-6 e fator de necrose tumoral alfa nos pacientes tratados com TRE quando comparados com o grupo controle. Foi demonstrada correlação positiva significativa entre os níveis de interleucina-6 e níveis urinários de di-tirosina, um marcador utilizado para medir o dano oxidativo a proteínas (BIANCINI et al., 2012). Há poucos estudos sobre mediadores inflamatórios e MPS, dos quais todos foram realizados em modelos animais, apontando para uma elevada expressão de moléculas inflamatórias e citocinas, secundárias ao acúmulo de GAGs em MPS tipo IIIB, VI e VII, bem como evidenciando um envolvimento inflamatório e estresse oxidativo na neurodegeneração em MPS IIIB (VILLANI et al., 2009; VILLANI et al., 2007; SIMONARO et al., 2008).

#### **1.4. DANO AO DNA**

Singh et al (1988) descreveram uma técnica conhecida como ensaio cometa alcalino, cujo objetivo consiste em medir o dano ao DNA resultante da sua fragmentação. Ocorre, neste caso, a migração de fragmentos de DNA para fora do núcleo, formando uma espécie de cauda de cometa, sendo que o nome desta técnica faz alusão à cauda formada, a qual é proporcional ao dano ao DNA (figura 5). Células que não apresentam lesões detectáveis no DNA permanecem

com o núcleo redondo (SINGH et al., 1988). Apesar do dano resultante desta técnica não ser exclusivamente um dano oxidativo, a literatura relata a ocorrência de lesões no DNA em resposta a processos oxidativos. Artigos recentes apontam a presença de dano oxidativo em proteínas, lipídios e DNA em MPS IIIB (VILLANI et al., 2009). Ainda, por permitir a visualização do nível de fragmentação do DNA celular, este ensaio pode ser empregado na avaliação da toxicidade celular de compostos, tais como a genisteína e outras isoflavonas, auxiliando na escolha de um composto seguro com toxicidade baixa para uso como terapia medicamentosa.

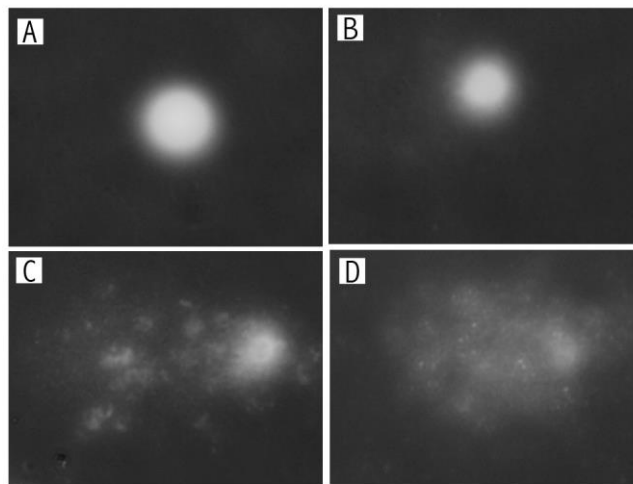


Figura 5. Ensaio cometa alcalino em leucócitos (quadros A, B, C e D representam índices de dano ao DNA de 0, 1, 2 e 3, respectivamente).





## **2. OBJETIVOS**

---



## **2.1 OBJETIVO GERAL**

Este estudo teve como objetivo avaliar os níveis de GAGs urinários e interleucina 1- $\beta$  (IL1- $\beta$ ) plasmáticos de pacientes com MPS tipo II no diagnóstico e durante o tratamento com TRE e correlacionar estes achados com parâmetros de estresse oxidativo em plasma, bem como investigar o efeito *in vitro* da genisteína sobre o dano ao DNA em leucócitos de pacientes com MPS tipo IVA.

## **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

**2.2.1** Medir os níveis de GAGs em amostras de urina de pacientes com MPS tipo II no diagnóstico e durante a TRE;

**2.2.2** Medir IL1- $\beta$  em plasma de pacientes com MPS tipo II no diagnóstico e durante a TRE;

**2.2.3** Avaliar o estresse oxidativo (dano a proteínas e lipídios) em amostras de sangue de pacientes com MPS tipo II, no diagnóstico e durante o tratamento com TRE, através dos seguintes parâmetros:

a) Determinação do conteúdo de grupamentos SH (tióis) e carbonilas em plasma, para avaliação do dano a proteínas;

b) Determinação dos níveis de MDA em plasma, para avaliação do dano a lipídios;

**2.2.4** Avaliar o dano ao DNA através do ensaio cometa em leucócitos de pacientes com MPS tipo II no diagnóstico e durante a TRE;

**2.2.5** Correlacionar os parâmetros de estresse oxidativo com níveis de GAGs urinários e IL1- $\beta$  plasmáticos no diagnóstico e durante o tratamento com TRE de pacientes com MPS tipo II;

**2.2.6** Avaliar o dano ao DNA em leucócitos de pacientes MPS IVA tratados *in vitro* com diferentes concentrações de genisteína, utilizando o ensaio cometa.

### **3. RESULTADOS**

---



### **3.1. CAPÍTULO 1**

“Glycosaminoglycans are correlated with Oxidative Damage in MPS II Patients submitted to Enzyme Replacement Therapy”

Este artigo foi submetido à revista Cell Biochemistry and Function e ainda encontra-se em processo de avaliação pela revista. O intervalo de páginas referente a este artigo é p. 28 até p. 54.































































## **3.2. CAPÍTULO 2**

“*In vitro* effect of genistein on DNA damage in leukocytes from Mucopolysaccharidosis IVA patients”

Artigo aceito para publicação na revista *Molecular Genetics and Metabolism* em 24 de novembro de 2013.



In vitro effect of genistein on DNA damage in leukocytes from  
Mucopolysaccharidosis IVA patients

**Authors:**

Negretto, G. W. <sup>a,b\*</sup>, Deon M. <sup>b</sup>, Burin M. <sup>b</sup>, Biancini G. B. <sup>b</sup>, Ribas G. <sup>b</sup>,  
Garcia S.C. <sup>c</sup>, Goethel G. <sup>c</sup>, Fracasso R. <sup>c</sup>, Giugliani L. <sup>b</sup>, , Giugliani R. <sup>b</sup>,  
Vargas C.R. <sup>a,b\*</sup>.

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia- Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Ipiranga, 2752, 1º andar, CEP: 90610-000, Porto Alegre/RS, Brasil

<sup>b</sup> Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, RS, 90035-903, Brazil

<sup>c</sup> Faculdade de Farmácia – UFRGS; Laboratório de Toxicologia, Endereço: Avenida Ipiranga, 2752, sala 605, CEP: 90610-000

\* Corresponding authors:

- Adress: Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, RS, 90035-903, Brazil

- E-mails: [gnegretto@gmail.com](mailto:gnegretto@gmail.com), [crvargas@hcpa.ufrgs.br](mailto:crvargas@hcpa.ufrgs.br).

## **Abstract**

Mucopolysaccharidosis IVA is a lysosomal storage disorder leading to an increase in glycosaminoglycans storage. Genistein is an isoflavone capable to inhibit glycosaminoglycans production. The objective of this study was to analyze the in vitro effect of different concentrations of genistein on DNA injury in mucopolysaccharidosis IVA patients. The lower concentration tested (10  $\mu\text{M}$ ) showed a significant increase on DNA injury in vitro, although higher concentrations (30  $\mu\text{M}$  and 50  $\mu\text{M}$ ) showed higher DNA damage.

**Keywords:** Genistein; Mucopolysaccharidosis IVA; Genotoxicity; DNA damage; Comet Assay.

## 1. Introduction

Mucopolysaccharidoses (MPS) are a group of lysosomal storage disorders classified in different types, according to the deficient enzyme. MPS IVA is caused by deficiency of N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase (GALNS; E.C.3.1.6.4) enzyme, responsible for chondroitin 6-sulfate (C6S) and keratan sulfate (KS) degradation, resulting in accumulation of glycosaminoglycans (GAGs) as well as cellular pathology, mainly in connective tissues where KS is plenty, including cartilage, cornea and heart valve [1-3]. The main signs and symptoms include abnormal gait with a tendency to fall, as well as short stature and odontoid hypoplasia, coarse facial features, restricted growth, hepatomegaly, corneal clouding, hearing loss, cardiac and pulmonary compromise [1,3,4]. The treatment of MPS IVA is basically supportive, in order to diminish some manifestations [1,4]. Enzyme replacement therapy (ERT) is already established for some disorders, such as MPS I, II and MPS VI, resulting in improvements in visceral organs, although the enzymes are not yet able to reach effectively the brain or bone structures [4]. ERT in MPS IVA using recombinant human native GALNS is under clinical trials [4].

Substrate reduction therapy was also proposed as a treatment for MPS, once it could be effective for managing neurological symptoms [5]. There is evidence showing that genistein (4,5,7-tri-hydroxi-isoflavone) is capable to inhibit a tyrosine-specific protein kinase of the epidermal growth factor receptor, which is necessary to express genes that encode enzymes involved in GAGs production [6-9]. Studies performed in MPS II and IIIB mice models verified that genistein treatment can reduce GAGs storage, as well as heparan sulfate substrate [10-12]. The few reports found in literature about the use of genistein in MPS patients included only MPS types II and III, demonstrating improvement in some clinical features that are common in MPS patients, and some of them showed a reduction in urinary GAGs levels [13-18]. Beyond the effectiveness of genistein treatment, it is necessary to certify its safety. The role of genistein in preventing or inducing DNA damage is still uncertain. Literature shows studies with different concentrations of genistein, cells lineage, as well as different times of incubation, making hard to understand whether this isoflavone is good or villain in what concerns DNA damage [19-23]. Based on this scenario, the aim of this study was to investigate the in vitro effect of different concentrations of genistein on DNA injury in MPS IVA patients.

## **2. Material and Methods**

### **2.1. Patients and Blood Samples**

This research was approved by the Ethics Committee of the Clinical Hospital of Porto Alegre, RS, Brazil, and the subjects gave informed consent. MPS IVA patients had their diagnosis confirmed by measurement of leukocytes galactose 6-sulphatase activity and by urinary GAGs quantification [4, 24]. A total of five MPS IVA patients with a mean age of 20.2 years (standard deviation of 11.61) were included in this study. The major clinical manifestations were hearing and visual problems, short stature, skeletal deformities, thick hair, macrocephaly, coarse facial features and pectus carinatum. Blood was collected from the participants under sterile conditions in heparinized tubes and stored in refrigerator (4-8 °C) for 1 hour, until incubation with phosphate buffered saline (PBS buffer) + dimethylsulfoxide (DMSO) and/or genistein.

### **2.2. In vitro effect of genistein on DNA damage**

Recent literature showed that genistein concentrations from 10 to 50  $\mu\text{M}$  had the most effective inhibition of GAGs synthesis [25, 26]. Therefore, in this study it was analysed genistein effect at the following concentrations: 10, 30 and 50  $\mu\text{M}$ . For that, the isoflavone (Sigma Aldrich®; batch 071M1606V) was dissolved in DMSO (Sigma Aldrich®) and a stock solution (280  $\mu\text{M}$  of genistein and 0.05% of DMSO) was frozen (-20 °C) until blood samples incubation [27]. Genistein stock solution was diluted to different concentrations (10, 30 and 50  $\mu\text{M}$ ) using PBS buffer and DMSO. The proportion of blood and buffer+DMSO/genistein solution used was 3:1. Leukocytes isolated from whole blood of MPS IVA patients were co-incubated with genistein solution (10, 30 and 50  $\mu\text{M}$ ) or phosphate buffered saline (PBS) and DMSO 0.05% for the control group, at 37°C for 6 hours, following the guidelines for comet assay [28,29].

### **2.3. Comet Assay (single cell gel electrophoresis)**

The alkaline comet assay followed the method described by Singh et al (1988) and was performed according to general comet assay guidelines. The leukocytes from MPS IVA patients, previously incubated with genistein and/or PBS buffer+DMSO, were used to perform the comet assay, in which it was counted 50 cells in each slide (duplicate). Cells were scored and analysed by the software CometScore and received scores from 0 (no migration) to 3 (maximal migration) according to the tail length of the comet. Therefore, the damage index (DI) ranged from 0 (100% cells with no migration)



to 3 (100% cells with maximal migration). The results were expressed as arbitrary units. The positive and negative control of this assay consisted of methyl methane sulfonate and blood from healthy individuals, respectively.

#### 2.4. Statistical Analysis

Data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Statistical comparisons were performed by means of one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Duncan multiple-comparison test, when the F value was significant. A *p* value of less than 0.05 was considered to be significant. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software in a compatible computer.

### 3. Results

Table 1 shows the damage index values of leukocytes from MPS IVA patients and the effect of genistein upon this damage. The addition of genistein (10, 30 and 50  $\mu$ M) in blood of MPS IVA patients led to a significant increase in DNA damage index when compared to MPS IVA blood samples treated with PBS buffer+DMSO [ $F(2,24) = 5.903$ ,  $p < 0.01$ ]. The software CometScore scored from 0 to 3 the tail length of each cell analysed (50 cells in duplicate). Although the damage index scored after incubation with different concentrations of genistein remained statistically the same, it was observed that the addition of 10  $\mu$ M of genistein led to an increase on DNA damage index 2.05 times higher when compared to controls and genistein concentrations of 30  $\mu$ M and 50  $\mu$ M resulted in an increment on DNA damage index 2.78 and 2.56 times higher than control group, respectively.

### 4. Discussion

The number of studies about genistein treatment in MPS has been increased in the last years. Considering genistein mechanism of action, this isoflavone could be a promising treatment for MPS, in order to avoid GAGs accumulation [9]. Reports of MPS II and IIIB animal models treated with genistein showed decrease of GAGs storage and substrate reduction [10-12]. Clinical trials are still limited to MPS types II and III, and genistein efficiency was measured by observation of clinical improvements of different symptoms [13-18]. In MPS III patients, it was demonstrated that a genistein-rich soy isoflavone extract, used in a concentration of 5mg/Kg/day of genistein for one year, did not lead to neurological symptoms improvements, while

other study with the same genistein dosage in a 26-week treatment duration with genistein-rich isoflavone extract in MPS II patients resulted in clinical improvements in range of joint motion [14, 16]. A one-year study performed in 35 MPS III patients (subtypes A, B and C) using genistein-rich soy isoflavone extract (15 mg/kg/day), showed an improvement of hair morphology [17].

Besides, a randomized crossover placebo controlled trial in MPS III patients using genistein-rich soy isoflavone extract (10mg/Kg/day of genistein), observed a decrease of urinary GAGs and heparan sulfate plasmatic levels [13]. Other clinical trial with six MPS III patients for over one year using a genistein-rich soy isoflavone extract, in which genistein dosage started with 10mg/Kg/day and increased up to a 15mg/Kg/day, resulted in a reduction of urinary GAGs levels and changes in the clinical features, which were observed mainly after a 15mg/Kg/day of genistein, such as reduction of hyperactivity and inhibition of developmental regression [15]. Other researchers studied a 5mg/Kg/day use of genistein-rich soy isoflavone extract by eight MPS III patients during 2 years, demonstrating, in most of the patients, an improvement of cognitive function during the first year of treatment [18]. In a recent paper, Kim et al. (2013) verified in a clinical trial in MPS II, III and VII patients no severe adverse effects resulting from genistein treatment using 150mg/kg/day of synthetic genistein for at least 12 months [30].

However, genistein has been described as being cytotoxic and genotoxic although these results emerged from experiments in different cell cultures and animal models, using a wide range of genistein concentration [21,22,31,32]. On the other hand, Wu and Chan (2007) verified a protective role of genistein in preventing cell apoptosis in mononuclear cells pretreated with genistein and methylglyoxal. The use of genistein, in this case, led to an inhibition of cell apoptosis induced by methylglyoxal [20]. Besides, other study using an extract of isoflavones in patients with prostate cancer demonstrated that the DNA injury induced *in vitro* in human lymphocytes did not occur *in vivo* [31]. Nevertheless, the vast majority of researches use isoflavone extracts instead of synthetic genistein, which makes difficult to compare the potential benefits and disadvantages of genistein use as a drug therapy.

Kim et al (2008) investigated a 3 month *in vitro* exposure to 1  $\mu$ M of synthetic genistein using MCF-10A breast epithelial cell lines and found by chromosomal genomic hybridization analysis that this exposure induced genetic aberrations in tested cells, such as cytogenetic changes with chromosomal number change and deletion of

regions containing tumor suppressor genes that could increase the risk of cell transformation [32]. Although genistein can lead to DNA injury as well as genomic instability, the researchers also cited that toxicity depends on cell types and the association between genistein with other genotoxic compounds [32].

Genistein ability to inhibit a protein kinase involved in GAGs synthesis may be sufficient to trigger studies regarding the use of genistein as a promisor substrate reduction therapy for MPS. However, studies regarding to cytotoxic effects of genistein are necessary, considering that MPS is a progressive, multisystemic disorder. Our study is the first one to investigate the effect of genistein treatment in MPS IVA disorder. The increased DNA damage index verified in our study in leukocytes from MPS IVA patients treated in vitro with genistein demonstrated the genotoxic effect of this isoflavone. Even the lower concentration tested (10  $\mu\text{M}$ ) showed this significant increase in DNA injury in vitro and higher concentrations (30  $\mu\text{M}$  and 50  $\mu\text{M}$ ) also showed higher DNA damage when compared with control group. Although the difference between genistein groups (10, 30 and 50  $\mu\text{M}$ ) were not statistically significant, it is important to emphasize that DNA damage was 2.05, 2.78 and 2.56 higher than control group, respectively, which means that there was 100% of increase in DNA injury after cell's co-incubation with 10  $\mu\text{M}$  of genistein. Studies will be necessary in future in order to evaluate the consequences on this increase of DNA damage, specially evaluating the long-term effect of genistein treatment.

Furthermore, in vitro and in vivo studies comparing genistein-rich soy isoflavone extract and synthetic genistein will be necessary. It is not yet established if genistein plays an important role in clinical improvements of MPS patients or if daidzein and/or glycitein are the main responsible for the results observed in clinical trials. It is also essential to perform studies of genistein toxicity as well as to verify the best doses and isoflavone formulation, in order to have enough tools to decide whether this treatment is safe to be used in MPS patients.

## **5. Conclusions**

According to our results, genistein in concentrations of 10, 30 and 50  $\mu\text{M}$  is capable to increase in vitro DNA damage in leukocytes from MPS IVA patients. More researches are necessary to confirm if this in vitro injury occurs in vivo during treatment with genistein, as well as to establish the best doses that allows GAGs decrease and clinical outcomes without significant DNA damage.

## 6. Competing Interests

The authors declare that there is no conflict of interests.

## 7. Acknowledgements

Our study was supported in part by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE/HCPA). We also thank to the patients who participated in this study for all the support in this research.

## 8. References

- [1] A. M. Montaña, S. Tomatsu, G.S. Gottesman, M. Smith, T. Orii, International Morquio A Registry: Clinical manifestation and natural course of Morquio A disease, *J Inher Metab Dis.* 30 (2007) 165–174.
- [2] M. Dvorak-Ewell, D. Wendt, C. Hague, T. Christianson, V. Koppaka, D. Crippen, E. Kakkis, M. Vellard, Enzyme Replacement in a Human Model of Mucopolysaccharidosis IVA In Vitro and Its Biodistribution in the Cartilage of Wild Type Mice, *PLoS ONE.* 5 (2010) (8) e12194.
- [3] L. Martell, K. Lau, M. Mei, V. Burnett, C. Decker, E.D. Foehr, Biomarker analysis of Morquio syndrome: identification of disease state and drug responsive markers, *Orphanet J Rare Dis.* 16 (2011) (6) 84.
- [4] S. Tomatsu, A.M. Montaña, H. Oikawa, M. Smith, L. Barrera, Y. Chinen, M.M. Thacker, W.G. Mackenzie, Y. Suzuki, T. Orii, Mucopolysaccharidosis Type IVA (Morquio A Disease): Clinical Review and Current Treatment: A Special Review. *Curr Pharm Biotechno* 12 (2011) (6) 931-945.
- [5] E. Piotrowska, J. Jakobkiewicz-Banecka, A. Tylki-Szymanska, A. Liberek, A. Maryniak, M. Malinowska, B. Czartoryska, E. Puk, et al., Genistein-rich soy isoflavone extract in substrate reduction therapy for Sanfilippo syndrome: an open-label, pilot study in 10 pediatric patients, *Curr Ther Res.* 69 (2008) (2) 166–179.
- [6] E. Tirone, C. D’Alessandris, V.C. Hascall, G. Siracusa, A. Salustri, Hyaluronan synthesis by mouse cumulus cells is regulated by interactions between follicle-

stimulating hormone (or epidermal growth factor) and a soluble oocyte factor (or transforming growth factor beta1), *J Biol Chem.* 272 (1997) (8) 4787–94.

[7] T. Akiyama, J. Ishida, S. Nakagawa, H. Ogawara, S. Watanabe, N. Itoh, M. Shibuya, Y. Fukami, Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinase, *J Biol Chem.* 262 (1987) (12) 5592–5.

[8] H. Kim, T.G. Peterson, S. Barnes, Mechanisms of action of the soy isoflavone genistein: emerging role for its effects via transforming growth factor beta signaling pathways, *Am J Clin Nutr.* 68 (1998) (Suppl.6) 1418S–1425S.

[9] J. Jakóbkiewicz-Banecka, E. Piotrowska, M. Narajczyk, S. Barańska, G. Węgrzyn, Genistein-mediated inhibition of glycosaminoglycan synthesis, which corrects storage in cells of patients suffering from mucopolysaccharidoses, acts by influencing an epidermal growth factor-dependent pathway, *J Biomed Sci.* 16 (2009) 26.

[10] A. Friso, R. Tomanin, M. Salvalaio, M. Scarpa. Genistein reduces glycosaminoglycan levels in a mouse model of mucopolysaccharidosis type II, *Br J Pharmacol.* 159 (2010) (5) 1082–1091.

[11] M. Malinowska, F.L. Wilkinson, W. Bennett, K.J. Langford-Smith, H.A. O'leary, J. Jakobkiewicz-Banecka, R. Wynn, J.E. Wraith, G. Węgrzyn, B.W. Bigger, Genistein reduces lysosomal storage in peripheral tissues of mucopolysaccharide IIIB mice, *Mol Genet Metab.* 98 (2009) (3) 235–242.

[12] M. Malinowska, F.L. Wilkinson, K.J. Langford-Smith Langford-Smith, A.; Brown, J.R., et al., Genistein improves neuropathology and corrects behaviour in a mouse model of neurodegenerative metabolic disease, *PLoS ONE.* 5 (2010) (12) e14192.

[13] J. De Ruijter, M.J. Valstar, M. Narajczyk, G. Węgrzyn, W. Kulik, L.I. Basc, T.W. Basc, W.M. Van Der Wal, F.A. Wijburg, Genistein in Sanfilippo Disease: A Randomized Controlled Crossover Trial, *Ann Neurol.* 71 (2012) (1) 110-20.

[14] V. Delgadillo, M.M. O'Callaghan, R. Artuch, R. Montero, M. Pineda, Genistein supplementation in patients affected by Sanfilippo disease, *J Inherit Metab Dis.* 34 (2011) (5) 1039-44.

[15] V. Malinová, G. Węgrzyn, M. Narajczyk, The Use of Elevated Doses of Genistein-Rich Soy Extract in the Gene Expression-Targeted Isoflavone Therapy for Sanfilippo Disease Patients, *J Inherit Metab Dis.* 5 (2012) 21-25.

[16] J. Marucha, A. Tylki-Szymańska, J. Jakóbkiewicz-Banecka, E. Piotrowska, A. Kloska, B. Czartoryska, G. Węgrzyn, Improvement in the range of joint motion in seven patients with mucopolysaccharidosis type II during experimental gene

expression-targeted isoflavone therapy (GET IT), *Am J Med Genet A.* 155 (2011) 2257–62.

[17] M. Narajczyk, A. Tylki-Szymańska, G. Węgrzyn, Changes in hair morphology as a biomarker in gene expression-targeted isoflavone therapy for Sanfilippo disease, *Gene.* 504 (2012) 292–295.

[18] E. Piotrowska, J. Jakobkiewicz-Banecka, A. Maryniak, A. Tylki-Szymanska, E. Puk, A. Liberek, A. Węgrzyn, B. Czartoryska, M. Slominska-Wojewodzka, G. Węgrzyn, Two-year follow-up of Sanfilippo Disease patients treated with a genistein-rich isoflavone extract: Assessment of effects on cognitive functions and general status of patients, *Med Sci Monit.* 17 (2011) (4) CR196-202.

[19] N.R. Bianco, L.J. Chaplin, M.M. Montano, Differential induction of quinone reductase by phytoestrogens and protection against oestrogen-induced DNA damage, *The Biochem J.* 385 (2005) 279-87.

[20] H.J. Wu, W.H. Chan, Genistein protects methylglyoxal-induced oxidative DNA damage and cell injury in human mononuclear cells, *Toxicol In Vitro*, 21 (2007) 335-42.

[21] S.E. Kulling, M. Metzler. Induction of micronuclei, DNA strand breaks and HPRT mutations in cultured Chinese hamster V79 cells by the phytoestrogen coumestrol, *Food Chem Toxicol* 35 (1997) (6) 605– 613.

[22] A.L. Di Virgilio, K. Iwami, W. Watjen, R. Kahl, G.H. Degen. Genotoxicity of the isoflavones genistein, daidzein and equol in V79 cells, *Toxicol Lett.* 151 (2004) (1) 151–162.

[23] S.E. Kulling, B. Rosenberg, E. Jacobs, M. Metzler, The phytoestrogens coumestrol and genistein induce structural chromosomal aberrations in cultured human peripheral blood lymphocytes, *Arch Toxicol* 73 (1999) (1) 50–54.

[24] J.G.N. De Jong, R.A. Wevers, R. Liebrand-van Sambeek, Measuring urinary glycosaminoglycans in the presence of protein: an improved screening procedure for mucopolysaccharidoses based on dimethylmethylene blue, *Clin. Chem.* 38 (1992) 803–807.

[25] E. Piotrowska, J. Jakobkiewicz-Banecka, S. Baranska, A. Tylki-Szymańska, B. Czartoryska, A. Węgrzyn, G. Węgrzyn, Genistein-mediated inhibition of glycosaminoglycan synthesis as a basis for gene expression-targeted isoflavone therapy for mucopolysaccharidoses, *Eur J Hum Genet.* 14 (2006) (7) 846–852.

- [26] A. Arfi, M. Richard, C. Gandolphe, D. Scherman. Storage correction in cells of patients suffering from mucopolysaccharidoses types IIIA and VII after treatment with genistein and other isoflavones, *J Inherit Metab Dis.* 33 (2010) 61–67.
- [27] J. Huang, M. Nasr, Y. Kaimnd, H. R. Matthew, Genistein Inhibits Protein Histidine Kinase, *J Biol Chem*, 267 (1992) (22) 15511-15515.
- [28] R.R. Tice, D. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J.C. Ryu, Y.F. Sasaki, Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, *Environ. Mol. Mutagen.* 35 (2000) 206–221.
- [29] A. Hartmann, E. Agurell, C. Beevers, S. Brendler-Schwaab, B. Burlinson, P. Clay, A. Collins, G. Smith, G. Speit, V. Thybaud, R.R. Tice, Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay, *Mutagenesis.* 18 (2003) 45–51.
- [30] K.H. Kim, C. Dodsworth, A. Paras, B.K. Burton. High dose genistein aglycone therapy is safe in patients with mucopolysaccharidoses involving the central nervous system, *Mol Genet Metab.* 109 (2013) (4) 382-5.
- [31] W. Miltyk, C.N. Craciunescu, L. Fischer, R.A. Jeffcoat, M.A. Koch, W. Lopaczynski, C. Mahoney, R.A. Jeffcoat, J. Crowell, J. Paglieri, S.H. Zeisel. Lack of significant genotoxicity of purified soy isoflavones (genistein, daidzein, and glycitein) in 20 patients with prostate cancer, *Am J Clin Nutr.* 77 (2003) (4) 875– 882.
- [32] Y.M. Kim, S. Yang, W. Xu, S. Li, X. Yang, Continuous *in vitro* exposure to low dose genistein induces genomic instability in breast epithelial cells, *Cancer Genet Cytogenet.* 186 (2008) (2) 78–84.

**Table 1. In vitro effect of genistein on DNA damage index in leukocytes from MPS IVA patients.**

<b>Genistein concentration in MPS IVA patient blood samples</b>	<b>Number of patients<sup>a</sup></b>	<b>DNA Damage Index (mean ± standard deviation) (Arbitrary Units)</b>
0 μM <sup>b</sup>	5	0.508 ± 0.163
10 μM	4	1.041 ± 0.455*
30 μM	4	1.414 ± 0.335*
50 μM	4	1.298 ± 0.440*

<sup>a</sup> Data represent mean ± standard deviation of five independent experiments (MPS IVA blood patients).

<sup>b</sup> Samples non treated with genistein were incubated with phosphate buffered saline + DMSO and represented control.

\* Difference from control, represented by samples non treated with genistein (0 μM), p<0.01 (ANOVA followed by Duncan test).



#### **4. DISCUSSÃO GERAL**

---



O envolvimento do estresse oxidativo na fisiopatologia de diversas DLDs, tais como doença de Fabry, alguns tipos de MPS, Niemann-Pick tipo C (NPC) e doença de Gaucher tem sido estudado por diferentes grupos de pesquisadores (DEGANUTO et al., 2007; FILIPPON et al., 2011a; FILIPPON et al., 2011b; PEREIRA et al., 2008; RIBAS et al., 2012; SHEN et al., 2008). Estes dados da literatura reforçam a importância de estudar tanto o processo inflamatório quanto oxidativo em MPS, visando um melhor entendimento da fisiopatologia desta doença e de possíveis novos tratamentos. A literatura descreve estudos mostrando aumento na função pulmonar, na mobilidade e na diminuição de hepatoesplenomegalia advindos da TRE em MPS (KAKKIS et al., 2001; GERMAIN, 2005). Assim, foram analisados nesta dissertação a quantidade de GAGs urinários e o biomarcador inflamatório IL1- $\beta$  no plasma de pacientes com MPS II no diagnóstico e após TRE. Além disso, esses dados foram correlacionados com parâmetros de estresse oxidativo que envolve dano a proteínas, lipídios e DNA.

Os resultados obtidos a partir dos experimentos realizados em amostras de sangue de pacientes com MPS tipo II mostraram uma diminuição de dano a lipídios e ao DNA após tratamento com reposição da enzima deficiente, possibilitando inferir que o tratamento com TRE protege contra este dano. Outros biomarcadores avaliados foram os GAGs acumulados, que são reduzidos após início da TRE, assim como o dano oxidativo a lipídios. Este resultado pode ser visualizado através da correlação positiva significativa encontrada entre os níveis de GAGs urinários e os valores de MDA plasmáticos, um produto da peroxidação lipídica. O acúmulo intralisossomal de GAGs é indiretamente proporcional à atividade enzimática, que varia conforme a alteração molecular do paciente com MPS II. Quanto maior for este acúmulo de GAGs, maior o dano oxidativo a lipídios e, conseqüentemente, maior será a ocorrência de alterações importantes na fluidez e permeabilidade das membranas celulares, o que pode desencadear importantes alterações em pacientes com MPS II.

Os altos níveis de GAGs dentro dos lisossomos podem também estar associados ao dano ao DNA, conforme a correlação positiva encontrada entre

estes dois marcadores bioquímicos. Cabe ressaltar que é possível inferir que o dano ao DNA, neste caso, foi originado por uma via oxidativa, uma vez que o dano a esta biomolécula apresentou correlação positiva com o dano oxidativo a lipídios e correlação negativa com o conteúdo de grupamentos SH. Os pacientes com MPS II que participaram deste trabalho apresentaram valores de grupamentos tióis reduzidos no momento diagnóstico e a TRE acarretou em aumento deste marcador com conseqüente redução do dano oxidativo a proteínas. A diminuição da injúria a proteínas é explicada pelo fato de que os grupamentos tióis apenas refletem a ocorrência de estresse oxidativo quando encontrados em baixas concentrações, quando há diminuição do conteúdo protéico. Sabe-se, também, que o antioxidante não-enzimático glutatona reduzida (GSH) encontra-se diminuído quando ocorre redução dos grupos SH (HALLIWELL, 2006). Foram verificadas correlações negativas entre grupamentos SH e os níveis plasmáticos de MDA, bem como valores de índice dano ao DNA nestes pacientes. Desta forma, enquanto ocorre um aumento nos níveis de SH ao longo do tratamento com a TRE, observamos uma redução no dano a lipídios e ao DNA, o que indica um benefício desta terapia no que tange o balanço redox na MPS II. Cabe ressaltar, portanto, que a redução dos processos oxidativos advindas da TRE foi evidente e que os marcadores de estresse oxidativo empregados no trabalho contemplaram diferentes biomoléculas, a saber, proteínas, lipídios e DNA.

Embora este trabalho não tenha verificado uma diferença significativa entre os níveis plasmáticos de IL-1 $\beta$ , foi observada uma tendência ao aumento deste biomarcador inflamatório após TRE quando comparado ao grupo de pacientes MPS não tratados. Além disso, foi verificado um aumento do conteúdo de carbonilas antes e após TRE, bem como correlação positiva entre este biomarcador de estresse oxidativo e os níveis de IL-1 $\beta$ , sugerindo que o dano oxidativo a proteínas esteja associado à indução de processos inflamatórios. Cabe ressaltar que os níveis mais acentuados de IL-1 $\beta$  encontrados em pacientes submetidos à TRE podem acarretar em uma resposta autoimune, considerando que as proteínas modificadas podem ser reconhecidas pelo sistema imune como

sendo de origem exógena e que, por sua vez, podem levar a uma exacerbação da resposta imunológica e, talvez, induzir o processo inflamatório. Um estudo realizado em pacientes com doença de Fabry observou um aumento significativo do fator de necrose tumoral  $\alpha$  e interleucina 6 após o tratamento com TRE específica para esta DLD, bem como correlação entre interleucina 6 e di-tirosina, um biomarcador de dano protéico, inferindo que o estresse oxidativo e a inflamação ocorrem paralelamente (BIANCINI et al., 2012). O papel da inflamação em DLDs também já foi estudado para a doença de Gaucher, onde parece ocorrer a indução da ativação de macrófagos resultante do acúmulo de glicocerebrosídeos. Quando ativados, estes macrófagos desencadeiam o processo inflamatório, onde há alteração na expressão de citocinas e fatores derivados dos macrófagos (MIKOSCH, 2011). A inter-relação entre processos oxidativos e inflamatórios está bem descrita na literatura.

A geração de EROs pode acarretar na liberação de citocinas responsáveis pela “up-regulation” de moléculas de adesão, bem como pela mobilização e ativação dos leucócitos, plaquetas e do endotélio. Além disso, a literatura também relata que as células inflamatórias, uma vez ativadas, são capazes de levar ao aumento das EROs e de citocinas como resposta à sua ativação, apresentando um papel citotóxico em algumas situações (WANG et al., 2007).

Um estudo realizado em modelo murino de MPS tipo IIIB analisou a expressão de genes relacionados à apoptose, citocinas inflamatórias e receptores no cérebro e cerebelo, demonstrando a ocorrência de “up-regulation” no receptor de uma quimiocina responsável pelo aprisionamento de neutrófilos (CXCR2) e pela “up-regulation” da citocina responsável pela ativação das células endoteliais, conhecida como peptidil prolil isomerase A, que possivelmente apresenta um papel importante na patogênese de doenças inflamatórias (VILLANI et al., 2007).

Outro estudo avaliou parâmetros de estresse oxidativo no fígado de ratos com NPC1, bem como a expressão gênica no fígado e cerebelo destes animais comparados com controles, onde foi verificada a ocorrência de reação inflamatória aumentada bem como um aumento do dano induzido por estresse

oxidativo no fígado e cerebelo deste modelo animal de NPC1 em comparação ao grupo controle. A N-acetilcisteína, uma substância com conhecida ação antioxidante, quando utilizada de forma aguda, evidenciou claramente o papel do estresse oxidativo no dano hepático, com a redução da inflamação a nível hepático em ratos NPC1 submetidos a este tratamento (VAZQUEZ et al., 2011). Os efeitos antioxidantes da N-acetilcisteína foram também relatados em doenças peroxissomais (TOLAR et al., 2007).

Em modelo animal de MPS IIIB, foi demonstrado que o uso de um vetor lentiviral de  $\alpha$ -N-acetilglicosaminidase (NAGLU) para liberação intracraniana do gene humano NAGLU dentro do cérebro de ratos adultos jovens possibilitou a diminuição significativa na expressão de uma quimiocina inflamatória responsável pelo recrutamento de macrófagos, conhecida como MIP1- $\alpha$  ou Ccl3, em ratos MPS IIIB tratados por seis meses e comparados com grupo não tratado com NAGLU. Este estudo também sugeriu a possibilidade de utilização de determinados genes tais como o gp91phox, um componente do complexo enzimático oxidase NADPH dependente e também uma fonte de EROs durante a inflamação, como biomarcadores para o seguimento do tratamento da MPS IIIB, uma vez que expressão deste gene encontra-se reduzida no grupo tratado com NAGLU em comparação com o grupo não tratado (DI DOMENICO et al., 2009). A literatura cita diferentes marcadores de estresse oxidativo utilizados para avaliar o dano oxidativo em pacientes portadores de DLDs e há relatos de diversas DLDs em que há aumento do dano oxidativo a biomoléculas, tais como alguns tipos de MPS, NPC, doença de Fabry e de Gaucher. Cabe ressaltar que há estudos que avaliam o estresse oxidativo antes e após o tratamento com TRE em MPS tipo I e II, bem como Doença de Fabry e NPC, que demonstraram benefícios advindos da reposição enzimática sobre o dano oxidativo (DEGANUTO et al., 2007; RIBAS et al., 2012; PEREIRA et al., 2008; FILIPPON et al., 2011a; FILIPPON et al., 2011b; SHEN et al., 2008). Ribas et al. (2007) avaliaram parâmetros de estresse oxidativo em pacientes com NPC tipo 1 no diagnóstico e durante o tratamento com N-butil-desoxinojirimicina (miglustate), onde foi observado um aumento significativo de TBA-RS

plasmáticos e em fibroblastos, aumento na formação de proteínas carboniladas e na atividade de GSH-Px em eritrócitos destes pacientes, bem como uma redução de TAS plasmático de pacientes não tratados em comparação com o grupo controle. Além disso, o tratamento estudado resultou em normalização dos níveis plasmáticos de TBA-RS, TAS e GSH-Px (RIBAS et al., 2012). Um estudo realizado em 11 pacientes com MPS tipo I verificou que estes participantes apresentaram elevados níveis de lipoperoxidação. Ainda, a TRE resultou em diminuição da atividade da SOD e aumento da atividade da catalase (PEREIRA et al., 2008).

O presente trabalho sinaliza a ocorrência de processos inflamatórios e oxidativos em pacientes MPS tipo II no momento do diagnóstico, através de correlações significativas entre biomarcadores importantes dos processos acima citados. Além disso, a TRE foi capaz de proteger contra o dano a lipídios, proteínas e DNA. Outro achado interessante foi a ocorrência de correlação positiva significativa entre os GAGs urinários e o índice de peroxidação lipídica, que reflete dano a lipídios, e com o índice de dano ao DNA. Além disso, a TRE reduziu os níveis de GAGs urinários, o que provavelmente influencia de forma positiva contra o dano oxidativo a biomoléculas como os lipídios e o DNA. Pode-se concluir que o acúmulo de GAGs na MPS II provavelmente induz o dano oxidativo a estas biomoléculas. Ainda, os resultados permitem sugerir que a medida de MDA plasmático poderia ser empregada como uma ferramenta facilitadora para o seguimento da TRE em pacientes portadores de MPS II.

Dados da literatura mostram que é importante estudar novas opções de tratamentos para estas DLDs, não com o intuito de substituir as TRE já existentes e sim para agregar tratamentos e melhorar a condição clínica e qualidade de vida destes pacientes. Dentro deste contexto, o mecanismo de ação proposto para a genisteína permite inferir que esta isoflavona poderá ser, futuramente, um tratamento importante na redução dos GAGs sabidamente acumulados em todos os tipos de MPS (AKIYAMA et al., 1987; KIM et al., 1998; JAKÓBKIEWICZ-BANECKA et al., 2009). Estudos realizados em modelos animais de MPS tipos II e IIIB tratados com genisteína demonstraram uma redução no armazenamento

de GAGs, bem como a redução de substrato (FRISO et al., 2010; MALINOWSKA et al., 2009; MALINOWSKA et al., 2010). Os ensaios clínicos encontrados na literatura sobre este tema limitam-se às MPS II e III, onde a eficiência da genisteína foi avaliada através da melhoria de diversos sintomas que comumente ocorrem nestas MPS (DE RUIJTER et al., 2012; DELGADILLO et al., 2011; MALINOVÁ et al., 2012; MARUCHA et al., 2011; NARAJCZYK et al., 2012; PIOTROWSKA et al., 2011).

Um estudo aberto com duração de um ano realizado com 19 pacientes MPS III avaliou o uso de um extrato de isoflavonas rico em genisteína (5mg/Kg/dia genisteína) por estes pacientes e verificou que esta dose não acarretou em melhorias dos sintomas neurológicos apresentados pelos participantes (DELGADILLO et al., 2011). Outro ensaio clínico, desta vez em pacientes com o tipo II de MPS, observou que a dose de 5mg/Kg/dia de genisteína presente no extrato de isoflavonas de soja rico em genisteína resultou em melhora clínica na amplitude do movimento articular dos pacientes, após acompanhamento de 26 semanas de tratamento (MARUCHA et al., 2011). Um ensaio clínico realizado em 35 pacientes com os três subtipos de MPS III (A, B e C) verificou resultados positivos na morfologia capilar dos participantes após um ano de tratamento com extrato de isoflavonas da soja rico em genisteína, cuja dose diária desta isoflavona era de 15mg/Kg (NARAJCZYK et al., 2012).

Além disso, um ensaio clínico randomizado cruzado contra placebo realizado em 12 pacientes com MPS III que utilizaram extrato de isoflavonas de soja rico em genisteína (10mg/Kg/dia de genisteína), acarretou em uma diminuição nos níveis plasmáticos de heparan sulfato, bem como em níveis de GAGs urinários, embora a redução absoluta destes marcadores tenha sido pouco significativa quando comparado com pacientes MPS III não tratados (DE RUIJTER et al., 2012).

Seis pacientes com MPS III foram acompanhados por mais de um ano utilizando um extrato de isoflavonas de soja rico em genisteína, cuja dosagem de genisteína inicial foi de 10 mg/Kg/dia aumentada para 15 mg/Kg/dia durante o estudo. Os resultados obtidos foram a redução dos níveis de GAGs urinários e



mudanças em alguns dos sintomas clínicos apresentados previamente pelos participantes do ensaio clínico. Estas alterações incluíram a diminuição da hiperatividade e inibição da regressão no desenvolvimento, e foram observadas principalmente após a utilização de dose mais elevada de genisteína (15 mg/Kg/dia) (MALINOVÁ et al., 2012). Outro ensaio clínico, realizado durante dois anos com oito pacientes MPS III que fizeram uso de extrato de isoflavonas de soja rico em genisteína, porém com uma dose diária de genisteína de 5mg/Kg, observou uma melhoria na função cognitiva durante o primeiro ano de tratamento, na maioria dos pacientes (PIOTROWSKA et al., 2011).

Diversos estudos descrevem a genisteína como sendo citotóxica e genotóxica, embora estes resultados tenham sido obtidos através de experimentos que utilizaram diferentes culturas celulares e modelos animais, bem como diferentes concentrações de genisteína (KULLING et al., 1997; DI VIRGILIO et al., 2004; MILTYK et al., 2003; MISRA et al., 2002; KLEIN et al., 2007; KIM et al., 2008). Em 2008, Kim e colaboradores investigaram a exposição *in vitro* da linhagem celular MCF-10A de células de epiteliais da mama a 1  $\mu$ M de genisteína sintética por três meses, onde encontraram através de hibridização genômica que a exposição a esta concentração baixa de genisteína foi capaz de induzir alterações citogenéticas com mudanças no número de cromossomos, bem como deleções em regiões contendo genes supressores de tumores que poderiam aumentar o risco de transformação celular. Embora a genisteína possa acarretar em prejuízos no DNA e afetar a estabilidade genômica, os autores também comentam que a toxicidade depende das características de cada tipo celular, bem como da associação ou não da genisteína com outros compostos genotóxicos (KIM et al., 2008).

Vale ressaltar que muitos ensaios clínicos sobre genisteína são realizados em indivíduos saudáveis ou com outras condições clínicas e patologias diferentes da MPS. Além disso, a grande maioria dos relatos encontrados na literatura leva em consideração extratos de isoflavonas e concentrações de genisteína conforme ingestão através da dieta ao invés de doses mais elevadas de genisteína sintética para serem utilizadas como tratamento. Como consequência, a avaliação e

comparação dos benefícios potenciais e desvantagens do uso da genisteína como terapia medicamentosa acaba sendo dificultada.

A habilidade da genisteína em inibir uma proteína quinase específica envolvida na síntese de GAGs é suficiente para despertar interesse nesta isoflavona e estudá-la com o intuito de, futuramente, utilizá-la como terapia de redução do substrato em MPS para auxiliar no tratamento da doença. Por este motivo, é fundamental avaliar a toxicidade desta terapia promissora, uma vez que a literatura acerca da segurança na utilização de genisteína não está completamente elucidada. O presente estudo foi o primeiro a investigar o uso da genisteína na MPS tipo IVA.

O aumento do índice de dano ao DNA verificado neste trabalho em leucócitos tratados *in vitro* com genisteína corrobora o efeito citotóxico *in vitro* desta isoflavona. Foi verificado um aumento significativo de dano ao DNA mesmo após ter submetido os leucócitos a uma concentração mais baixa (10  $\mu\text{M}$ ) desta isoflavona, demonstrando que a genisteína apresenta citotoxicidade. Além disso, concentrações maiores de genisteína (30  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$ ) acarretaram em dano ao DNA ainda maior. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos testados, porém é evidente a existência de fragmentação no DNA e consequente lesão após tratamento com genisteína nas concentrações de 10  $\mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$ . Além disso, o nível de fragmentação do DNA dos leucócitos tratados com 10  $\mu\text{M}$  de genisteína foi duplicado quando comparado com o grupo controle, demonstrando que a co-incubação com 10  $\mu\text{M}$  desta isoflavona acarreta em um aumento de 100% da fragmentação do DNA. Faz-se necessário avaliar as consequências deste aumento de dano ao DNA, principalmente considerando o efeito a longo prazo do tratamento com genisteína. O conhecimento acerca dos efeitos citotóxicos desta isoflavona é fundamental para que a mesma seja utilizada de forma segura no tratamento das MPS, considerando que estas desordens são progressivas e comprometem diferentes órgãos.

Os estudos encontrados na literatura empregam diferentes apresentações contendo genisteína, sendo ela testada ora na sua forma sintética, ora em extratos

de soja que apresentam uma mistura vasta de isoflavonas, tais como daidzeína e gliciteína, em diferentes proporções. Estas diferenças de formulação dificultam o entendimento do papel de cada isoflavona, pois a mistura delas pode ser a verdadeira responsável pelos resultados obtidos em ensaios clínicos, por razão de um possível efeito sinérgico entre elas. Além disso, há apenas um estudo que avaliou o uso isolado da genisteína em pacientes com MPS. Este estudo, realizado por Kim e colaboradores (2013), demonstrou que o uso de genisteína sintética em doses elevadas (150mg/kg/dia) por 1 a 2 anos foi seguro e não acarretou em efeitos adversos graves (KIM et al., 2013).

O custo pode ser uma das razões para os estudos clínicos não empregarem a genisteína na sua forma isolada. Tal isolamento realizado a partir de um extrato de soja além de ser trabalhoso, provavelmente necessite de uma quantidade de matéria-prima bastante elevada. A genisteína sintética, por sua vez, é fabricada por uma quantidade limitada de indústrias e tem custo muito elevado.

Para que a genisteína possa ser utilizada como tratamento para as MPS serão necessários mais estudos que avaliem as formulações contendo genisteína ou esta isoflavona na forma isolada, bem como a dose mais efetiva e os efeitos tóxicos advindos do tratamento. De posse destes resultados será possível optar pelo uso da genisteína como um tratamento seguro para MPS.



## **5. CONCLUSÕES**

---



Foi observada, a partir deste trabalho, a existência de uma provável presença de estresse oxidativo e processo inflamatório em pacientes com MPS II no diagnóstico. Os resultados experimentais obtidos demonstraram a ocorrência de correlação positiva entre os GAGs urinários e o índice de peroxidação lipídica, que reflete dano a lipídios em pacientes com MPS tipo II, bem como correlação positiva entre os GAGs urinários e o índice de dano ao DNA nestes pacientes. A capacidade da TRE em reduzir os níveis de GAGs urinários foi também evidenciada, o que influencia positivamente contra o dano oxidativo a biomoléculas como os lipídios e o DNA. Pode-se sugerir um possível papel dos GAGs como indutores de dano oxidativo na MPS II. Os resultados obtidos também permitem sugerir o emprego da dosagem de MDA plasmático como um biomarcador promissor no seguimento da TRE em pacientes MPS II.

O tratamento *in vitro* com genisteína nas concentrações 10, 30 e 50  $\mu\text{M}$  em leucócitos de pacientes com MPS IVA acarretou em indução de dano ao DNA. Foi verificado um aumento significativo de dano ao DNA após adição *in vitro* de concentração baixa de genisteína (10  $\mu\text{M}$ ), com consequente duplicação do nível de fragmentação do DNA dos leucócitos tratados com esta concentração de genisteína quando comparado com o grupo controle. Além disso, foi demonstrada a ocorrência de dano ao DNA mais expressivo em leucócitos co-incubados com concentrações maiores de genisteína (30  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$ ). Estudos mais aprofundados são necessários para melhor entender a segurança do uso da genisteína em pacientes com MPS.





## **6. PERSPECTIVAS**

---



- Avaliar marcadores inflamatórios em MPS II e IVA antes e após a TRE;
- Avaliar marcadores de estresse oxidativo em amostras de urina de pacientes com MPS II e IVA;
- Avaliar o efeito *in vivo* da genisteína em pacientes com MPS;
- Avaliar o efeito *in vitro* de outras isoflavonas;
- Comparar o dano ao DNA da genisteína sintética com a obtida do extrato da soja;
- Avaliar parâmetros de estresse oxidativo em pacientes com MPS IVA antes e depois do tratamento com genisteína.



## **7. REFERÊNCIAS**

---



AKIYAMA, T.; ISHIDA, J.; NAKAGAWA, S., OGAWARA, H.; WATANABE, S.; ITOH, N.; SHIBUYA, M.; FUKAMI, Y. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinase. **Journal of Biological Chemistry**. V. 262, n.12, p. 5592–5, 1987.

ALTARESCU, G.; ZIMRAN, A.; MICHELAKAKIS, H.; ELSTEIN, D. TNF-alpha levels and TNF-alpha gene polymorphism in type I Gaucher disease. **Cytokine**. V. 31, n. 2, p. 149–152, 2005.

ALTARESCU, G.; CHICCO, G.; WHYBRA, C.; DELGADO-SANCHEZ, S.; SHARON, N.; BECK, M.; ELSTEIN, D. Correlation between interleukin-6 promoter and C-reactive protein (CRP) polymorphisms and CRP levels with the Mainz severity score index for Fabry disease. **Journal of Inherited Metabolic Disease**. V. 31, n. 1, p. 117–123, 2008.

BAEHNER, F.; SCHMIEDESKAMP, C.; KRUMMENAUER, F.; MIEBACH, E.; BAJBOUJ, M.; WHYBRA, C.; KOHLSCHÜTTER, A.; KAMPMANN, C.; BECK, M. Cumulative incidence rates of the mucopolysaccharidoses in Germany. **Journal of Inherited Metabolic Disease**. V. 28, n. 6, p. 1011–1017, 2005.

BARSHAK, A.G.; SITTA, A.; DEON, M.; DE OLIVEIRA, M.H.; HAESER, A.; DUTRA-FILHO, C.S.; WAJNER, M.; VARGAS, C.R. Evidence that oxidative stress is increased in plasma from patients with maple syrup urine disease. **Metabolic Brain Disease**. V. 21, n. 4, p. 279-86, 2006.

BECK M. Mucopolysaccharidosis Type II (Hunter Syndrome): clinical picture and treatment. **Current Pharmaceutical Biotechnology**. V. 12, n.6, p. 861-6, 2011.

BECKMAN, K.B.; AMES, B.N. The free radical theory of aging matures. **Physiological Reviews**. V. 78, n. 2, p. 547-81, 1998.

BERG, K.; DANES, B. S.; BEARN, A. G. The linkage relation of the loci for the Xm serum system and the X-linked form of Hurler's syndrome (Hunter's syndrome). **American Journal of Human Genetics**. V. 20, p. 398-401, 1968.

BERRY, H.K. Screening for mucopolysaccharide disorders with the Berry spot test. **Clinical Biochemistry** . V. 20, n. 5, p. 365-371, 1987.

BIANCINI, G.B.; VANZIN, C.S.; RODRIGUES, D.B.; DEON, M.; RIBAS, G.S.; BARSCHAK, A.G., et al. Globotriaosylceramide is correlated with oxidative stress and inflammation in Fabry patients treated with enzyme replacement therapy. **Biochimica et Biophysica Acta**. V. 1822, n. 2, p. 226–32, 2012.

BIANCO, N.R.; CHAPLIN, L.J.; MONTANO, M.M. Differential induction of quinone reductase by phytoestrogens and protection against oestrogen-induced DNA damage. *The Biochemical Journal*. V. 385, p 279-87, 2005.

BONNEFOY, M.; DRAI, J.; KOSTKTA, T. Antioxidants to slow aging, facts and perspectives. **La Presse médicale**. V. 31, p. 1174-84, 2002.

DEGANUTO, M.; PITTIS, M.G.; PINES, A.; DOMINISSINI, S.; KELLEY, M.R.; GARCIA, R.; QUADRIFOGLIO, F.; BEMBI, B.; TELL, G. Altered intracellular redox status in Gaucher disease fibroblasts and impairment of adaptive response against oxidative stress. **Journal of Cellular Physiology**. V. 212, n. 1, p. 223-35, 2007.

DEON, M.; WAJNER, M.; SIRTORI, L.R.; FITARELLI, D.; COELHO, D.M.; SITTA, A.; BARSCHAK, A.G.; FERREIRA, G.C.; HAESER, A.; GIUGLIANI,



R.; VARGAS, C.R. The effect of Lorenzo's oil on oxidative stress in X-linked adrenoleukodystrophy. **Journal of the Neurological Sciences**. V. 247, n. 2, p. 157-64, 2006.

DE JONG, J. G. N.; WEVERS, R.A.; LAARAKKERS, C.; POORTHUIS B. J. Dimethylmethylene Blue-Based Spectrophotometry of Glycosaminoglycans in Untreated Urine: a Rapid Screening Procedure for Mucopolysaccharidoses. **Clinical Chemistry**. V. 35, n. 7, p. 1472-1477, 1989.

DE RUIJTER, J.; VALSTAR, M. J.; NARAJCZYK, M.; WEGRZYN, G.; KULIK, W.; BASC, L.I.; BASC, T.W.; VAN DER WAL, W. M.; WIJBURG, F.A. Genistein in Sanfilippo Disease: A Randomized Controlled Crossover Trial. **Annals of Neurology**. V. 71, n. 1, p. 110-20, 2012.

DELGADILLO, V.; O'CALLAGHAN, M.M.; ARTUCH, R.; MONTERO, R.; PINEDA, M. Genistein supplementation in patients affected by Sanfilippo disease. **Journal of Inherited Metabolic Disease**. V. 34, n. 5, p. 1039-44, 2011.

DESNICK, R.J. Enzyme replacement and enhancement therapies for lysosomal diseases. **Journal of Inherited Metabolic Disease**. V. 27, n. 3, p. 385-410, 2004.

DI DOMENICO, C.; VILLANI, G.R.; DI NAPOLI, D.; NUSCO, E.; CALÌ, G.; NITSCH, L.; DI NATALE, P. Intracranial Gene Delivery of LV-NAGLU Vector Corrects Neuropathology in Murine MPS IIIB. **American Journal of Medical Genetics Part A**. V. 149A, n. 6, p. 1209-18, 2009.

DI VIRGILIO, A.L.; IWAMI, K.; WATJEN, W.; KAHL, R.; DEGEN, G.H. Genotoxicity of the isoflavones genistein, daidzein and equol in V79 cells. **Toxicology Letters**. V.151, n. 1, p. 151-62, 2004.

DRÖGE W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**. V. 82, p. 47-95, 2002.

DVORAK-EWELL, M.; WENDT, D.; HAGUE, C.; CHRISTIANSON, T.; KOPPAKA, V.; CRIPPEN, D.; KAKKIS, E.; VELLARD, M. Enzyme Replacement in a Human Model of Mucopolysaccharidosis IVA *In Vitro* and Its Biodistribution in the Cartilage of Wild Type Mice. **PLoS ONE**. V. 5, n. 8, 2010.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais Livres: conceito, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**. V. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FILIPPON, L.; WAYHS, C.A.; ATIK, D.M.; MANFREDINI, V.; HERBER, S.; CARVALHO, C.G.; SCHWARTZ, I.V.; GIUGLIANI, R.; VARGAS, C.R. DNA damage in leukocytes from pretreatment mucopolysaccharidosis type II patients; protective effect of enzyme replacement therapy. **Mutation Research**. V. 721, n. 2, p. 206–10, 2011a.

FILIPPON, L.; VANZIN, C.S.; BIANCINI, G.B.; PEREIRA, I.N.; MANFREDINI, V.; SITTA, A.; PERALBA MDO, C., SCHWARTZ, I.V.; GIUGLIANI, R.; VARGAS, C.R. Oxidative stress in patients with mucopolysaccharidosis type II before and during enzyme replacement therapy. **Molecular Genetics and Metabolism**. V. 103, n. 2, p. 121–7, 2011b.

FRISO, A.; TOMANIN, R.; SALVALAIO, M.; SCARPA, M. Genistein reduces glycosaminoglycan levels in a mouse model of mucopolysaccharidosis type II. **British Journal of Pharmacology**. V. 159, n. 5, p. 1082–1091, 2010.

FROISSART, R.; DA SILVA, I.M.; MAIRE, I. Mucopolysaccharidosis type II: an update on mutation spectrum. **Acta Paediatrica**. V. 96, n. 455, p. 71-7, 2007.

GERMAIN, D.P. Enzyme Replacement therapies for lysosomal storage disorders. **International Journal of Medical Sciences**. V. 21, n.11, p. 77-83, 2005.

GIUGLIANI, R.; ROJAS, V.M.; MARTINS, A.M.; VALADARES, E.R.; CLARKE, J.T.; GÓES, J.E.; KAKKIS, E.D.; WORDEN, M.A.; SIDMAN, M.; COX, G.F. A dose-optimization trial of laronidase (Aldurazyme) in patients with mucopolysaccharidosis I. **Molecular Genetics and Metabolism**. V. 96, n. 1, p. 13-19, 2009.

HALLIWEL, B. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence? **The Lancet**. V. 344, p. 721-24, 1994.

HALLIWEL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. **Drugs Aging**. V. 18, p. 685-716, 2001.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants: Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**. V. 141, n. 2, p. 312–22, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in Biology and Medicine**. 4 ed. New York: Oxford University Press, Oxford, 2007.

HAMANO, K.; HAYASHI M.; SHIODA K.; FUKATSU, R.; MIZUTANI, S. Mechanisms of neurodegeneration in mucopolysaccharidoses II and IIIB: analysis of human brain tissue. **Acta Neuropathologica** . V. 115, n. 5, p. 547–559, 2008.

HARMATZ, P.; GIUGLIANI, R.; SCHWARTZ, I.V.; GUFFON, N.; TELES, E.L.; MIRANDA, M.C.; WRAITH, J.E.; BECK, M., et al. Long-term follow-up

of endurance and safety outcomes during enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis VI: final results of three clinical studies of recombinant human N-acetylgalactosamine 4-sulfatase. **Molecular Genetics and Metabolism**. V. 94, n. 4, p. 469–475, 2008.

INSTITUT FÜR ANGEWANDTE SYNTHESCHEMIE. Disponível em: <http://www.ias.tuwien.ac.at/research-divisions/organic-chemistry/novel-heterocyclic-systems-and-special-nmr-techniques/research-topics/health-and-environment/development-and-synthesis-of-novel-substrates-for-enzyme-assays-in-medicinal-analytics/>. Acesso em: 23 de ago. 2013.

JAKÓBKIEWICZ-BANECKA, J.; PIOTROWSKA, E.; NARAJCZYK, M.; BARAŃSKA, S.; WEGRZYN, G. Genistein-mediated inhibition of glycosaminoglycan synthesis, which corrects storage in cells of patients suffering from mucopolysaccharidoses, acts by influencing an epidermal growth factor-dependent pathway. **Journal of Biomedical Science**. V. 16, p. 26, 2009.

JEYAKUMAR, M.; THOMAS, R.; ELLIOT-SMITH, E.; SMITH, D.A.; VAN DER SPOEL, A.C.; D'AZZO, A.; PERRY, V.H.; BUTTERS, T.D.; DWEK, R.A.; PLATT, F.M. Central nervous system inflammation is a hallmark of pathogenesis in mouse models of GM1 and GM2 gangliosidosis. **Brain**. V. 126, n. 4, p. 974–87, 2003.

KAKKIS, E.D.; MUENZER, J.; TILLER, G.E.; WABER, L.; BELMONT, J.; PASSAGE, M.; IZYKOWSKI, B.; PHILLIPS, J.; DOROSHOW, R.; WALOT, I.; HOFT, R.; NEUFELD, E.F. Enzyme-replacement therapy in mucopolysaccharidoses I. **New England Journal of Medicine**. V. 344, n. 3, p. 182–188, 2001.

KLEIN, C.B; KING, A.A. Genistein genotoxicity: Critical considerations of *in vitro* exposure dose. **Toxicology and Applied Pharmacology**. V. 224, n. 1, p. 1–11, 2007.

KIM, H.; PETERSON, T.G.; BARNES, S. Mechanisms of action of the soy isoflavone genistein: emerging role for its effects via transforming growth factor beta signaling pathways. **American Journal of Clinical Nutrition**. V. 68, suppl. 6, p.1418S-1425S, 1998.

KIM, Y.M.; YANG, S.; XU, W.; LI, S.; YANG, X. Continuous *in vitro* exposure to low dose genistein induces genomic instability in breast epithelial cells. **Cancer Genetis and Cytogenetics**. V. 186, n. 2, p. 78–84, 2008.

KIM K.H.; DODSWORTH, C.; PARAS, A.; BURTON, B.K. High dose genistein aglycone therapy is safe in patients with mucopolysaccharidoses involving the central nervous system. **Molecular Genetics and Metabolism**. V. 109, n. 4, p. 382-5, 2013.

KULLING, S.E.; METZLER, M. Induction of micronuclei, DNA strand breaks and HPRT mutations in cultured Chinese hamster V79 cells by the phytoestrogen coumoestrol. **Food and Chemical Toxicology**. V. 35, n. 6, p. 605–613, 1997.

KULLING, S.E.; ROSENBERG, B.; JACOBS, E.; METZLER, M. The phytoestrogens coumoestrol and genistein induce structural chromosomal aberrations in cultured human peripheral blood lymphocytes. **Archives of Toxicology**. V. 73, n. 1, p. 50–4, 1999.

LANKESTER, B.J.A.; WHITEHOUSE, M.; GARGAN, MF. Morquio syndrome. **Current Orthopaedics**. V. 20, n. 2, p. 128–131, 2006.

LATINI, A.; BORBA ROSA, R.; SCUSSIATO, K.; LLESUY, S.; BELLÓ-KLEIN, A.; WAJNER, M. 3-hydroxyglutaric acid induces oxidative stress and decreases the antioxidant defences in cerebral cortex of young rats. **Brain Research**. V. 956, n. 2, p. 367-73, 2002.

MABE, P.; VALIENTE, A.; SOTO V.; CORNEJO V.; RAIMANN E. Evaluation of reliability for urine mucopolysaccharidosis screening by dimethylmethylene blue and Berry spot tests. **Clinica Chimica Acta**. V. 345, n. 1-2, p. 135–140, 2004.

MALINOVÁ, V.; WĘGRZYN G.; NARAJCZYK, M. The Use of Elevated Doses of Genistein-Rich Soy Extract in the Gene Expression-Targeted Isoflavone Therapy for Sanfilippo Disease Patients . *Journal of Inherited Metabolic Disease Reports*. V. 5, p. 21-25, 2012.

MALINOWSKA, M.; WILKINSON, F.L.; BENNETT, W.; LANGFORD-SMITH, K.J.; O'LEARY, H.A.; JAKOBKIEWICZ-BANECKA, J.; WYNN, R.; WRAITH, J.E.; WĘGRZYN, G.; BIGGER, B.W. Genistein reduces lysosomal storage in peripheral tissues of mucopolysaccharide IIIB mice. **Molecular Genetics and Metabolism**. V. 98, n. 3, p. 235–242, 2009.

MALINOWSKA, M., WILKINSON, F.L.; LANGFORD-SMITH, K.J.; LANGFORD-SMITH, A.; BROWN, J.R., et al. Genistein improves neuropathology and corrects behaviour in a mouse model of neurodegenerative metabolic disease. **PLoS ONE**, V. 5, n. 12, e14192, 2010.

MARTELL, L.; LAU, K.; MEI, M.; BURNETT, V.; DECKER, C.; FOEHR, E.D. Biomarker analysis of Morquio syndrome: identification of disease state and drug responsive markers. **Orphanet Journal of Rare Diseases**. V. 16, n. 6, p. 84, 2011.

MARTIN, R.; BECK, M.; ENG, C.; GIUGLIANI, R.; HARMATZ, P.; MUNOZ, V.; MUENZER, J. Recognition and diagnosis of mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome). **Pediatrics**. V. 121, n. 2, p. 377–386, 2008.

MARUCHA, J.; TYLKI-SZYMA\_NSKA, A.; JAKÓBKIEWICZ-BANECKA, J.; PIOTROWSKA, E.; KLOSKA, A.; CZARTORYSKA, B.; WEŁGRZYN, G. Improvement in the range of joint motion in seven patients with mucopolysaccharidosis type II during experimental gene expression targeted isoflavone therapy (GET IT). **American Journal of Medical Genetics Part A**. V. 155, p. 2257–62, 2011.

MEIKLE, P. J.; HOPWOOD, J.J.; CLAGUE, A.E.; CAREY, W.F. Prevalence of lysosomal storage disorders. **Journal of the American Medical Association**. V. 281, p. 249-54, 1999.

MIKOSCH, P. Gaucher disease and bone. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**. V. 25, n. 5, p. 665–681, 2011.

MILTYK, W.; CRACIUNESCU, C.N.; FISCHER, L.; JEFFCOAT, R.A.; KOCH, M.A.; LOPACZYNSKI, W.; MAHONEY, C.; JEFFCOAT, R.A.; CROWELL, J.; PAGLIERI, J., ZEISEL, S.H. Lack of significant genotoxicity of purified soy isoflavones (genistein, daidzein, and glycitein) in 20 patients with prostate cancer. **American Journal of Clinical Nutrition**. V. 77, n. 4, p. 875–82, 2003.

MISRA, R.R.; HURSTING, S.D.; PERKINS, S.N.; SATHYAMOORTHY, N.; MIRSALIS, J.C.; RICCIO, E.S.; CROWELL, J.A. Genotoxicity and carcinogenicity studies of soy isoflavones. **International Journal of Toxicology**. V. 21, n. 4, p. 277–85, 2002.

MONTAÑO, A.M.; TOMATSU, S.; GOTTESMAN, G.S.; SMITH, M.; ORII, T. International Morquio A Registry: clinical manifestation and natural course of Morquio A disease. **Journal of Inherited Metabolic Disease**. V. 30, n. 2, p.165-74, 2007.

MUENZER J.; GUCSAVAS-CALIKOGLU M.; MCCANDLESS S.E., SCHUETZ, T.J.; KIMURA, A. A phase I/II clinical trial of enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome). **Molecular Genetics and Metabolism**. V.90, n. 3, p. 329–337, 2007.

NARAJCZYK, M.; TYLKI-SZYMAŃSKA, A.; WĘGRZYN, G. Changes in hair morphology as a biomarker in gene expression-targeted isoflavone therapy for Sanfilippo disease. **Gene**. V. 504, p. 292–295, 2012.

NEUFELD, E. F.; MUENZER J. The mucopolysaccharidoses, in: C.R. SCRIVER, A.L. BEAUDET, W.S. SLY, D. VALLE (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, eighth ed., McGraw-Hill, New York, p. 3421–3452, 2001.

NELSON, J. Incidence of the mucopolysaccharidoses in Northern Ireland. **Human Genetics**. V.101, p. 355-358, 1997.

NELSON, J.; CROWHURST, J.; CAREY, B.; GREED, L. Incidence of the mucopolysaccharidoses in Western Australia. **American Journal of Medical Genetics**, Part A. V. 123A, n. 3, p. 310-313, 2003.

OHMI, K.; GREENBERG, D.S.; RAJAVEL, K.S.; RYAZANTSEV, S.; LI, H.H.; NEUFELD, E.F. Activated microglia in cortex of mouse models of mucopolysaccharidoses I and IIIB. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. V. 100, n. 4, p. 1902–7, 2003.



PEREIRA, V.G.; MARTINS, A.M.; MICHELETTI, C.; D'ALMEIDA, V. Mutational and oxidative stress analysis in patients with mucopolysaccharidosis type I undergoing enzyme replacement therapy. **Clinica Chimica Acta**. V. 387, n. 1-2, p. 75-9, 2008.

PIOTROWSKA, E.; JAKOBKIEWICZ-BANECKA, J.; BARANSKA, S.; TYLKI-SZYMAŃSKA, A.; CZARTORYSKA, B.; WĘGRZYN, A.; WĘGRZYN, G. Genistein-mediated inhibition of glycosaminoglycan synthesis as a basis for gene expression-targeted isoflavone therapy for mucopolysaccharidoses. **European Journal of Human Genetics**. V. 14, n. 7, p. 846–852, 2006.

PIOTROWSKA, E.; JAKOBKIEWICZ-BANECKA, J.; TYLKI SZYMANSKA, A., LIBEREK, A.; MARYNIAK, A.; MALINOWSKA, M.; CZARTORYSKA, B.; PUK, E., et al. Genistin-rich soy isoflavone extract in substrate reduction therapy for Sanfilippo syndrome: an open-label, pilot study in 10 pediatric patients. **Current Therapeutic Research**. V. 69, n. 2, p. 166–179, 2008.

PIOTROWSKA, E.; JAKOBKIEWICZ-BANECKA, J.; AGNIESZKA MARYNIAK, A.; ANNA TYLKI-SZYMANSKA, A.; PUK, E.; LIBEREK, A.; WĘGRZYN, A.; CZARTORYSKA B.; SŁOMINSKA-WOJEWODZKA, M.; WĘGRZYN, G. Two-year follow-up of Sanfilippo Disease patients treated with a genistein-rich isoflavone extract: Assessment of effects on cognitive functions and general status of patients. **Medical science monitor**. V.17, n. 4, p. CR196-202, 2011.

PINTO, L.L.C.; VIEIRA, T.A.; GIUGLIANI, R.; SCHWARTZ, I.V.D. Expression of the disease on female carriers of X-linked lysosomal disorders: a brief review. **Orphanet Journal of Rare Diseases**. V.5, n.14, p. 1-10, 2010.

PINTO, R.; CASEIRO, C.; LEMOS, M.; LOPES, L.; FONTES, A.; RIBEIRO, H.; PINTO, E.; SILVA, E.; ROCHA, S.; MARCAO, A.; RIBEIRO, I.; LACERDA, L.; RIBEIRO, G.; AMARAL, O.; SA MIRANDA, M.C. Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal. **European Journal of Human Genetics** . V.12, n. 2, p. 87- 92, 2004.

POUPĚTOVÁ, H.; LEDVINOVÁ, J.; BERNÁ, L.; DVOŘÁKOVÁ, L.; KOŽICH, V.; ELLEDER, M. The birth prevalence of lysosomal storage disorders in the Czech Republic: comparison with data in different populations. **Journal of Inherited Metabolic Disease**. V. 33, n. 4, p. 387-396, 2010.

RAMOS-VASCONCELOS, G.R.; ALVES A.L.H.; HERMES-LIMA, M. Radicais livres, antioxidantes e a adaptabilidade animal. In: O Que é Vida: Para Entender a Biologia do Século XXI, p. 209-231 (capítulo 9). Editado por C.N. EL-HANI CN E A.A.P.VIDEIRA. Editora Relume Dumará, Rio de Janeiro, p. 209-331, 2000.

REOLON G.K.; REINKE A.; DE OLIVEIRA, M.R.; BRAGA L.M.; CAMASSOLA, M.; ANDRADES, M.E.; MOREIRA, J.C., et al. Alterations in Oxidative Markers in the Cerebellum and Peripheral Organs in MPS I Mice. **Cellular and Molecular Neurobiology**. V. 29, n. 4, p. 443–8, 2009.

RIBAS, G.S.; PIRES, R.; COELHO, J.C.; RODRIGUES, D.; MESCKA, C.P.; VANZIN, C.S., et al. Oxidative stress in Niemann-Pick type C patients: a protective role of N-butyl-deoxynojirimycin therapy. **International Journal of Developmental Neuroscience**. V. 30, n. 6, p. 439-44, 2012.

ROVERSI, F.M.; GALDIERI, L.C.; GREGO, B.H.; SOUZA, F.G.; MICHELETTI, C.; MARTINS, A.M.; D'ALMEIDA, V. Blood oxidative stress markers in Gaucher disease patients. **Clinica Chimica Acta**. V. 364, n. 1-2, p. 316-20, 2006.

SANTAMARIA, R.; CHABÁS, A.; COLL, M.J.; MIRANDA, C.S.; VILAGELIU, L.; GRINBERG, D. Twenty-one novel mutations in the GLB1 gene identified in a large group of GM1-gangliosidosis and Morquio B patients: possible common origin for the prevalent p.R59H mutation among gypsies. **Human Mutation**. V. 27, n. 10, p. 1060, 2006.

SCANDALIOS, J.G. Oxidative stress responses – What have genome-scale studies taught us? **Genome Biology**. V. 3, p. 1-7, 2002.

SCHIFFMANN, R.; BRADY, R.O. New prospects for the treatment of lysosomal storage diseases. **Drugs**. V. 62, n. 5, p.733-42, 2002.

SHEN, J.S.; MENG, X.L.; MOORE, D.F.; QUIRK, J.M.; SHAYMAN, J.A.; SCHIFFMANN, R.; KANESKI, C.R. Globotriaosylceramide induces oxidative stress and up-regulates cell adhesion molecule expression in Fabry disease endothelial cells. **Molecular Genetics and Metabolism**. V. 95, n. 3, p. 163-8, 2008.

SIGMA-ALDRICH. Estrutura Química da Genisteína. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/g6649?lang=pt&region=BR>  
Acesso em: jun. 2013.

SIMONARO, C.M.; D'ANGELO, M.; HE, X.; ELIYAHU, E.; SHTRAIZENT, N.; HASKINS, M.E.; SCHUCHMAN, E.H. Molecular pathogenesis of genetic and inherited diseases mechanism of glycosaminoglycan-mediated bone and joint disease: implications for the mucopolysaccharidoses and other connective tissue diseases. **American Journal of Pathology**. V. 172, n. 1, p. 112–122, 2008.

SINGH, N.; MCCOY, M.; TICE, R.; SCHNEIDER, E. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individuals cells. **Experimental Cell Research**, V.175, p.184-191, 1988.

SIRTORI, L.R.; DUTRA-FILHO, C.S.; FITARELLI, D.; SITTA, A.; HAESER, A.; BARSCHAK, A.G.; WAJNER, M.; COELHO, D.M.; LLESUY, S.; BELLÓ-KLEIN, A.; GIUGLIANI, R.; DEON, M.; VARGAS, C.R. Oxidative Stress in Patients with Phenylketonuria. **Biochimica et Biophysica Acta**. V. 1740, n. 1, p. 68-73, 2005.

SITTA, A.; BARSCHAK, A.G.; DEON, M.; TERROSO, T.; PIRES, R.; GIUGLIANI, R.; DUTRA-FILHO, C.S.; WAJNER, M.; VARGAS, C.R. Investigation of oxidative stress parameters in treated phenylketonuric patients. **Metabolic Brain Disease**. V. 21, n. 4, p. 287-96, 2006.

TIRONE, E.; D'ALESSANDRIS, C.; HASCALL, V.C.; SIRACUSA, G.; SALUSTRI, A. Hyaluronan synthesis by mouse cumulus cells is regulated by interactions between follicle-stimulating hormone (or epidermal growth factor) and a soluble oocyte factor (or transforming growth factor beta1). **Journal of Biological Chemistry**. V. 272, n. 8, p. 4787-94, 1997.

TOLAR, J.; ORCHARD, P.J.; BJORAKER, K.J.; ZIEGLER, R.S.; SHAPIRO, E.G.; CHARNAS, L. N-acetyl-L-cysteine improves outcome of advanced cerebral adrenoleukodystrophy. **Bone Marrow Transplantation**. V. 39, n. 4, p. 211-5, 2007.

TOMATSU, S.; FUKUDA, S.; MASUE, M.; SUKEGAWA, K.; MASUNO, M.; ORII, T. Mucopolysaccharidosis type IVA: characterization and chromosomal localization of N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase gene and genetic heterogeneity. **American Journal of Human Genetics**. V. 51, supl.1, p. A178, 1992.

TOMATSU, S.; MONTAÑO, A.M.; OIKAWA, H.; SMITH, M.; BARRERA, L.; CHINEN, Y.; THACKER, M.M.; MACKENZIE, W.G.; SUZUKI, Y., ORII, T. Mucopolysaccharidosis Type IVA (Morquio A Disease): Clinical Review and Current Treatment. **Current Pharmaceutical Biotechnology**. V. 12, n. 6, p. 931-945, 2011.

TSAI, T.H., Concurrent measurement of unbound genistein in the blood, brain and bile of anesthetized rats using microdialysis and its pharmacokinetic application. **Journal of Chromatography A**. V. 1073, n.1-2, p. 317–322, 2005.

VALAYANNOPOULOS, V.; WIJBURG, F.A. Therapy for the mucopolysaccharidoses. **Rheumatology (Oxford)**. V. 50, Supl 5, p. 49-59, 2011.

VARGAS, C.R.; WAJNER, M.; SIRTORI, L.R.; GOULART, L.; CHIOCHETTA, M.; COELHO, D.; LATINI, A.; LLESUY, S.; BELLO-KLEIN, A.; GIUGLIANI, R.; DEON, M.; MELLO, C.F. Evidence that oxidative stress is increased in patients with X-linked adrenoleukodistrophy. **Biochimica et Biophysica Acta**. V. 1688, n. 1, p. 26-32, 2004.

VAZQUEZ, M.C.; DEL POZO, T.; ROBLEDO, F.A.; CARRASCO, G.; PAVEZ, L.; OLIVARES, F., et al. Alteration of Gene Expression Profile in Niemann-Pick Type C Mice Correlates with Tissue Damage and Oxidative Stress. **PLoS ONE**. V. 6, n. 12, e28777, 2011.

VIEIRA, T.; SCHWARTZ, I.; MUÑOZ, V.; PINTO, L.; STEINER, C.; RIBEIRO, M.; BOY, R.; FERRAZ, V.; DE PAULA, A.; KIM, C.; ACOSTA, A.; GIUGLIANI, R. Mucopolysaccharidoses in Brazil: what happens from birth to biochemical diagnosis? **American Journal of Medical Genetics, Part A**. V. 146A, n. 13, p. 1741–1747, 2008.

VILLANI, G.R.; DI DOMENICO, C.; MUSELLA, A.; CECERE, F.; DI NAPOLI, D.; DI NATALE, P. Mucopolysaccharidosis IIIB: oxidative damage and cytotoxic cell involvement in the neuronal pathogenesis. **Brain Research**. V. 1279, p. 99–108, 2009.

VILLANI, G.R.; GARGIULO, N.; FARAONIO R.; CASTALDO, S.; REYERO, E. G.; DI NATALE, P. Cytokines, Neurotrophins, and Oxidative Stress in Brain Disease From Mucopolysaccharidosis IIIB. **Journal of Neuroscience Research**. V. 85, p. 612–22, 2007.

VOZNYI, Y.V.; KEULEMANS, J.L.M.; VAN DIGGELEN, O.P. A fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of MPS II (Hunter disease). **Journal of Inherited Metabolic Disease**. V. 24, p. 675–680, 2001.

WANG, Q.; TANG, X.N.; YENARI, M.A. The Inflammatory Response in Stroke. **Journal of Neuroimmunology**. V. 184, n. 1-2, p. 53–68, 2007.

WRAITH, J.E.; CLARKE, L.A.; BECK, M.; KOLODNY, E.H.; PASTORES, G.M.; MUENZER, J.; RAPOPORT, D.M.; BERGER, K.I.; SWIEDLER, S.J.; KAKKIS, E.D.; BRAAKMAN, T.; CHADBOURNE, E.; WALTON-BOWEN, K.; COX, G.F. Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis I: a randomized, double-blinded, placebo-controlled, multinational study of recombinant human alpha-L-iduronidase (Laronidase). **Journal of Pediatrics**. V. 144, n. 5, p. 581–588, 2004.

WU, H., CHAN, W. Genistein protects methylglyoxal-induced oxidative DNA damage and cell injury in human mononuclear cells. **Toxicology In Vitro**. V. 21, p. 335–342, 2007.

YOUNG, I.D.; HARPER, P.S.; NEWCOMBE R.G.; ARCHER, I.M. A clinical and genetic study of Hunter's syndrome 2: differences between the mild and severe forms. **Journal of Medical Genetics**. V.19, n. 6, p. 408–411, 1982.





## **8. ANEXOS**

---



## ANEXO 1

### Carta de aceite do artigo referente ao capítulo 2 desta dissertação de mestrado

----- Mensagem encaminhada -----

De: **Molecular Genetics and Metabolism**

Data: domingo, 24 de novembro de 2013

Assunto: MGM-13-595 - Final Decision

Para: gnegretto@gmail.com

Ms. No.: MGM-13-595

Title: In vitro effect of genistein on DNA damage in leukocytes from Mucopolysaccharidosis IVA patients

Corresponding Author: Mrs. Giovanna Webster Negretto

Authors: Marion Deon; Maira Burin; Giovana Biancini; Graziela Ribas; Solange Garcia; Gabriela Goethel; Rafael Fracasso; Luciana Giugliani; Roberto Giugliani; Carmen Vargas

Dear Mrs. Negretto,

We are pleased to notify you that your above-referenced manuscript has been accepted for publication in Molecular Genetics and Metabolism. We publish monthly and average 100 days from submission to publication. Our journal is also available online as part of Elsevier's ScienceDirect System. We have a color figure on each cover. You may want to indicate potential cover figures in future manuscripts.

We are forwarding your manuscript to the publishing office today. Galley proofs will be sent to you as soon as they are ready.

When your paper is published on ScienceDirect, you want to make sure it gets the attention it deserves. To help you get your message across, Elsevier has developed a new, free service called AudioSlides: brief, webcast-style presentations that are shown (publicly available) next to your published article. This format gives you the opportunity to explain your research in your own words and attract interest. You will receive an invitation email to create an AudioSlides presentation shortly. For more information and examples, please visit <http://www.elsevier.com/audioslides>.

Thank you for giving us the opportunity to publish your work. We look forward to receiving other manuscripts from your laboratory.

\*\*\*\*\*

The February 2014 issue of Molecular Genetics and Metabolism will be a Special Issue on The Lysosome. Please submit your manuscripts for this Special Issue by October 15.

\*\*\*\*\*

With kind regards,

Edward R. B. McCabe, MD, PhD  
Editor-in-Chief  
Molecular Genetics and Metabolism

Senior Vice President and Medical Director  
March of Dimes  
1275 Mamaroneck Avenue  
White Plains, New York 10605  
Email: emccabe@marchofdimes.com



## ANEXO 2

### Autorização da revista para publicação do artigo nesta dissertação



Giovanna Negretto <gnegretto@gmail.com>

---

#### Authorization to include a manuscript in the final version of a master's degree

8 mensagens

Giovanna Negretto <gnegretto@gmail.com>

4 de dezembro de 2013 09:48

Para: emccabe@marchofdimes.com, MolGenMetab@elsevier.com

Cco: Carmen Regla Vargas <crvargas@hcpa.ufrgs.br>, Piti F <fleith@portoweb.com.br>, Giovanna Negretto <gnegretto@gmail.com>

Dear Editor-in-Chief,

I would like to know if you authorize the inclusion of the manuscript MGM-13-595 (title: " In vitro effect of genistein on DNA damage in leukocytes from Mucopolysaccharidosis IVA patients" that have been accepted for publication in Molecular Genetics and Metabolism in the final work of my master's degree. The experiments were part of my master's degree and it will be very important for me to include this manuscript in my work.

Look forward to hearing from you,

Kind Regards,

Giovanna W. Negretto

---

Mccabe, Linda <LINDA.MCCABE@ucdenver.edu>

4 de dezembro de 2013 11:26

Para: Giovanna Negretto <gnegretto@gmail.com>

Dear Dr. Negretto,

Certainly. Please include a reference to your Molecular Genetics and Metabolism paper.

Congratulations,

Linda

Linda L. McCabe, Ph.D., Managing Editor  
Molecular Genetics and Metabolism

---