

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

ÉDINA POLETTO

**Avaliação da atividade e identificação de catepsinas no tecido cardíaco de animais com
mucopolissacaridose tipo I**

Porto Alegre, novembro 2014

ÉDINA POLETTO

Avaliação da atividade e identificação de catepsinas no tecido cardíaco de animais com mucopolissacaridose tipo I

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Baldo

Porto Alegre, novembro 2014

Agradecimentos

Agradeço a todas as pessoas que, de alguma maneira, me auxiliaram a concluir esta etapa. Em especial:

Ao Prof. Guilherme Baldo, por me aceitar no laboratório, pela orientação, pelos ensinamentos práticos e pela constante presença durante a realização deste trabalho, que uso como exemplo e que me motiva a seguir na pesquisa científica;

Aos colegas do Centro de Terapia Gênica, por me receberem bem, pela paciência e pela ajuda, sempre dispostos a ensinar e auxiliar;

Aos antigos colegas de LIG, por terem sido ótimos companheiros por anos e por me ensinaram a prática de laboratório e de pesquisa;

Às amigas de faculdade, Carla, Giovana, Nicole e Pâmela, pelo privilégio de ter compartilhado esses 5 anos de curso, pela forte amizade e pela presença em todos os momentos.

Ao Guilherme Gallon, pelas revisões críticas, pela motivação, pelo companheirismo e pelos momentos de descontração, que tornaram esse período de trabalho muito mais leve e agradável;

Por fim, à minha família, mãe Alice e irmão Tainer, que sempre me motivaram, desde a escolha do curso; estiveram sempre presentes, não medindo esforços para me ajudar, independente da situação e dificuldade.

ÍNDICE

RESUMO.....	5
INTRODUÇÃO	7
1. Mucopolissacaridoses	7
1.1. MPS I.....	7
1.2. Manifestações cardiológicas da MPS I.....	10
1.3. Mecanismos responsáveis pelas alterações cardíacas	11
2. Catepsinas.....	12
2.1. Catepsinas nas MPS.....	14
OBJETIVOS	15
TRABALHO EXPERIMENTAL.....	16
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	38
REFERÊNCIAS ADICIONAIS	39

RESUMO

A mucopolissacaridose tipo I (MPS I) é uma doença de depósito lisossomal causada por deficiência na enzima α -L-iduronidase (IDUA). O acúmulo progressivo de glicosaminoglicanos (GAGs) nos mais variados tecidos resulta em diversas manifestações clínicas, incluindo doenças cardiovasculares. São observados o espessamento de válvula e a dilatação da aorta e do coração. A elastina, que é uma proteína estrutural da matriz extracelular, foi descrita fragmentada em aortas de MPS I, associada ao aumento da expressão de cisteíno catepsinas no tecido. Este trabalho teve como objetivo analisar se as catepsinas estão superexpressas também no tecido cardíaco de modelos MPS I. Os corações de 4 camundongos normais e 4 MPS I foram utilizados. Os ensaios de catepsinas foram desenvolvidos utilizando método fluorimétrico, fazendo-se uso de substratos e inibidores específicos. Os resultados mostraram um aumento de 10x na atividade de catepsinas no grupo MPS I comparado ao grupo normal. Dentre as catepsinas testadas (B, K e S), a catepsina B teve significativamente a maior atividade, a catepsina S teve atividade moderada e a K parece não ter envolvimento, pois não apresentou valores significativos. A atividade de caspase-3 foi analisada para verificar quaisquer processos apoptóticos no tecido, embora não tenham sido observadas diferenças significativas de atividade entre os grupos. Adicionalmente, foi constatado número aumentado de macrófagos CD68+ no tecido cardíaco dos animais MPS I. Estes dados sugerem que as catepsinas, especialmente a catepsina B, podem estar envolvidas na patogênese da miocardiopatia dilatada observada na MPS I.

Palavras-chave: Mucopolissacaridose, miocardiopatia dilatada, catepsinas.

INTRODUÇÃO

1. Mucopolissacaridoses

As mucopolissacaridoses (MPS) são um grupo de doenças de depósito lisossomal causadas pela deficiência de enzimas que degradam os glicosaminoglicanos (GAG, antigamente conhecidos por mucopolissacarídeos). O acúmulo de GAGs no lisossomo pode acarretar em diversas disfunções, tanto a nível celular quanto tecidual. Atualmente, são conhecidas 11 enzimas relacionadas que, quando alteradas, podem ocasionar 7 tipos de MPS, sendo a MPS tipo I a mais conhecida (Neufeld and Muenzer, 2001).

1.1. MPS I

A MPS I é uma doença autossômica recessiva rara de caráter crônico, progressivo e multissistêmico, causada por mutações no gene que codifica a proteína α -L-Iduronidase (IDUA). Essa proteína é uma glicosidase cuja função é hidrolisar resíduos ácidos α -L-idurônicos dos GAGs dermatan e heparan sulfato. Em caso de deficiência na enzima, esses GAGs acumulam-se nos tecidos gerando diversas manifestações clínicas, variando de acordo com a severidade da doença (Neufeld and Muenzer, 2001).

A MPS I possui uma divisão clássica com relação ao fenótipo dos pacientes. Na forma grave da doença, também conhecida como Síndrome de Hurler, as manifestações surgem normalmente no primeiro ano de vida e a expectativa é de, em média, 10 anos, sendo a causa de morte geralmente complicações cardiorrespiratórias. Os pacientes manifestam retardo mental acentuado, deformidades esqueléticas características (como crânio aumentado e disostose multiplex), rigidez de articulações, opacificação da córnea, perda de audição e

hepatoesplenomegalia. Também apresentam miocardiopatia, espessamento das válvulas cardíacas e dilatação progressiva dos ventrículos (Neufeld and Muenzer, 2001)

A forma atenuada da MPS I, ou Síndrome de Scheie, tem melhor prognóstico. O paciente manifesta os sintomas na infância, mas consegue chegar à vida adulta e não há comprometimento neurológico. Os afetados podem apresentar deformidades no esqueleto, anormalidades cardíacas e envolvimento ocular, com opacificação da córnea, glaucoma e degeneração da retina. Adicionalmente, os pacientes podem ter apneia do sono, causada por obstrução das vias aéreas, e podem necessitar de traqueostomia. A expectativa de vida é de algumas décadas, com relatos de pacientes que viveram até os 70 anos (Neufeld and Muenzer, 2001).

Por fim, uma terceira forma de MPS I também é descrita, a Síndrome de Hurler-Scheie. Nesse caso, os pacientes apresentam um fenótipo intermediário entre as Síndromes de Hurler e de Scheie, com manifestações clínicas relativamente graves, porém com leve ou nenhum comprometimento mental. O surgimento dos sintomas é observado normalmente entre os 3 e 8 anos de idade e a sobrevivência à vida adulta é comum (Neufeld and Muenzer, 2001).

A incidência de MPS I pode variar muito entre países, sendo de 1:26.206 nascimentos na Irlanda, 1:75.000 em Portugal e 1:145.000 na Alemanha (Baehner et al., 2005; Fuller et al., 2006; Murphy et al., 2009). A incidência exata de MPS I no Brasil ainda é desconhecida, mas a Rede MPS Brasil já registra 1065 diagnósticos de MPS entre 2004 e 2013, sendo que 19.4% destes são de MPS I.

O diagnóstico de MPS I se inicia com a observação dos sinais clínicos característicos, acompanhado de testes de concentração de GAGs na urina. O diagnóstico definitivo, porém, é feito pela dosagem da atividade enzimática da α -L-Iduronidase em

plasma ou em leucócitos e fibroblastos cultivados. Adicionalmente, pode-se fazer análise genotípica dos pacientes em busca de mutações no gene *IDUA* que possam alterar a estrutura da proteína (Giugliani et al., 2010). A genotipagem do paciente pode fornecer informações sobre o fenótipo da doença e ainda pode ser utilizado no aconselhamento genético das famílias.

Num primeiro momento, o tratamento da MPS I era feito somente com medidas de suporte baseadas nos sintomas apresentados pelos pacientes, como cirurgias, traqueostomia, fisioterapia e administração de analgésicos e antibióticos (Valayannopoulos and Wijburg, 2011a). Atualmente existe, além do tratamento de suporte, a terapia de reposição enzimática (TRE) e/ou transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH). A escolha entre elas depende do fenótipo e da idade do paciente no momento do diagnóstico, isso porque a doença progride rapidamente nos pacientes com fenótipos mais graves, comprometendo irreversivelmente alguns órgãos (Valayannopoulos and Wijburg, 2011a).

Em casos de pacientes menores de 2 anos e com o fenótipo mais grave da doença (Síndrome de Hurler), indica-se o TCTH, por apresentar principalmente maiores possibilidades de preservar a função cognitiva. Isso ocorre porque as células transplantadas se distribuem pelo corpo e diferenciam-se em outros tipos celulares nos mais diversos tecidos, incluindo microglia, preservando o sistema nervoso central (Aldenhoven et al., 2008; Prasad and Kurtzberg, 2010). A grande vantagem da TCTH é fornecer uma fonte endógena contínua de *IDUA* funcional, o que melhora significativamente a qualidade de vida do paciente, que passa de uma expectativa de vida de 6 anos - quando não tratado - a décadas, quando tratados com TCTH. Manifestações como hepatoesplenomegalia, obstrução de vias aéreas e problemas de audição melhoram consideravelmente depois do transplante, apesar dos sintomas cardiovasculares não apresentarem melhora tão significativa e, inclusive, se agravarem com o aumento da sobrevida dos pacientes (Aldenhoven et al., 2008).

Outra abordagem terapêutica para MPS I é a terapia de reposição enzimática. A TRE consiste em administrações intravenosas de IDUA recombinante, a laronidase. As administrações podem ser semanais ou quinzenais, embora administrações menos frequentes exijam doses maiores, o que pode gerar mais efeitos adversos (Giugliani et al., 2009). Desde que foi aprovada, em 2003, muitos ensaios clínicos mostraram que essa terapia traz muitos benefícios aos pacientes e melhora muito a qualidade de vida destes. Ainda que a laronidase não atravesse a barreira hematoencefálica e, portanto, não atue no sistema nervoso central, as manifestações viscerais são significativamente reduzidas. Pacientes que fazem uso da TRE tem excreção urinária de GAGs reduzidas (apesar de não normalizadas), diminuição no tamanho do fígado e do baço e maior movimentação das articulações (Sifuentes et al., 2007). Assim como o TCTH, a TRE não tem muita influência na reversão das manifestações cardiovasculares, especialmente nas válvulas cardíacas (Sifuentes et al., 2007; Valayannopoulos and Wijburg, 2011a)

Não diferente da TCTH, a TRE possui algumas desvantagens que podem impedir a adesão de pacientes ao tratamento: as administrações têm alto custo, são realizadas comumente em ambiente hospitalar e as infusões podem levar até 4h, dependendo da dose. Adicionalmente, mais da metade dos pacientes sofre algum tipo de reação relacionada à infusão (dores de cabeça, febre) e mais de 90% desenvolve anticorpos contra a enzima (Brooks et al., 2003; Valayannopoulos and Wijburg, 2011a).

1.2. Manifestações cardíacas da MPS I

Dentro do amplo espectro de manifestações clínicas da MPS I, as anormalidades cardíacas descritas são diversas e normalmente constituem a causa de morte dos pacientes. Problemas nas válvulas cardíacas (como espessamento e estenose) são os mais descritos,

afetando 60-80% dos pacientes com MPS (Fesslova et al., 2009; Pastores et al., 2007). O espessamento das válvulas é mais frequente do que a estenose, assim como o lado esquerdo do coração parece estar mais suscetível às alterações do que o lado direito (Braunlin et al., 2011). Estas alterações podem levar à sobrecarga no volume do átrio e/ou ventrículo esquerdos, resultando em dilatação ventricular, hipertrofia e disfunção sistólica/diastólica (Braunlin et al., 2011).

Os pacientes também apresentam estreitamento ou oclusão das artérias coronarianas (Braunlin et al., 2011), dilatação da aorta (Braunlin et al., 2011) e espessamento da carótida (Wang et al., 2011).

As manifestações no sistema cardiovascular são de difícil tratamento e normalmente diminuem drasticamente a sobrevida do paciente. As terapias disponíveis atualmente têm pouco efeito sobre essas alterações (Baldo et al., 2013; Braunlin et al., 2006; Sifuentes et al., 2007; Wraith et al., 2007), fazendo-se necessária a procura por novas abordagens terapêuticas que possam, de fato, atuar nesse sistema.

1.3. Mecanismos responsáveis pelas alterações cardíacas

Os mecanismos patológicos da MPS I não se limitam apenas ao acúmulo de GAGs nos tecidos que levam ao espessamento de estruturas, mas também às alterações secundárias provocadas por esse acúmulo inicial. Estas podem ser alterações na sinalização celular, alterações no metabolismo do cálcio, ativação do sistema imune, bloqueio na autofagia, acúmulo de metabólitos secundários, alteração no metabolismo geral e superexpressão de proteases (Baldo, 2012).

Sabe-se que algumas proteases, como as catepsinas e metaloproteinases (MMPs) estão elevadas em diversos órgãos nas MPS. O mecanismo pelo qual ocorre o aumento na expressão destas ainda não foi totalmente elucidado, mas uma das hipóteses envolve a ligação dos GAGs não degradados aos receptores tipo Toll 4, ativando uma cascata de sinalização pró-inflamatória e resultando, por fim, em aumento de macrófagos, que são secretores de proteases (Simonaro et al., 2010). Essas proteases superexpressas podem estar envolvidas na degradação de proteínas da matriz extracelular, como colágeno e elastina, o que resultaria em alterações a nível tecidual.

Com relação às alterações presentes nos vasos, em estudos conduzidos em modelo murino de MPS I, verificou-se prejuízo da elasticidade da aorta ascendente (Nemes et al., 2008) e fragmentação da elastina na mesma região (Ma et al., 2008). Em cultura de fibroblastos de pacientes com Hurler, foi observada uma diminuição da proteína ligadora de elastina (EBP), o que diminui a associação da elastina em fibras elásticas e poderia ajudar a explicar a patogênese da doença no tecido (Hinek and Wilson, 2000).

2. Catepsinas

As catepsinas (Cts) são enzimas sintetizadas como pré-pro-catepsinas e ativadas no lisossomo. Incluem-se as catepsinas D, E (aspartil-proteases), A, G (serina carboxipeptidase) e B, C, F, H, L, K, O, S, V, W, X (cisteíno-proteases). Todas são importantes proteases lisossômicas com funções que vão além da proteólise. A Cts K, por exemplo, está envolvida na remodelação óssea (Saftig et al., 1998), enquanto que a Cts S tem participação na apresentação de antígenos mediados por MHC classe II (Shi et al., 1999). A Cts B, por sua vez, participa em processos como angiogênese (Premzl et al., 2006) e regressão da glândula mamária após a lactação (Kreuzaler et al., 2011).

Catepsinas também estão descritas no processo de morte celular mediada por lisossomo (Kreuzaler et al., 2011), em que o fator de transcrição Stat3 regula a superexpressão de catepsinas B e L que, por sua vez, são liberadas ao citosol e atuam como potentes proteases. Esse mecanismo de morte celular é, em si, independente do programa clássico de apoptose que envolve a cascata de caspases e demais proteases (Lockshin and Zakeri, 2004). Entretanto, a liberação de catepsinas no citosol pode ativar proteínas pró-apoptóticas, como as caspases, o que desencadearia, somente então, no processo apoptótico (Boya and Kroemer, 2008).

Além da atuação em processos fisiológicos, as catepsinas também podem participar da patogênese de doenças quando sua expressão está desregulada. Sabe-se, por exemplo, que as catepsinas K e S estão superexpressas na aterosclerose (Lutgens et al., 2007), artrite reumatoide (Schurigt et al., 2008) e câncer (Mohamed and Sloane, 2006). A CtsS também está relacionada com o processo de calcificação das válvulas mitral e aórtica em pacientes com doença renal crônica (Aikawa et al., 2009) e na progressão de estenose aórtica (Helske et al., 2006).

A CtsB também já foi descrita atuando em diversos mecanismos patológicos, nos mais variados tecidos. Um estudo usando células epiteliais de pacientes com fibrose cística mostrou que a CtsB pode ser responsável pela ativação de canais de sódio nas vias aéreas, o que contribuiria com a progressão da doença (Da Tan et al., 2014). Estudos também sugerem que a CtsB possa mediar a resposta TH-1 a infecções, via regulação da expressão de interleucina-12, uma citocina indutora de TH-1 (Gonzalez-Leal et al., 2014). Adicionalmente, a CtsB foi relatada em superexpressão (tanto a nível de proteína quanto a nível de mRNA) em casos de miocardiopatia dilatada (Ge et al., 2006).

Em vista da diversidade de respostas que a expressão alterada de catepsinas pode gerar, alguns estudos usando inibidores de catepsinas como terapia estão em andamento. O

inibidor de catepsina K, por exemplo, já está em fase clínica de testes contra a osteoporose (Zerbini and McClung, 2013).

2.1. Catepsinas nas MPS

A observação da relação entre catepsinas e doenças cardiovasculares (Li et al., 2012; Lutgens et al., 2007) levanta a hipótese de que elas poderiam estar envolvidas na patogênese das manifestações cardiovasculares observadas nas MPS. Nos últimos anos, estudos mostraram que as catepsinas B, K e S (que são as catepsinas ativas em pH neutro) estão superexpressas na aorta de camundongos e cachorros MPS I e VII (Baldo et al., 2011; Ma et al., 2008) e nas válvulas cardíacas de cachorros com MPS VII (Bigg et al., 2013), em especial a CtsB, que apresentou níveis proteicos e de mRNA significativamente muito aumentados. Por possuir atividade elastolítica em pH neutro e pela sua abundante expressão nos tecidos com alterações patológicas, sugeriu-se que o aumento de CtsB possa estar relacionado às quebras na estrutura da elastina encontradas na aorta desses animais, o que poderia estar gerando a dilatação da aorta observada nos pacientes e nos modelos de MPS (Baldo et al., 2011).

Pelo exposto, nos parece que a avaliação da expressão e identificação de catepsinas no coração de animais com MPS I pode vir a elucidar parte do mecanismo pela qual essa patologia se manifesta nesse tecido e, caso esta hipótese se confirme, pode ajudar na busca por novas terapias.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho foi verificar a atividade de catepsinas no coração de camundongos normais e MPS I e, em caso de atividade aumentada, identificar quais são as catepsinas responsáveis pelo aumento observado.

Objetivos específicos

- Medir a atividade de catepsinas no coração de animais normais e MPS I aos 8 meses de idade.
- Utilizar inibidores e substratos específicos para identificar qual/quais catepsinas são responsáveis pela atividade observada nos animais com MPS I.
- Verificar se alterações na atividade de catepsina podem levar à morte celular por apoptose no tecido cardíaco, através da medida de atividade de caspase-3.
- Avaliar a presença de macrófagos no tecido cardíaco das amostras MPS I e normais.

Trabalho experimental na forma de artigo científico:

Increased cathepsin B activity in cardiac tissue of MPS I mice

Édina Poletto, Esteban Gonzalez, Guilherme Baldo

Trabalho em preparação a ser submetido ao periódico:

Cardiovascular Pathology

Abstract

Mucopolysaccharidosis type I (MPS I) is a lysosomal storage disease caused by α -L-iduronidase (IDUA) deficiency. Progressive accumulation of glycosaminoglycan (GAGs) in various tissues leads to many clinical features, including cardiovascular disorders. Valve thickening and heart and aorta dilatation are frequently reported. Elastin, a structural extracellular matrix protein, was described fragmented in MPS I aortas, associated with increased expression of cysteine cathepsins (Cts). This work aimed to evaluate if cathepsins are overexpressed in MPS I hearts. Hearts from 4 normal and 4 MPS I mice at 8 months of age were used. Cathepsins assays were performed using fluorimetric method, with specific inhibitors and substrates. Results showed a 10-fold increase in cathepsins activity in MPS I mice compared to normal. Among the cathepsins tested (CtsB, CtsK and CtsS), CtsB was identified as the enzyme with highest activity. Since cathepsins are potential mediators of cell death, caspase-3 activity was tested in order to evaluate any apoptotic process in the tissue, but no significant difference was observed. In addition, immunohistochemistry for CD68+ cells were performed and showed increased number of macrophages in the MPS I tissue than in normal. These data suggests that cathepsins, especially CtsB, may be involved in the pathogenesis of dilated cardiomyopathy seen in MPS I.

Keywords: mucopolysaccharidosis, cathepsin, dilated cardiomyopathy.

1. Introduction

Mucopolysaccharidosis type I (MPS I) is an autosomal recessive disease caused by deficiency of lysosomal enzyme α -L-iduronidase (IDUA), involved in the breakdown of glycosaminoglycans (GAGs). Deficiency of IDUA leads to progressive accumulation of dermatan and heparan sulphate in many organs and tissues, resulting in multisystemic chronic manifestations that vary according to the mutations involved (Giugliani et al., 2010).

MPS I has been classified into three different syndromes depending on the phenotype: Hurler, Scheie and Hurler-Scheie. The first is the severe form with life expectancy limited to childhood. Clinical manifestations are mainly mental retardation, skeletal deformities, limited joint mobility, hepatosplenomegaly, corneal clouding, sleep apnea, hearing loss and cardiorespiratory problems. Milder forms of the disease (Scheie and Hurler-Scheie) have the same characteristics, except for the cognitive impairment (Munoz-Rojas et al., 2011).

Besides GAGs accumulation itself, the disease progression is also due to complex secondary consequences of GAG deposition and these may lead to irreversible multi organ damage. Therefore, early management is required to prevent further impairments. Currently available treatments for MPS I are enzyme replacement therapy (ERT) and hematopoietic stem cells transplant (HSCT) (Valayannopoulos and Wijburg, 2011b). Both act on most clinical manifestations and improve patients' health and life expectancy, though none of them have significant results in cardiovascular involvement (Baldo et al., 2013; Braunlin et al., 2006; Sifuentes et al., 2007; Wraith et al., 2007)

Cardiovascular disease develops in at least 60% of patients and is normally the cause of death in MPS I (Braunlin et al., 2011). Manifestations include valve thickening with

associated dysfunction (regurgitation and/or stenosis) and calcium deposits, left ventricular dilatation, coronary artery narrowing and/or occlusion (Braunlin et al., 2011), dilatation of the ascending aorta, reduced aortic elasticity (Nemes et al., 2008) and increased carotid thickness (Wang et al., 2011).

Culture of MPS I fibroblasts have displayed reduced elastin-binding protein (EBP) expression and consequent decrease in elastin fiber assembly (Hinek and Wilson, 2000). Studies using the murine model of MPS I (Ohmi et al., 2003) showed heart and aortic dilatation at ages 6 and 10 months, thickened aortic wall and valve regurgitation (Jordan et al., 2005). Breaks in elastin structure, associated with increased matrix metalloproteinases (MMPs) and cathepsins (Ma et al., 2008), were also reported.

Cathepsins are a group of proteases related to extracellular matrix (ECM) remodelling and degradation (Fonovic and Turk, 2014), synthesized mainly by macrophages (Reddy et al., 1995). These lysosomal enzymes are described to be directly involved in lysosomal-mediated cell death (Kreuzaler et al., 2011) and in activation of pro-apoptotic enzymes, such as caspases (Boya and Kroemer, 2008). In addition, it has been indicated that cathepsins, especially the ones active in neutral pH, play an important role in cardiovascular diseases (Li et al., 2012; Lutgens et al., 2007) and may be responsible for heart dilation, since cathepsin B was found to be overexpressed in the myocardium of patients with dilated cardiomyopathy (Ge et al., 2006).

Once dilated aortas of MPS VII mice have increased cathepsin B expression (Baldo et al., 2011) and the same was observed in valves of MPS VII dogs (Bigg et al., 2013), we hypothesized that heart dilatation observed in MPS I patients may be due to overexpression of cathepsins, especially cathepsin B, which in turn would affect the elastin

and collagen degradation pathway, resulting in alterations in the ECM and damage to the tissue.

2. Material and Methods

2.1. *Animals*

This study was conducted following the institutional guidelines for the care and use of animals and was approved by the institution's ethics review board. Normal (Idua +/+) and MPS I (knockout for gene *IDUA*, Idua -/-) mice were used for experiments. The animals were genotyped at 21 days of age using primers Forward 5'-GAGACTTGAATGAACCAGAC-3', ReverseA 5'- ATAGGGGTATCCTTGAAGTC-3' and ReverseB 5'-GTTCTTCTGAGGGGATCGG-3'. At 8 months of age, the hearts were removed and stored at -80°C.

2.2. *Cathepsin activity assays*

Heart samples from 4 normal and 4 MPS I mice were homogenized in acetate buffer at pH 5.5 and content of protein measured using Lowry protein assay.

Cathepsins activity were measured using fluorimetric method as previously described (Baldo et al., 2011), in which samples were incubated at 37°C with 10uM cathepsin general substrate benzyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-arginine-7-amido-4-methylcoumarin (Z-Phe-Arg-AMC from Enzo Life Sciences, USA) and pH 7.5 acetate buffer. Kinetic readings were made with excitation at 355nm and emission at 460nm. Activity was then calculated by

comparison with AMC standards (7-amino-4-methylcoumarin from Enzo Life Sciences, USA).

In order to identify which cathepsins were increased in the tissue, some MPS I samples were incubated with either inhibitor of cathepsin B (Ca-074-Me), K ([1,3-Bis (N-carbobenzoyloxy-l-leucyl)]amino acetone) or S (Z-FL-COCHO) from Calbiochem, at final concentrations 10nM, 100nM and 1000nM. A control sample with no inhibitor was also used as activity standard. Reaction and reading conditions were the same as previously mentioned.

Activity of cathepsin B was determined using the specific cathepsin B substrate Z-Arg-Arg-AMC (Enzo Life Sciences, USA) and its specific inhibitor, mentioned above, at same concentrations. Reaction was also conducted at 37°C, in pH 7.5 acetate buffer and using same wavelengths as for the others assays.

2.3. Caspase-3 activity assay

Caspase-3 activity was assessed incubating 5uL of protein extract with 25uM of the substrate AC-DEVD-AMC (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY) in buffer (10mM HEPES at pH 7.5, 50mM NaCl and 8mM dithiothreitol). This substrate is specific mainly for caspase-3, but may also be cleaved by caspases -1, -4, -7 and -8. A positive control (Caspase-3 Assay Kit, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) was used in the reaction. Samples were kept at 37°C for 5h and fluorescence was measured with excitation and emission at 355nm and 460nm, respectively. Results were calculated using AMC standards.

2.4. Histological analysis

Slides were prepared using heart specimens from four MPS I and four normal mice, fixed in formaldehyde solution and embedded in paraffin wax. Tissue slices were stained with haematoxylin. CD68⁺ cells were observed by immunohistochemistry using antibody (anti-CD68 antibody from Abcam, Cambridge, UK) in a 1:800 dilution with overnight incubation at 4°C. Secondary antibody conjugated to peroxidase (antibody multispecies, from DAKO, USA), was used in 1:1000 dilution and incubated for 1h.

2.5. Statistical analysis

All statistical analysis was performed using SigmaPlot v11.0 (Systat Software, Inc.). Student t-test for unpaired samples or repeated measures ANOVA were used depending on the subject of analysis, with $p < 0.05$ being considered statistically significant.

3. Results

3.1. Activity of cathepsins in cardiac tissue

Cathepsins activity assay showed an increase of 10-fold in MPS I samples compared to normal (mean of 440.2 nmol/h/mg in MPS I vs 43.0 nmol/h/mg in normal, $p < 0.01$), evidencing the overexpression of these proteases in MPS I hearts (Fig 1).

3.2. Identification of cathepsins

The identification of increased cathepsins is shown in figure 2. Samples incubated with CtsB inhibitor showed significant decrease ($p<0.01$) in CtsB activity. Inhibitor concentrations of 10nM, 100nM and 1000nM resulted in CtsB activity of respectively 49%, 4.3% and 0%, relative to samples without the Ca-074-me compound.

Inhibition of CtsK did not have significant difference between different inhibitor concentrations, remaining with relatively high cathepsin activity in all of them ($p>0.05$). Cts S inhibition, on the other hand, was effective only when using the highest concentration of inhibitor. Activity decreased from 92.6% at 100nM to 23.5% at 1000nM ($p<0.01$).

3.3. Cathepsin B specific activity

Results of CtsB activity assay using specific substrate and inhibitor showed a 12-fold increase in MPS I hearts (Fig 3), and a significant decrease ($p<0.01$) in CtsB activity to 38.2% with 10nM of inhibitor and to 0% with 100nM and 1000nM, relative to samples with no inhibitor (Fig 4).

3.4. Cell death assay

In order to evaluate cell death, caspase-3 activity assay was performed since this enzyme is related to the apoptosis pathway. Activity for both groups were very low and did not present statistically significance (1.75 pmol/h/mg in normal vs 5.59 pmol/h/mg in MPS I) (Fig 5).

3.5. *CD68+ immunohistochemistry*

Immunohistochemistry showed increased CD68+ macrophages in cardiac tissue from MPS I mice compared to normal (Fig 6).

4. Discussion

Cardiovascular disease is an important characteristic of MPS I, since it has a prevalence of more than 60% among patients and it is the major cause of death (Braunlin et al., 2011). Although current available therapies (ERT and HSCT) act in various tissues and improve patient's health and life expectancy, they are not as effective in the cardiovascular system (Baldo et al., 2013; Braunlin et al., 2006). Therefore, in order to develop new therapies that could better assist MPS I patients, studies to understand the mechanisms of pathogenesis are required.

Initially, cathepsins activity was analysed in heart samples from normal and MPS I mice using a general substrate for cathepsins (Z-Phe-Arg-AMC). Results showed a significant 10-fold increase in cathepsins activity in MPS I group compared to normal. This suggests that cathepsins, known for their proteolytic action on ECM proteins, may be involved in the heart dilatation observed in MPS I. Increase in cathepsins was previously observed in hearts of patients with other cardiovascular disorders (Ge et al., 2006; Li et al., 2012; Lutgens et al., 2007) and also in dilated aortas of MPS I and MPS VII mice (Baldo et al., 2011; Ma et al., 2008).

MPS I heart samples were incubated with either CtsB, K or S inhibitors in order to evaluate which cathepsins were increased. These cathepsins were chosen due to their activity in neutral pH (Baldo et al., 2011; Jordans et al., 2009), which is the pH found in ECM. The cathepsins activity when using CtsB inhibitor decreased considerably at all inhibitor concentrations used, with complete lack of activity at 1000nM. This observation strongly suggests that the high cathepsin activity observed in MPS I heart is mainly due to CtsB, since all cathepsin activity in the tissue was blocked with CtsB inhibitor. When using CtsK inhibitor, on the other hand, no significant variation on cathepsins activity was observed. This is probably due to low levels of cathepsin K in this tissue. Finally, the use of CtsS inhibitor was only effective at the highest concentration used (1000nM), in which was observed a significant decrease in cathepsins activity. This reduced inhibition effectiveness is probably due to the lower specificity presented by the inhibitor, which inhibits cathepsin S at concentrations lower than 10nM, but can also inhibit CtsB at higher concentrations (Baldo et al., 2011), and therefore these results reflect low levels of CtsS in the sample. All these data converges to the hypothesis of CtsB being the main cathepsin found in dilated MPS I hearts.

In order to confirm this hypothesis, an assay using the specific CtsB substrate Z-Arg-Arg-AMC and the same CtsB inhibitor was performed. Results showed high CtsB activity without inhibitor and a vertiginously drop (up to 60%) of activity at 10nM of inhibitor. With higher inhibitor concentration, the activity of CtsB was not detectable.

All these results showed high activity of CtsB in dilated hearts of MPS I mice. This could indicate participation of CtsB in the pathogenic dilatation process, through breakdown of extracellular matrix structural proteins as elastin, described in other structures and disorders (Baldo et al., 2011; Ge et al., 2006) or collagen, since CtsB has collagenase activity (Dufour et al., 1996).

Additionally, cathepsins are described to be involved in lysosomal-mediated cell death (Lockshin and Zakeri, 2004), thus its high activity could contribute for increased cell death. Activity of caspase-3, which is a marker for apoptosis, was then measured. Results showed no statistically significant difference between groups. This result indicates that if CtsB is causing cell death in the cardiac tissue, this is not occurring through apoptotic pathways (Boya and Kroemer, 2008). We cannot completely rule out the hypothesis of increased cell death in MPS I hearts, since cathepsins can mediate this process independently of caspases activation (Kreuzaler et al., 2011). Same result was also found in MPS I neurons, in which CtsB activity was significantly increased but had no apparent influence in neuron death (Baldo et al, unpublished). Additional studies are required to further analyse morphology and cell death in MPS I cardiac tissues.

Since it had been described that macrophages are the major producers of cathepsins (Reddy et al., 1995) and this production is regulated by pro-inflammatory mediators (Liu et al., 2006; Rodgers et al., 2006), immunohistochemistry in cardiac tissue for CD68+ cells was performed. Results showed increased CD68+ macrophages number in MPS I specimens, compared to normal. Therefore, high cathepsin B levels found in MPS I hearts are probably due to macrophages, which in turn is due to the inflammatory process caused by GAG deposition (Simonaro et al., 2010). GAGs are already known to have pro-inflammatory action related to the cytokines pathway in other tissues, and the presence of carbonyl groups on proteins in the heart can activate autoimmune response and trigger inflammatory processes in the tissue (Campos and Monaga, 2012).

According to these results, our hypothesis for heart dilatation in MPS I initiates with GAGs deposition in the tissue, which induces inflammatory response and increase macrophages number. Then, macrophages produce high levels of proteases and cathepsins, mainly CtsB, which in turn are responsible for elastin and collagen degradation. Finally,

degradation of these structural proteins leads to ECM remodelling, affecting the whole tissue and causing the heart dilatation characteristic of the disease (Fig 7).

Perspectives are testing CtsB inhibitor as a treatment for cardiac manifestations in MPS I mice, since this approach has been shown efficient in other pathological conditions through reduction of inflammation and of elastin degradation (Feng et al., 2013; Samokhin et al., 2010).

5. Conclusions

These data altogether present evidence of CtsB involvement in the pathogenesis of dilated cardiomyopathy seen in MPS I, since its activity and the content of macrophages were both significantly increased. Therefore, CtsB may be a potential therapeutic target to help the treatment of cardiovascular symptoms.

Studies like this are of major importance for the understanding of mechanisms of cardiovascular impairments progression. Since these manifestations are still the main cause of death among patients, it highlights the need of new therapy approaches to better assist MPS I patients.

REFERENCES

- Baldo, G., Mayer, F.Q., Martinelli, B.Z., de Carvalho, T.G., Meyer, F.S., de Oliveira, P.G., Meurer, L., Tavares, A., Matte, U., and Giugliani, R. (2013). Enzyme replacement therapy started at birth improves outcome in difficult-to-treat organs in mucopolysaccharidosis I mice. *Molecular genetics and metabolism* *109*, 33-40.
- Baldo, G., Wu, S., Howe, R.A., Ramamoothy, M., Knutsen, R.H., Fang, J., Mecham, R.P., Liu, Y., Wu, X., Atkinson, J.P., *et al.* (2011). Pathogenesis of aortic dilatation in mucopolysaccharidosis VII mice may involve complement activation. *Molecular genetics and metabolism* *104*, 608-619.
- Bigg, P.W., Baldo, G., Sleeper, M.M., O'Donnell, P.A., Bai, H., Rokkam, V.R., Liu, Y., Wu, S., Giugliani, R., Casal, M.L., *et al.* (2013). Pathogenesis of mitral valve disease in mucopolysaccharidosis VII dogs. *Molecular genetics and metabolism* *110*, 319-328.
- Boya, P., and Kroemer, G. (2008). Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene* *27*, 6434-6451.
- Braunlin, E.A., Berry, J.M., and Whitley, C.B. (2006). Cardiac findings after enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis type I. *The American journal of cardiology* *98*, 416-418.
- Braunlin, E.A., Harmatz, P.R., Scarpa, M., Furlanetto, B., Kampmann, C., Loehr, J.P., Ponder, K.P., Roberts, W.C., Rosenfeld, H.M., and Giugliani, R. (2011). Cardiac disease in patients with mucopolysaccharidosis: presentation, diagnosis and management. *Journal of inherited metabolic disease* *34*, 1183-1197.
- Campos, D., and Monaga, M. (2012). Mucopolysaccharidosis type I: current knowledge on its pathophysiological mechanisms. *Metabolic brain disease* *27*, 121-129.
- Dufour, E., Dalgalarondo, M., Herve, G., Goutefongea, R., and Haertle, T. (1996). Proteolysis of type III collagen by collagenase and cathepsin B under high hydrostatic pressure. *Meat science* *42*, 261-269.
- Feng, Y., Ni, L., and Wang, Q. (2013). Administration of cathepsin B inhibitor CA-074Me reduces inflammation and apoptosis in polymyositis. *Journal of dermatological science* *72*, 158-167.
- Fonovic, M., and Turk, B. (2014). Cysteine cathepsins and extracellular matrix degradation. *Biochimica et biophysica acta* *1840*, 2560-2570.
- Giugliani, R., Federhen, A., Rojas, M.V., Vieira, T., Artigalás, O., Pinto, L.L., Azevedo, A.C., Acosta, A., Bonfim, C., Lourenco, C.M., *et al.* (2010). Mucopolysaccharidosis I, II, and VI: Brief review and guidelines for treatment. *Genetics and molecular biology* *33*, 589-604.
- Hinek, A., and Wilson, S.E. (2000). Impaired elastogenesis in Hurler disease: dermatan sulfate accumulation linked to deficiency in elastin-binding protein and elastic fiber assembly. *The American journal of pathology* *156*, 925-938.

- Jordan, M.C., Zheng, Y., Ryazantsev, S., Rozengurt, N., Roos, K.P., and Neufeld, E.F. (2005). Cardiac manifestations in the mouse model of mucopolysaccharidosis I. *Molecular genetics and metabolism* 86, 233-243.
- Jordans, S., Jenko-Kokalj, S., Kuhl, N.M., Tedelind, S., Sendt, W., Bromme, D., Turk, D., and Brix, K. (2009). Monitoring compartment-specific substrate cleavage by cathepsins B, K, L, and S at physiological pH and redox conditions. *BMC biochemistry* 10, 23.
- Kreuzaler, P.A., Staniszewska, A.D., Li, W., Omidvar, N., Kedjouar, B., Turkson, J., Poli, V., Flavell, R.A., Clarkson, R.W., and Watson, C.J. (2011). Stat3 controls lysosomal-mediated cell death in vivo. *Nature cell biology* 13, 303-309.
- Li, X., Liu, Z., Cheng, Z., and Cheng, X. (2012). Cysteiny l cathepsins: multifunctional enzymes in cardiovascular disease. *Chonnam medical journal* 48, 77-85.
- Liu, J., Sukhova, G.K., Yang, J.T., Sun, J., Ma, L., Ren, A., Xu, W.H., Fu, H., Dolganov, G.M., Hu, C., *et al.* (2006). Cathepsin L expression and regulation in human abdominal aortic aneurysm, atherosclerosis, and vascular cells. *Atherosclerosis* 184, 302-311.
- Lockshin, R.A., and Zakeri, Z. (2004). Caspase-independent cell death? *Oncogene* 23, 2766-2773.
- Lutgens, S.P., Cleutjens, K.B., Daemen, M.J., and Heeneman, S. (2007). Cathepsin cysteine proteases in cardiovascular disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21, 3029-3041.
- Ma, X., Tittiger, M., Knutsen, R.H., Kovacs, A., Schaller, L., Mecham, R.P., and Ponder, K.P. (2008). Upregulation of elastase proteins results in aortic dilatation in mucopolysaccharidosis I mice. *Molecular genetics and metabolism* 94, 298-304.
- Munoz-Rojas, M.V., Bay, L., Sanchez, L., van Kuijck, M., Ospina, S., Cabello, J.F., and Martins, A.M. (2011). Clinical manifestations and treatment of mucopolysaccharidosis type I patients in Latin America as compared with the rest of the world. *Journal of inherited metabolic disease* 34, 1029-1037.
- Nemes, A., Timmermans, R.G., Wilson, J.H., Soliman, O.I., Krenning, B.J., ten Cate, F.J., and Geleijnse, M.L. (2008). The mild form of mucopolysaccharidosis type I (Scheie syndrome) is associated with increased ascending aortic stiffness. *Heart and vessels* 23, 108-111.
- Ohmi, K., Greenberg, D.S., Rajavel, K.S., Ryazantsev, S., Li, H.H., and Neufeld, E.F. (2003). 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* 100, 1902-1907.
- Reddy, V.Y., Zhang, Q.Y., and Weiss, S.J. (1995). Pericellular mobilization of the tissue-destructive cysteine proteinases, cathepsins B, L, and S, by human monocyte-derived macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 3849-3853.

Rodgers, K.J., Watkins, D.J., Miller, A.L., Chan, P.Y., Karanam, S., Brissette, W.H., Long, C.J., and Jackson, C.L. (2006). Destabilizing role of cathepsin S in murine atherosclerotic plaques. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 26, 851-856.

Samokhin, A.O., Lythgo, P.A., Gauthier, J.Y., Percival, M.D., and Bromme, D. (2010). Pharmacological inhibition of cathepsin S decreases atherosclerotic lesions in Apoe^{-/-} mice. *Journal of cardiovascular pharmacology* 56, 98-105.

Sifuentes, M., Doroshov, R., Hoft, R., Mason, G., Walot, I., Diament, M., Okazaki, S., Huff, K., Cox, G.F., Swiedler, S.J., *et al.* (2007). A follow-up study of MPS I patients treated with laronidase enzyme replacement therapy for 6 years. *Molecular genetics and metabolism* 90, 171-180.

Simonaro, C.M., Ge, Y., Eliyahu, E., He, X., Jepsen, K.J., and Schuchman, E.H. (2010). Involvement of the Toll-like receptor 4 pathway and use of TNF-alpha antagonists for treatment of the mucopolysaccharidoses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 222-227.

Wang, R.Y., Covault, K.K., Halcrow, E.M., Gardner, A.J., Cao, X., Newcomb, R.L., Dauben, R.D., and Chang, A.C. (2011). Carotid intima-media thickness is increased in patients with mucopolysaccharidoses. *Molecular genetics and metabolism* 104, 592-596.

Wraith, J.E., Beck, M., Lane, R., van der Ploeg, A., Shapiro, E., Xue, Y., Kakkis, E.D., and Guffon, N. (2007). Enzyme replacement therapy in patients who have mucopolysaccharidosis I and are younger than 5 years: results of a multinational study of recombinant human alpha-L-iduronidase (laronidase). *Pediatrics* 120, e37-46.

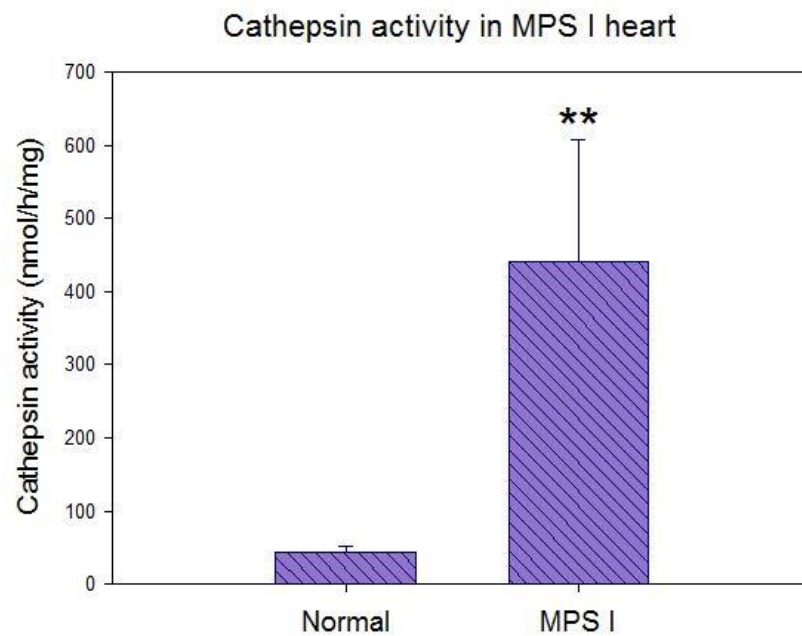


Figure 1. Total cathepsin activity in heart tissue of MPS I and normal mice. Hearts from 8-month MPS I and normal mice (n=4/group) were homogenized in pH 5.5 buffer. Five microliters of the protein extract was used for cathepsins assay. Fluorimetric readings of cathepsins activity were measured incubating samples with general substrate Z-Phe-Arg-AMC and pH 7.5 acetate buffer at 37°C. MPS I mice presented 10-fold increase in cathepsin activity compared to normal samples. **p<0.01, Student's t-test.

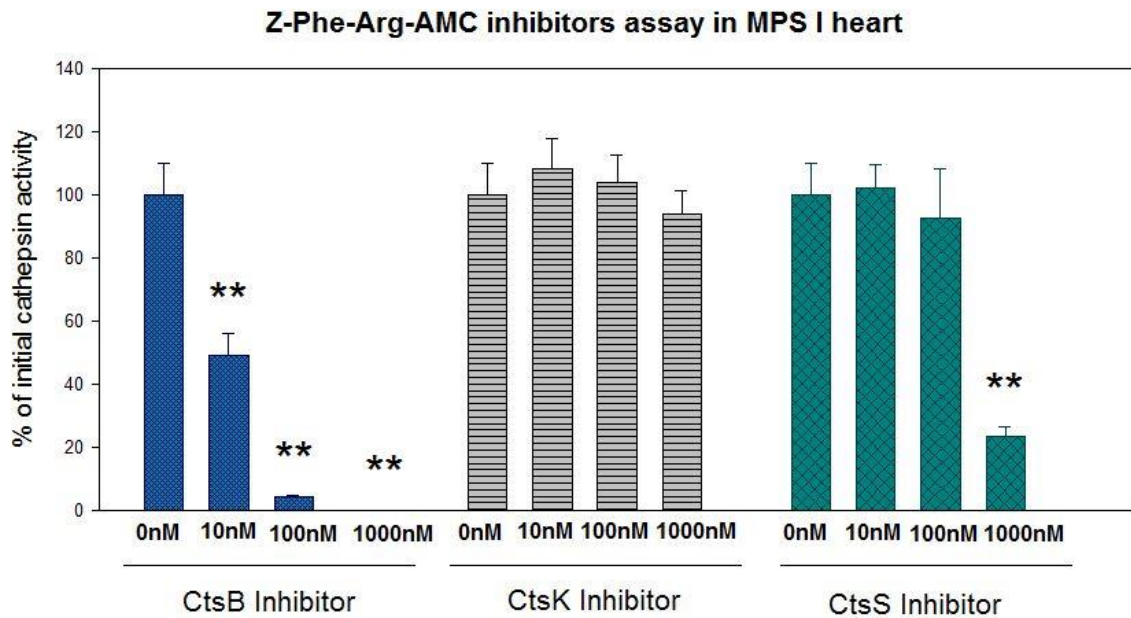


Figure 2. Identification of increased cathepsins in protein extract samples of MPS I mice hearts using general cathepsin substrate Z-Phe-Arg-AMC and inhibitors. Blue: Cathepsin activity was significantly reduced with all CtsB inhibitor concentrations, relatively to the control sample with no inhibitor. Grey: use of specific CtsK inhibitor have not decreased total cathepsin activity significantly compared to the 0nM inhibitor sample control, even at the highest inhibitor concentration. Green: Significant decrease in cathepsins activity occurred only with 1000nM of CtsS inhibitor (23% of uninhibited activity at 1000nM). **p < 0.01, ANOVA with Tukey post-hoc analysis.

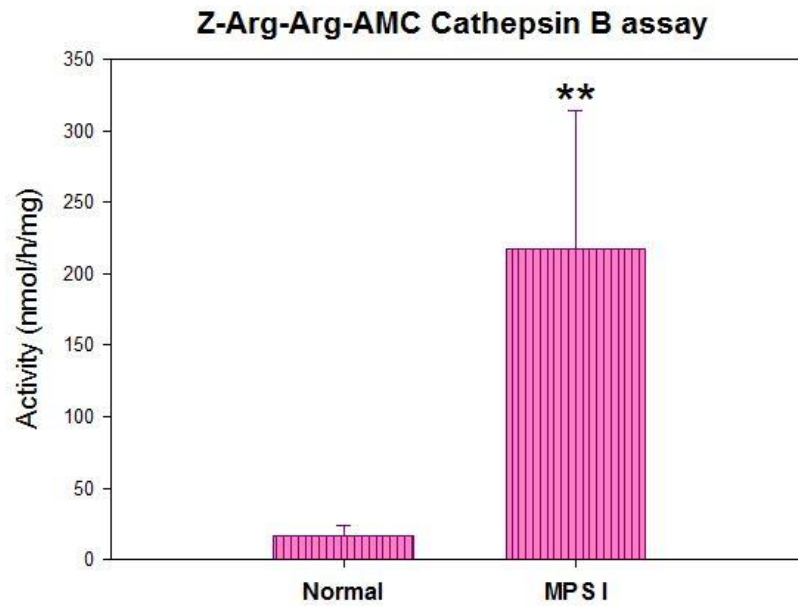


Figure 3: CtsB activity in hearts from 8-month old mice. Specific CtsB substrate Z-Arg-Arg-AMC was used in the assay. CtsB activity at neutral pH in MPS I mice was 12-fold normal levels. ** $p < 0.01$, Student's t-test.

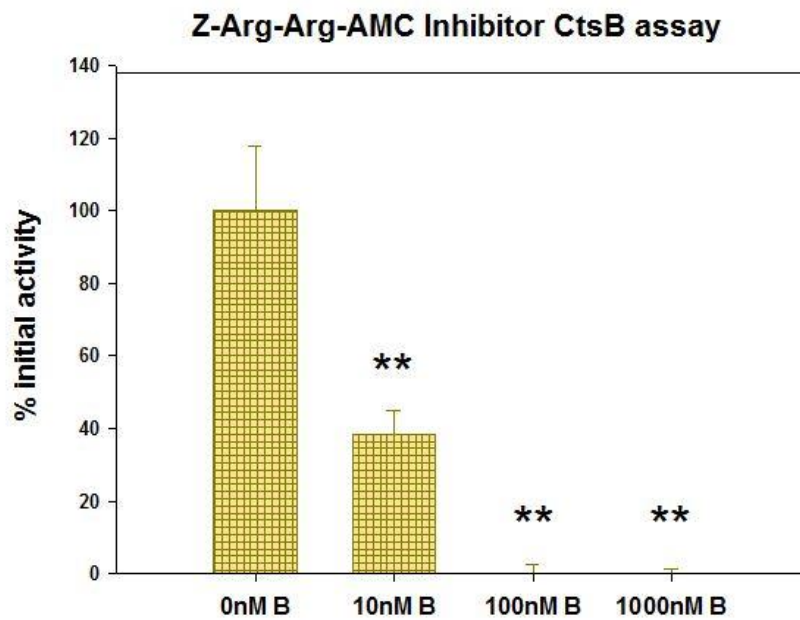


Figure 4. CtsB activity in hearts of MPS I mice. Specific CtsB substrate Z-Arg-Arg-AMC and specific CtsB inhibitor Ca-074-Me were used in the assay. Significant inhibition of CtsB was observed at the lowest inhibitor concentration ($p < 0.01$), in which the activity decreased from 100% with no inhibitor to 41% at 10nM. At higher concentrations, as 100nM and 1000nM, no activity was detectable. ** $p < 0.01$, ANOVA with Tukey post-hoc analysis.

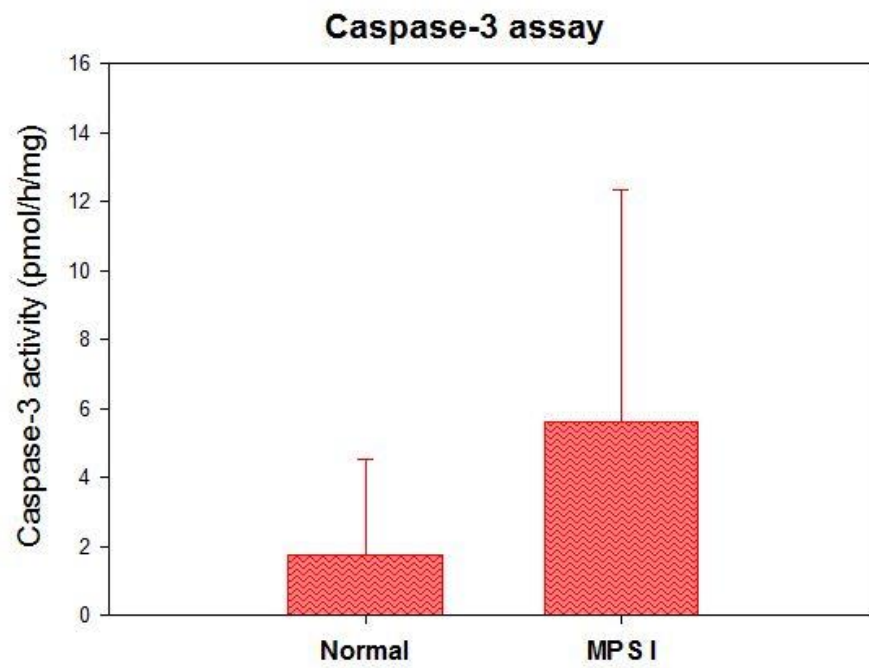


Figure 5. Caspase-3 activity in hearts of MPS I mice. Protein extracts were incubated with pH 7.5 HEPES buffer and AC-DEVD-AMC substrate at 37°C for 4h. Results showed no significant difference between the two groups (1.75 pmol/h/mg in normal vs 5.59 pmol/h/mg in MPS I).

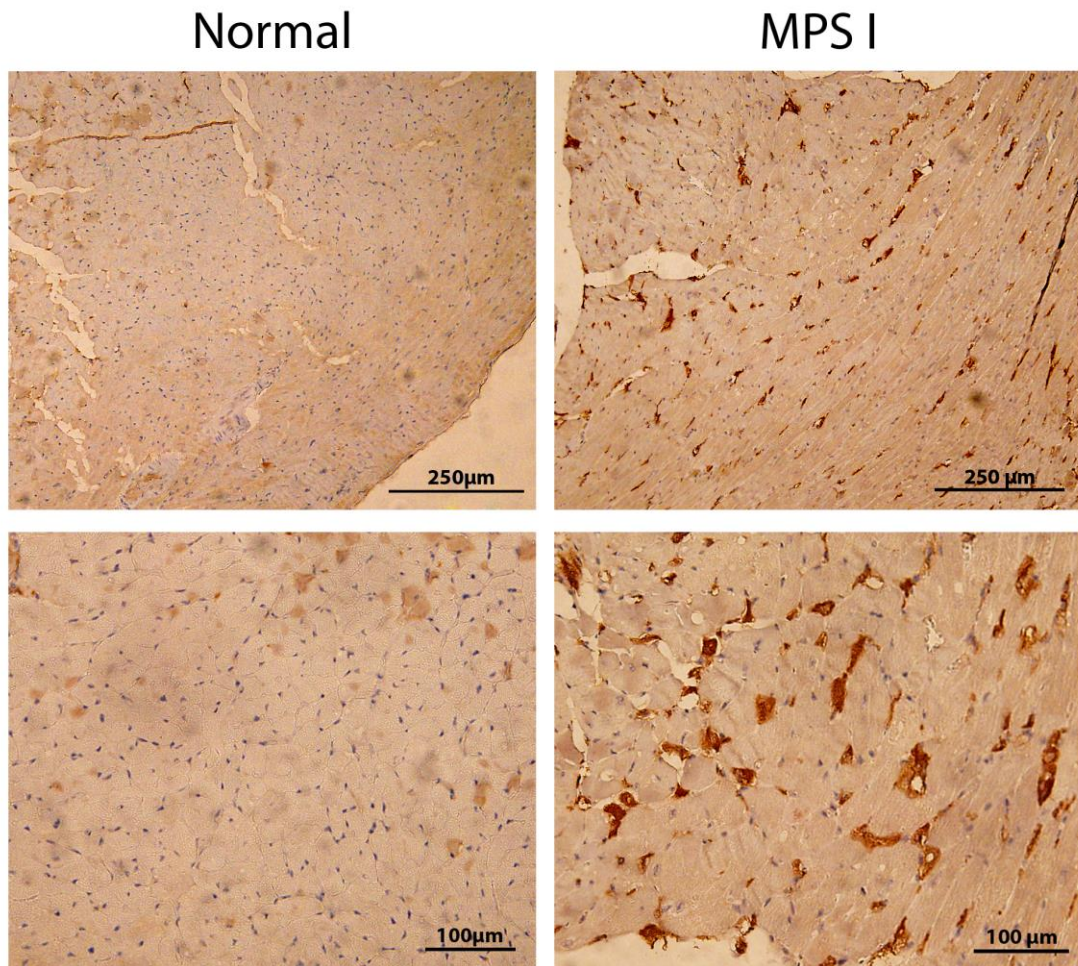


Figure 6. CD68+ immunohistochemistry of cardiac tissue from 8 month old MPS I and normal mice. Representative histological sections from cardiac tissue stained with haematoxylin and CD68+ antibody, which is a marker for macrophages. CD68+ cells are displayed in dark brown.

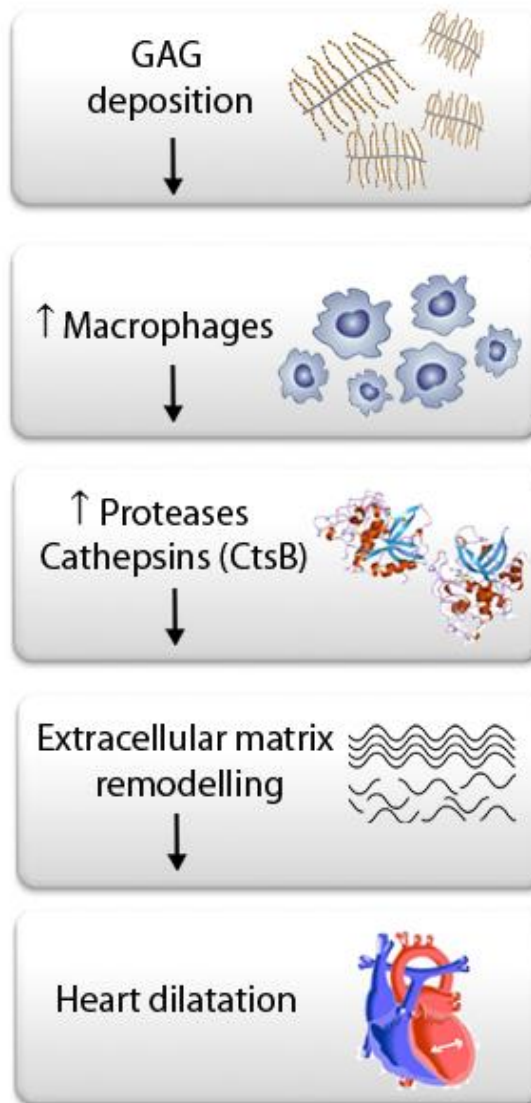


Figure 7. Hypothesis for heart dilation pathogenesis observed in MPS I.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

- Os camundongos com MPS I aos 8 meses de idade possuem atividade de catepsinas no tecido cardíaco cerca de 10 vezes superiores à atividade observada nos animais normais.

- O aumento na atividade observado na MPS I é majoritariamente devido à atividade de catepsina B, com pouca ou nenhuma contribuição das catepsinas K e S.

- A atividade aumentada de catepsina B no tecido cardíaco não foi capaz de ativar apoptose via caspase-3.

- A alta atividade de catepsina B observada nas amostras MPS I pode ser devido ao aumento do número de macrófagos no tecido, que é descrito como um dos tipos celulares com alta capacidade de secreção de catepsinas e demais proteases.

Estes resultados em conjunto sugerem um envolvimento das catepsinas na doença cardíaca de animais com MPS I, em especial a CtsB. Para comprovar a hipótese de que a CtsB possa ser responsável pela dilatação cardíaca na MPS I, estudos futuros buscarão avaliar o uso de inibidores de CtsB, sendo necessário analisar dose e regime ideais, além de avaliar os efeitos deste a longo prazo.

REFERÊNCIAS ADICIONAIS

- Aikawa, E., Aikawa, M., Libby, P., Figueiredo, J.L., Rusanescu, G., Iwamoto, Y., Fukuda, D., Kohler, R.H., Shi, G.P., Jaffer, F.A., *et al.* (2009). Arterial and aortic valve calcification abolished by elastolytic cathepsin S deficiency in chronic renal disease. *Circulation* *119*, 1785-1794.
- Aldenhoven, M., Boelens, J.J., and de Koning, T.J. (2008). The clinical outcome of Hurler syndrome after stem cell transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* *14*, 485-498.
- Baldo, G. (2012). Mucopolissacaridoses : mecanismos patogênicos e abordagens terapêuticas baseadas em terapia gênica e reposição enzimática. In Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica (Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul), pp. 287.
- Brooks, D.A., Kakavanos, R., and Hopwood, J.J. (2003). Significance of immune response to enzyme-replacement therapy for patients with a lysosomal storage disorder. *Trends in molecular medicine* *9*, 450-453.
- Da Tan, C., Hobbs, C., Sameni, M., Sloane, B.F., Stutts, M.J., and Tarran, R. (2014). Cathepsin B contributes to Na⁺ hyperabsorption in cystic fibrosis airway epithelial cultures. *The Journal of physiology*.
- Fesslova, V., Corti, P., Sersale, G., Rovelli, A., Russo, P., Mannarino, S., Butera, G., and Parini, R. (2009). The natural course and the impact of therapies of cardiac involvement in the mucopolysaccharidoses. *Cardiology in the young* *19*, 170-178.
- Giugliani, R., Rojas, V.M., Martins, A.M., Valadares, E.R., Clarke, J.T., Goes, J.E., Kakkis, E.D., Worden, M.A., Sidman, M., and Cox, G.F. (2009). A dose-optimization trial of laronidase (Aldurazyme) in patients with mucopolysaccharidosis I. *Molecular genetics and metabolism* *96*, 13-19.
- Gonzalez-Leal, I.J., Roger, B., Schwarz, A., Schirmeister, T., Reinheckel, T., Lutz, M.B., and Moll, H. (2014). Cathepsin B in Antigen-Presenting Cells Controls Mediators of the Th1 Immune Response during Leishmania major Infection. *PLoS neglected tropical diseases* *8*, e3194.
- Helske, S., Syvaranta, S., Lindstedt, K.A., Lappalainen, J., Oorni, K., Mayranpaa, M.I., Lommi, J., Turto, H., Werkkala, K., Kupari, M., *et al.* (2006). Increased expression of elastolytic cathepsins S, K, and V and their inhibitor cystatin C in stenotic aortic valves. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* *26*, 1791-1798.
- Mohamed, M.M., and Sloane, B.F. (2006). Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nature reviews Cancer* *6*, 764-775.
- Pastores, G.M., Arn, P., Beck, M., Clarke, J.T., Guffon, N., Kaplan, P., Muenzer, J., Norato, D.Y., Shapiro, E., Thomas, J., *et al.* (2007). The MPS I registry: design, methodology, and

early findings of a global disease registry for monitoring patients with Mucopolysaccharidosis Type I. *Molecular genetics and metabolism* 91, 37-47.

Prasad, V.K., and Kurtzberg, J. (2010). Transplant outcomes in mucopolysaccharidoses. *Seminars in hematology* 47, 59-69.

Premzl, A., Turk, V., and Kos, J. (2006). Intracellular proteolytic activity of cathepsin B is associated with capillary-like tube formation by endothelial cells in vitro. *Journal of cellular biochemistry* 97, 1230-1240.

Saftig, P., Hunziker, E., Wehmeyer, O., Jones, S., Boyde, A., Rommerskirch, W., Moritz, J.D., Schu, P., and von Figura, K. (1998). Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 13453-13458.

Schurigt, U., Hummel, K.M., Petrow, P.K., Gajda, M., Stockigt, R., Middel, P., Zwerina, J., Janik, T., Bernhardt, R., Schuler, S., *et al.* (2008). Cathepsin K deficiency partially inhibits, but does not prevent, bone destruction in human tumor necrosis factor-transgenic mice. *Arthritis and rheumatism* 58, 422-434.

Shi, G.P., Villadangos, J.A., Dranoff, G., Small, C., Gu, L., Haley, K.J., Riese, R., Ploegh, H.L., and Chapman, H.A. (1999). Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development. *Immunity* 10, 197-206.

Zerbini, C.A., and McClung, M.R. (2013). Olanacatib in postmenopausal women with low bone mineral density: a review of current clinical evidence. *Therapeutic advances in musculoskeletal disease* 5, 199-209.