

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E BIOMARCADORES
DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CAMUNDONGOS *Idua*^{-/-}, UM MODELO
GENÉTICO DE MUCOPOLISSACARIDOSE DO TIPO I

GUSTAVO KELLERMANN REOLON

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

Orientador: Prof. Dr. Rafael Roesler

PORTO ALEGRE
FEVEREIRO DE 2007

INSTITUIÇÕES

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Neurofarmacologia Celular e Molecular (Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde/Centro de Biotecnologia/UFRGS), no Laboratório de Imunogenética (Departamento de Genética, Instituto de Ciências Básicas da Saúde/UFRGS), no Laboratório de Fisiopatologia Experimental (Departamento de Medicina/Universidade do Extremo Sul Catarinense) e no Centro de Estudos em Estresse Oxidativo (Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde/ UFRGS).

FONTES FINANCIADORAS

Este estudo foi financiado pelo Instituto Milênio-Rede de Terapia Gênica (CNPq/Edital Institutos do Milênio-01/2005) e pelas agências: CAPES, CNPq, PROPESQ e FAPERGS.

Dedico este trabalho à minha família, que sempre esteve presente quando precisei, me auxiliando nas dificuldades e partilhando das alegrias nas conquistas.

Ao meu pai, minha mãe e minha irmã: sem os quais, nada disso teria sido possível.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Rafael Roesler, pelos valiosos ensinamentos que vou aproveitar durante toda minha carreira acadêmica. Por sempre acreditar na minha capacidade, me incentivando e permitindo que eu desenvolvesse este trabalho. Pelas palavras de conforto sempre convincentes quando necessárias.

À Professora Dra. Nance Nardi, pela oportunidade, acreditando e confiando na realização desse trabalho. Pelo grande exemplo científico e pessoal.

À Luisa Macedo Braga, pessoa incrível, que possibilitou a realização desse trabalho, pelo seu auxílio e amizade.

À Melissa Camassola, pelo auxílio na realização deste trabalho, pelas conversas sobre as possibilidades de continuação do mesmo, sempre que uma ideia surgia. Pela amizade e companheirismo.

À Tatiana Luft, pelos ensinamentos e auxílio na realização dos experimentos.

À Adalisa Reinke e Marcos Roberto de Oliveira, pelo enorme auxílio na realização dos experimentos de biomarcadores de estresse oxidativo.

Ao Professor Felipe Dal'Pizzol, pelo auxílio neste trabalho.

Ao Professor Guido, pelos ensinamentos e sugestões importantes.

À banca, pela disponibilidade e paciência.

Aos colegas Marianne, Débora, Caroline, Bruno, Thales, Natasha, Andréia, Daniela Cornélio, Daniela Lessa, Rodrigo e Luciana que fizeram do nosso laboratório um lugar agradável e prazeroso de trabalhar.

Aos demais amigos do Laboratório de Pesquisas em Câncer.

Aos amigos do Laboratório de Imunogenética, em especial à Flávia.

Aos amigos do Laboratório 210 e 212 da Biofísica, sem os quais o Campus do Vale não seria o mesmo.

À Silvia e ao Luciano, por toda ajuda e boa vontade, tornando a secretaria um local agradável.

À minha família, pelo auxílio em momentos cruciais e pela compreensão necessária para com um mestrando. Embora não compreendessem todo o meu trabalho, o apoiaram plenamente. Ao meu pai, pelos conselhos valiosos e auxílio na rotina. À minha mãe, pelas discussões filosóficas e científicas, pela ajuda na correção ortográfica e gramatical da dissertação. À minha irmã, pelo auxílio incondicional e ajuda na organização das referências bibliográficas desta dissertação.

A todos que contribuíram de alguma forma para este trabalho e não foram aqui citados, meus sinceros agradecimentos.

A todos os pesquisadores que contribuíram para os conhecimentos utilizados nesta dissertação.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	7
RESUMO	8
ABSTRACT	9
INTRODUÇÃO	10
OBJETIVOS	18
ARTIGO 1.....	19
ARTIGO 2.....	26
DISCUSSÃO	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
<i>CURRICULUM VITAE</i> RESUMIDO.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

EROs: Espécies reativas de oxigênio

ERNs: Espécies reativas de nitrogênio

GAGs: glicosaminoglicanos

GM2: gangliosídeo GM2

GM3: gangliosídeo GM3

GPx: glutationa peroxidase

IDUA: enzima α -L-iduronidase

LSD: doenças de acúmulo lisossomal

MDA: dialdeído malônico

MLD: leucodistrofia metacromática

MPS: mucopolissacaridoses

nNOS: óxido nítrico sintetasa

NPC: Niemann-Pick do tipo C

SNC: sistema nervoso central

SOD: superóxido dismutase

TBARS: espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

RESUMO

Mucopolissacaridose do tipo I (MPS I) é uma doença de acúmulo lisossomal que leva a neurodegeneração e déficits neurológicos, entre outras consequências patológicas e clínicas. A ausência de estudos sobre parâmetros neurocomportamentais do modelo murino de MPS I capazes de avaliar sua função cognitiva motivou a realização deste trabalho. O primeiro nosso objetivo foi analisar parâmetros cognitivos que possam ser utilizados na avaliação de diferentes terapias e seus efeitos sobre o SNC. Durante a exploração do campo aberto, camundongos MPS I (*Idua*^{-/-}) adultos mostraram locomoção e ansiedade normais, mas reduzido número de *rearings*. Camundongos *Idua*^{-/-} tiveram uma performance normal no reconhecimento de objeto novo e mostraram memória de curta duração de esQUIVA inibitória normal. Entretanto a memória de longa duração de esQUIVA inibitória estava prejudicada. O déficit observado na esQUIVA inibitória não pode ser atribuído a redução na reatividade ao choque. Os resultados indicam que camundongos *Idua*^{-/-} apresentam um déficit na memória de longa duração para treinamento aversivo e comportamento exploratório. O segundo objetivo foi avaliar biomarcadores de estresse oxidativo neste modelo animal. Nós avaliamos atividade enzimática antioxidante, dano a proteínas e peroxidação lipídica no telencéfalo, cerebelo, coração, pulmão, diafragma, fígado, rim, e baço. De oito órgãos analisados, sete tiveram alteração em no mínimo um parâmetro. Os resultados indicam que camundongos *Idua*^{-/-} podem estar sofrendo estresse oxidativo.

ABSTRACT

Mucopolysaccharidosis type I (MPS I) is a lysosomal storage disease that leads to neurodegeneration and neurological deficits, among other pathological and clinical consequences. The absence of behavioral parameters from the MPS I mouse model motivated the accomplishment of this work. Our first objective was to analyze behavioral parameters that might be used to essay the effect of different therapies on the CNS. During exploration of an open field, adult MPS I (*Idua*^{-/-}) mice showed normal locomotion and anxiety, but reduced number of rearings. *Idua*^{-/-} mice performed normally in a novel object recognition memory task and showed normal short-term retention of inhibitory avoidance training. By contrast, long-term retention of inhibitory avoidance was impaired. The deficit in inhibitory avoidance memory could not be attributed to reduced footshock reactivity. The results indicate that *Idua*^{-/-} mice present deficits in long-term memory for aversive training and reduced exploratory behavior. The second aim was to evaluate oxidative biomarkers on this mice model. We evaluated antioxidant enzymatic activity, protein damage and lipid peroxidation on forebrain, cerebellum, heart, lung, diaphragm, liver, kidney and spleen. From eight analyzed organs, seven had alteration on at least one parameter. The results indicate that *Idua*^{-/-} mice can be under oxidative stress.

INTRODUÇÃO

As Doenças de Acúmulo Lisossomal (LSD) são causadas por defeitos na atividade de proteínas lisossomais, resultando no acúmulo de metabólitos não degradados dentro do lisossomo. Esse acúmulo causa alterações nas células, nos tecidos e nos órgãos (NEUFELD & MUENZER, 2001).

Os lisossomos contêm cerca de 50 a 60 hidrolases (JOURNET *et al.*, 2002) e, no mínimo, sete proteínas transmembranas (ESKELINEN *et al.*, 2003). Teoricamente, mutações em qualquer gene codificante dessas proteínas podem causar LSD. Até o momento, são conhecidas mais de 40 LSD envolvendo defeitos em hidrolases.

As LSD são normalmente monogênicas e podem existir no fenótipo classificado como infantil, juvenil ou adulto. O fenótipo mais grave, o infantil, apresenta dano ao Sistema Nervoso Central (SNC) nos primeiros anos de vida e morte na primeira década. O fenótipo adulto tem seus sinais mais brandos, havendo pouco ou nenhum dano ao SNC e as lesões periféricas são as principais modificações - aumento do fígado e baço (hepatoesplenomegalia), anormalidades esqueléticas e danos ao coração e ao rim. O fenótipo juvenil apresenta alterações intermediárias entre o infantil e o adulto (FUTERMAN & VAN MEER, 2004).

Uma questão importante a ser respondida sobre as LSD é quanto às rotas bioquímicas e celulares que causam a fisiopatologia da doença. O acúmulo de metabólitos leva a disfunções na célula: o compartimento lisossomal cresce em

tamanho e número na tentativa de armazenar o aumento progressivo da concentração dos metabólitos. Contudo, a interpretação dessa disfunção celular não explicaria toda a complexidade da doença (JEYAKUMAR *et al.*, 2005). O acúmulo de substratos no lisossomo é a causa primária do dano, entretanto, devido à extensa sintomatologia observada, supõe-se que haja rotas de danos secundários e/ou terciários (FUTERMAN & VAN MEER, 2004).

As LSD são classificadas de acordo com o substrato acumulado. As mucopolissacaridoses (MPS) acumulam glicosaminoglicanos (GAGs), antigamente denominados mucopolissacarídeos. Os glicosaminoglicanos são polissacarídeos lineares de cadeia longa. Existem quatro tipos de GAGs: dermatan sulfato, heparan sulfato, keratan sulfato e condroitin sulfato; sendo que todos podem ser acumulados nas MPS. Esses polissacarídeos integram macromoléculas da matriz extracelular, dos fluidos articulares e do tecido conjuntivo do corpo humano, podendo também constituir a superfície celular (BERNFELD *et al.*, 1999; IOZZO, 2001). Entre as funções normais dessas moléculas, estão a sinalização na junção neuromuscular (WALLACE, 1989; HOCH, 1999), a formação da cartilagem e da junção neuromuscular (ARIKAWA-HIRASAWA *et al.*, 2001; ARIKAWA-HIRASAWA & YAMADA, 2001), a manutenção da retina (SERTIE *et al.*, 2000) e da integridade do glomérulo (GROFFEN *et al.*, 1999).

Existem seis diferentes MPS classificadas numericamente como I, II, III, IV, VI e VII. São causadas pelo déficit de onze enzimas necessárias para a degradação sequencial dos GAGs. Essas enzimas incluem exoglicosidades, sulfatases e uma transferase (FUTERMAN & VAN MEER, 2004).

O fenótipo dos pacientes afetados e o tipo de GAG acumulado variam dependendo da enzima afetada e de sua atividade residual. Em geral, todos os portadores da doença apresentam um quadro progressivo com envolvimento de múltiplos órgãos e alterações faciais. As MPS são doenças autossômicas recessivas, com exceção da MPS II, que é ligada ao cromossomo X.

A MPS I é causada pela deficiência da enzima α -L-iduronidase, necessária para a quebra de dermatan sulfato e heparan sulfato. Essa enzima é uma exoglicosidase, hidrolisando resíduos de ácido α -L-idurônico na porção terminal de heparan e keratan sulfato. Esse é o primeiro passo na rota normal de degradação dos GAGs mencionados acima.

O heparan sulfato está presente no cérebro, no tecido conjuntivo, no córtex ósseo, na placa de crescimento ósseo, no coração, nos cabelos, no fígado e no rim. O dermatan sulfato é encontrado no córtex e na placa de crescimento ósseo. Esses dois polissacarídeos estão presentes em praticamente todos os tecidos do corpo humano. Dessa forma, a MPS I apresenta um número grande de tecidos afetados.

A deficiência de α -L-iduronidase pode resultar num espectro amplo da doença, havendo três subtipos: Hurler, o fenótipo infantil; Scheie, o fenótipo adulto, e um intermediário, Hurler-Scheie. Outros fenótipos que não se enquadram nos três subtipos podem ocorrer. O diagnóstico da MPS I é confirmado por um nível baixo ou indetectável da enzima nos leucócitos ou nos fibroblastos da pele e por uma concentração alta de fragmentos de GAGs na urina.

Os pacientes com síndrome de Hurler são normais ao nascimento, desenvolvendo os sintomas da patologia mais tarde. O diagnóstico da doença é geralmente feito entre seis e 24 meses e as anormalidades incluem atraso no crescimento, problemas cardíacos, alterações faciais e esqueléticas, perda de visão e audição, aumento de excreção de GAGs na urina, problemas articulares, organomegalias e comprometimento do SNC com retardo mental grave (NEUFELD & MUENZER, 2001). A morte dos pacientes ocorre entre oito e 10 anos devido a problemas cardíacos e/ou respiratórios.

A forma mais branda da MPS I, a síndrome de Scheie, apresenta opacificação da córnea, problemas articulares e valvulopatias. A inteligência e estatura são normais. O diagnóstico da doença é geralmente feito entre 10 e 20 anos de idade, sendo normal a expectativa de vida.

A síndrome de Hurler-Scheie apresenta um fenótipo intermediário com envolvimento de múltiplos órgãos, disostose múltipla e pouca ou nenhuma disfunção intelectual. O diagnóstico é normalmente feito entre três e oito anos. Geralmente, os pacientes sobrevivem até a idade adulta.

A α -L-iduronidase, assim como outras hidrolases afetadas nas LSD, é direcionada do complexo de Golgi para o lisossomo através da marcação com resíduos de manose-6-fosfato. Esses resíduos são reconhecidos por receptores de manose-6-fosfato e internalizados no lisossomo (MYEROWITZ & NEUFELD, 1981). Como esses receptores também se encontram na membrana plasmática, hidrolases marcadas podem “escapar” de células produtoras dessas enzimas e serem internalizadas por células que não apresentam hidrolases funcionais, permitindo que células deficientes recebam

as enzimas e diminuem o acúmulo lisossomal. Esse é o princípio utilizado nas terapias de reposição enzimática e gênica para tratamento das LSD.

As terapêuticas aprovadas para MPS I são a terapia de reposição enzimática e o transplante de medula óssea. Na terapia de reposição enzimática, existe a possibilidade de utilizar enzimas modificadas com melhor captação pelas células, maior atividade e/ou melhor estabilidade para maximizar sua eficácia. A principal vantagem do transplante de medula óssea é a produção da enzima pelas células do Sistema Imunológico transplantado.

Nas LSD, a correção do dano ao SNC é o maior desafio e continua sem solução. Não existe tratamento eficaz para a lesão cerebral em pacientes portadores de LSD (JEYAKUMAR *et al.*, 2005); e, infelizmente, a maioria dessas doenças afeta o SNC (WRAITH, 2004). As hidrolases não atravessam a barreira hematoencefálica. Dessa forma, as terapias de reposição enzimática e gênica não atingem o SNC, exceto em caso de administração direta. No transplante de medula óssea, a enzima chega ao SNC através de macrófagos que cruzam a barreira hematoencefálica (NEUMANN, 2006). Entretanto, problemas como a incompatibilidade doador-receptor dificultam o uso rotineiro dessa terapia.

Na MPS I, é desconhecida a etiologia da neurodegeneração. Nos modelos de MPS I, foram observadas alterações morfológicas neuronais (DEKABAN & CONSTANTOPOULOS, 1977; WALKLEY *et al.*, 1988). Contudo, sua influência na patologia não foi estabelecida. O acúmulo cerebral de gangliosídeo GM2 e gangliosídeo GM3 (GM2 e GM3, respectivamente) está associado à neuropatologia de diversas doenças, alterando o reconhecimento

celular na sinaptogênese e promovendo a apoptose celular (WALKLEY *et al.*, 1991). Na MPS I, o acúmulo desses gangliosídeos é um marcador do processo neurodegenerativo (CONSTANTOPOULOS *et al.*, 1980; CONSTANTOPOULOS *et al.*, 1985; RUSSELL *et al.*, 1998), aumentando quantitativamente conforme a progressão e a gravidade da doença.

Nas LSD, a morte neuronal geralmente ocorre nos estágios finais e não explica *per se* o comprometimento do SNC. Nos estágios iniciais da doença, a morte das células de Purkinje do cerebelo constitui uma exceção (JEYAKUMAR *et al.*, 2005) e foi observada nas doenças de Niemann-Pick do tipo C (NPC) (WALKLEY, 2004), de Sandhoff (WADA *et al.*, 2000) de Gaucher e MPS I (RUSSELL *et al.*, 1998) E. Neufeld (comunicação pessoal).

Os glicosaminoglicanos influenciam a formação de placas senis e estão envolvidos na patogênese da doença de Alzheimer (BAHR & BENDISKE, 2002; VAN HORSSSEN *et al.*, 2003). Em um estudo *post mortem*, GINSBERG *et al.* (1999) avaliaram a existência de placas senis em pacientes portadores de MPS I. Embora os achados tenham sido negativos, verificou-se um aumento na concentração do peptídeo beta-amilóide solúvel no citosol dos neurônios. Esse peptídeo é considerado central na etiologia da doença de Alzheimer, existindo a possibilidade de ser uma rota secundária de dano cerebral na MPS I.

O desequilíbrio na homeostase do cálcio está associado à neuropatologia de algumas LSD, como a doença de Gaucher, a doença de Sandhoff (PELLED *et al.*, 2003) e a mucopolidose do tipo IV (LAPLANTE *et al.*, 2002). Possivelmente, a ausência de equilíbrio do cálcio no SNC seja um dos

fatores contribuintes para a neuropatologia das MPS. Contudo, até o presente momento, nenhum estudo foi realizado enfocando essa instabilidade na MPS I.

Considerável atenção tem sido dada à inflamação no SNC e ao seu papel na neurodegeneração nas LSD. O processo inflamatório cerebral já foi encontrado em diferentes LSD: nas gangliosidoses GM3 (WADA *et al.*, 2000; MYEROWITZ *et al.*, 2002; JEYAKUMAR *et al.*, 2003) e GM2 (JEYAKUMAR *et al.*, 2003), na doença de NPC (BAUDRY *et al.*, 2003), na doença de Krabe (PEDCHENKO & LEVINE, 1999) e nas MPS do tipo I e III (OHMI *et al.*, 2003).

O processo inflamatório é mediado pelas células do Sistema Imunológico. Essas células apresentam um sistema lisossomal bem desenvolvido, estando frequentemente afetadas nas LSD (AULA *et al.*, 1975; BRUCK *et al.*, 1991; KIESEIER *et al.*, 1997). JEYAKUMAR *et al.* (2005) propuseram ser a liberação de radicais livres e citocinas decorrente da disfunção das células da microglia uma das causas do dano cerebral presente nessas doenças. Tratamentos com antioxidantes abrandaram a sintomatologia de algumas LSD (BASCUNAN-CASTILLO *et al.*, 2004), sugerindo uma influência do desequilíbrio oxidativo nessas patologias.

O estudo das LSD obteve um grande avanço devido ao uso de modelos animais (NEUFELD & MUENZER, 2001). No nosso estudo, utilizou-se o modelo de OHMI *et al.* (2003), que inativaram o gene da α -L-iduronidase (*Idua*) pela inserção do gene de resistência à canamicina. Os animais homozigotos para a disrupção do gene (animais *Idua*^{-/-}) não possuem atividade alguma da referida enzima, tornando-os o modelo murino da síndrome de Hurler. Esses

camundongos apresentam fenótipo similar ao do modelo desenvolvido por CLARKE *et al.* (1997).

O modelo murino da MPS I desenvolvido por CLARKE *et al.* (1997) exhibe fenótipo normal ao nascimento e aparecimento gradual das alterações características da patologia. Com quatro semanas de vida, os machos *knockout* (animais *Idua*^{-/-}) podem ser diferenciados dos controles pelas alterações faciais e vertebrais. Modificações histológicas na tíbia são observadas com seis semanas de idade e, com oito semanas, os animais mostram patas alteradas. As alterações faciais progridem lentamente, exibindo fenótipo bem distinguível às 16 semanas de idade. Animais jovens locomovem-se normalmente, entretanto, os animais *knockout* são praticamente incapazes de locomover-se às 40 semanas. Na idade de 57 semanas, observa-se a disostose múltipla, fenótipo similar ao dos pacientes portadores da síndrome de Hurler.

No SNC dos animais *Idua*^{-/-}, há aumento gradual da concentração de GM2 e GM3. Ocorre também morte progressiva das células de Purkinje, com depleção total na idade de 40 semanas. Durante toda a vida desses animais, observa-se aumento da excreção de GAGs.

Os animais *knockout* atingem a idade adulta e sua sobrevivência ultrapassa as 85 semanas. Essa diferença em relação aos pacientes com síndrome de Hurler, cuja morte ocorre na infância, pode ser devida a diversidades entre espécies com relação ao acúmulo dos GAGs, aos efeitos secundários desses acúmulos ou à necessidade temporal para manifestação dos sintomas.

OBJETIVOS

A inexistência de estudos sobre parâmetros neurocomportamentais do modelo murino de MPS I capazes de avaliar sua função cognitiva motivou a realização deste trabalho. O nosso objetivo foi analisar parâmetros cognitivos que possam ser utilizados na avaliação de diferentes terapias e seus efeitos sobre o SNC.

Evidências do envolvimento de processo inflamatório e estresse oxidativo levaram-nos a avaliar diferentes biomarcadores de estresse oxidativo no SNC, coração, pulmão, diafragma, fígado, rim e baço do modelo murino de MPS I.

ARTIGO 1

Artigo publicado na revista Brain Research:

REOLON, G. K.; BRAGA, L. M.; CAMASSOLA, M.; LUFT, T.; HENRIQUES, J. A.; NARDI, N. B. & ROESLER, R. Long-term memory for aversive training is impaired in *Idua(-/-)* mice, a genetic model of mucopolysaccharidosis type I. *Brain Research*, 1076(1): 225-230, 2006.

available at www.sciencedirect.comwww.elsevier.com/locate/brainres

**BRAIN
RESEARCH**

Research Report

Long-term memory for aversive training is impaired in *Idua*^{-/-} mice, a genetic model of mucopolysaccharidosis type I

Gustavo Kellermann Reolon^{a,b}, Luisa Macedo Braga^c, Melissa Camassola^c, Tatiana Luft^a, João Antônio Pêgas Henriques^{b,d}, Nance Beyer Nardi^c, Rafael Roesler^{a,b,*}

^aCellular and Molecular Pharmacology Research Group, Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, 90046-900 Porto Alegre, RS, Brazil

^bGraduate Program in Cellular and Molecular Biology, Center for Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

^cImmunogenetics Laboratory, Department of Genetics, Institute for Biosciences, Federal University of Rio Grande do Sul, 91540-000 Porto Alegre, RS, Brazil

^dSchool of Pharmacy, Lutheran University of Brazil, 92420-280 Canoas, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 3 January 2006

Available online 13 February 2006

Keywords:

Mucopolysaccharidosis type I

Lysosomal storage disease

MPS mouse model

Neural plasticity

Memory

Behavior

ABSTRACT

Mucopolysaccharidosis type I (MPS I) is a lysosomal storage disease that leads to neurodegeneration and neurological deficits, among other pathological and clinical consequences. The aim of the present study was to evaluate neurobehavioral parameters in a genetic mouse model of mucopolysaccharidosis type I (MPS I). During exploration of an open field, adult MPS I (*Idua*^{-/-}) mice showed normal locomotion and anxiety but reduced number of rearings. *Idua*^{-/-} mice performed normally in a novel object recognition memory task and showed normal short-term retention of inhibitory avoidance training. By contrast, long-term retention of inhibitory avoidance was impaired in *Idua*^{-/-} mice. The deficit in inhibitory avoidance memory could not be attributed to reduced footshock reactivity. The results indicate that *Idua*^{-/-} mice present deficits in long-term memory for aversive training and reduced exploratory behavior.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Mucopolysaccharidosis type I (MPS I) is a heritable lysosomal storage disease resulting from a deficiency of alpha-L-iduronidase, the enzyme required for degradation of glycosaminoglycans (GAGs) dermatan sulfate and heparin sulfate. In affected children, mutations in the *IDUA* gene lead to GAG accumulation in lysosomes, tissue pathology, and severe clinical features including growth delay, altered facial features, skeletal abnormalities, hepatosplenomegaly, and cen-

tral nervous system (CNS) deficits (Scriver, 2001). Neurodegeneration, severe mental retardation and death in childhood are seen in the most severe phenotype of MPS I, Hurler syndrome, which results from homozygosity for some mutations in the *IDUA* gene (Scott et al., 1995; Scriver, 2001).

The availability of a genetic mouse model of MPS I (*Idua*^{-/-}) makes it possible to investigate the neurological deficits associated with MPS I (Clarke et al., 1997; Ohmi et al., 2003; Hartung et al., 2004). A previous study has suggested that *Idua*^{-/-} mice show impaired memory assessed in an open field

* Corresponding author. Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500, Campus Central/UFRGS, 90046-900 Porto Alegre, RS, Brazil. Fax: +55 51 3316 3121.

E-mail address: roesler@terra.com.br (R. Roesler).

habituation paradigm (Hartung et al., 2004). In addition, cognitive deficits have been observed in mouse models of other types of lysosomal storage disease. For instance, MPS VII show impaired spatial memory (Chang et al., 1993; Frisella et al., 2001). However, a detailed behavioral analysis of *Idua*^{-/-} mice has not been previously reported. In the present study, we investigated open field behavior, memory for aversive training, and recognition memory in *Idua*^{-/-} mice. Developmental and metabolic features of *Idua*^{-/-} mice have been described elsewhere (Hartung et al., 2004).

2. Results

2.1. Open field behavior

Results for open field behavior are shown in Fig. 1. There were no significant differences between groups in the latency to start locomotion ($P = 0.93$; Fig. 1A), number of crossings performed ($P = 0.24$; Fig. 1B), or defecation ($P = 0.43$; Fig. 1D) indicating that *Idua*^{-/-} mice showed no alterations in locomotion or anxiety. However, *Idua*^{-/-} mice showed a significantly lower number of rearings, which indicates reduced exploratory behavior, compared to control animals ($P < 0.05$; Fig. 1C).

2.2. Novel object recognition

In the recognition memory task, there was no difference between groups in the total time spent exploring both objects during the training trial, indicating that both groups showed similar locomotion and motivation during task acquisition. Mean \pm SE total exploration time (s) was 14.00 ± 3.12 s in control mice and 13.10 ± 1.98 s in *Idua*^{-/-} animals ($P = 0.81$). In addition, there was no significant difference between groups in exploratory preference in the training trial ($P = 0.71$) (Fig. 2A). There were no significant differences between groups in short ($P = 0.55$;

Fig. 2B)- or long-term ($P = 0.66$; Fig. 2C) memory retention of the object recognition task. Both groups showed significant preference towards the novel object during both the short- and long-term retention test trials (both P s < 0.01 in the short-term retention test trial and both P s < 0.05 in the long-term retention test trial). These findings indicate that *Idua*^{-/-} mice showed no alterations in novel object recognition memory.

2.3. Inhibitory avoidance

Results for inhibitory avoidance are shown in Fig. 3. There were no significant differences between groups in training trial performances ($P = 0.75$; mean \pm SE overall training trial step-down latencies was 9.04 ± 4.01 s). There was no significant difference between groups in short-term inhibitory avoidance retention ($P = 0.96$) (Fig. 3A). However, *Idua*^{-/-} mice showed impaired long-term retention when compared to the control group ($P < 0.01$) (Fig. 3B). These results indicate that *Idua*^{-/-} mice showed impaired long-term memory for inhibitory avoidance training.

2.4. Footshock reactivity

There was no significant difference between groups in reactivity to the footshock assessed by flinch (Fig. 4A) and jump (Fig. 4B) thresholds (P s = 1.00 and 0.11 for flinch and jump thresholds respectively), indicating that *Idua*^{-/-} mice showed no alterations in nociception.

3. Discussion

The main result of the present study is that *Idua*^{-/-} mice, a mouse model of MPS I, showed impaired long-term memory of inhibitory avoidance, a type of single-trial aversively motivated conditioning, whereas no alterations were observed in

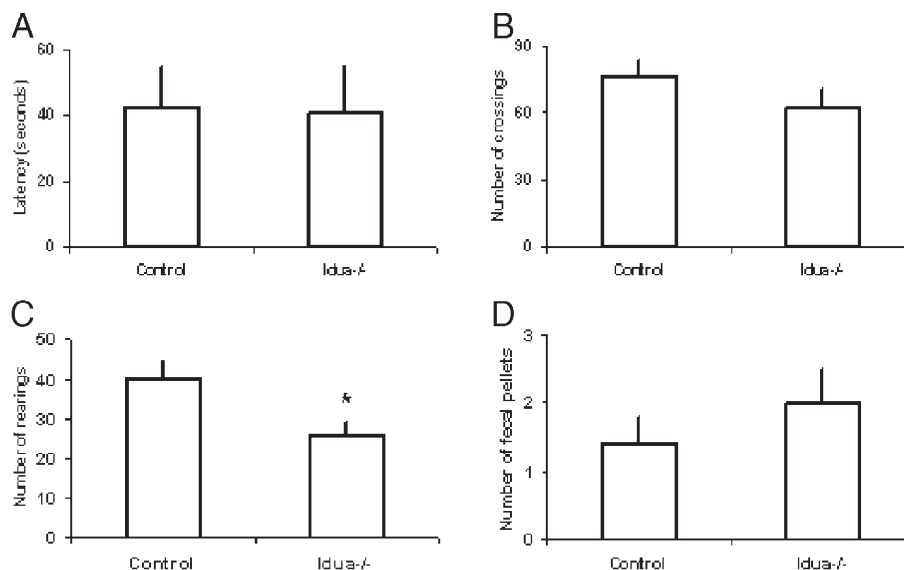


Fig. 1 – Open field behavior in *Idua*^{-/-} and control mice. Animals were left to freely explore the arena for 5 min. Data are mean \pm SE (A) latency to start locomotion (s), (B) number of crossings, (C) number of rearings, and (D) number of fecal pellets. $N = 9$ animals in the control group and 11 animals in the *Idua*^{-/-} group. *Significant difference from the control group ($P < 0.05$).

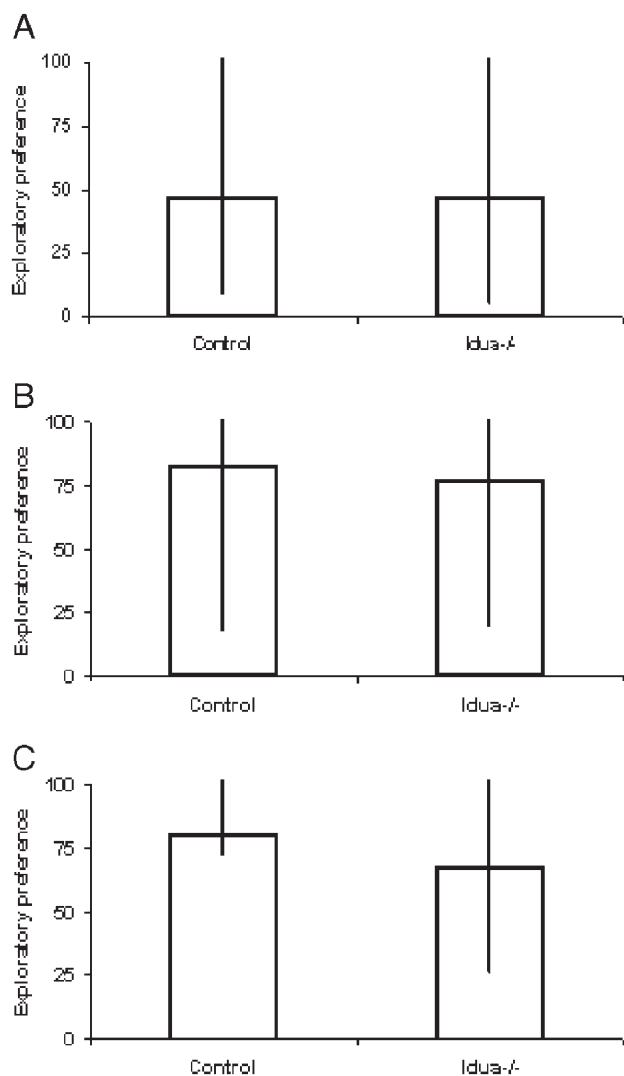


Fig. 2 – Novel object recognition memory in *Idua*^{-/-} and control mice. Memory retention was tested at 1.5 h (short-term memory retention) or 24 h (long-term memory retention) after training. Data are median (interquartile ranges) exploratory preferences during the (A) training, (B) short-term retention test, or (C) long-term retention test trials. Exploratory preference was defined as % time exploring object A2 during training or % time exploring the novel objects B and C during short- and long-term retention test trials). *N* = 9 animals in the control group and 11 animals in the *Idua*^{-/-} group. There was no significant difference between groups.

short-term inhibitory avoidance retention or novel object recognition memory. In addition, *Idua*^{-/-} animals showed normal locomotion and anxiety but reduced exploratory behavior assessed during exploration of an open field. Because *Idua*^{-/-} mice showed normal short-term retention of inhibitory avoidance and no alterations in footshock reactivity, the deficit in long-term inhibitory avoidance memory could not be attributed to alterations in nociception or other sensorimotor functions.

The clinical manifestations of MPS I include a range of neurological deficits. Severe mental retardation, neurodegen-

eration, and death in childhood are observed in Hurler syndrome, the most severe form of MPS I (Scott et al., 1995). Other types of MPS (for instance, MPS IIIB) are also associated with severe CNS dysfunction and neurodegeneration (Scott et al., 1995; Scriver, 2001). *Idua*^{-/-} mice provide a mouse model of MPS I that makes it possible to characterize functional deficits in different rodent models of neurological function and evaluate the potential protective effects of experimental therapeutic approaches against the neurological deficits associated with MPS I (Clarke et al., 1997; Ohmi et al., 2003; Hartung et al., 2004).

A previous study (Hartung et al., 2004) has described several abnormalities in *Idua*^{-/-} mice, including higher levels of urinary GAG and GAG lysosomal storage, increased body weight, and craniofacial abnormalities. The only measure of neurological function investigated in that study was habituation, a type of nonaversive, nonassociative memory (Vianna et al., 2000), in which *Idua*^{-/-} mice showed impaired performance when compared to controls. In contrast, our findings indicate that *Idua*^{-/-} mice showed impaired memory for aversively motivated training, whereas memory for a non-aversive task was normal. The mechanisms underlying the differential ability of *Idua*^{-/-} mice to learn memories for different types of tasks remain to be determined. Formation of long-term memory for aversively motivated memory tasks such as inhibitory avoidance is importantly influenced by the release of hormones and neurotransmitters associated with

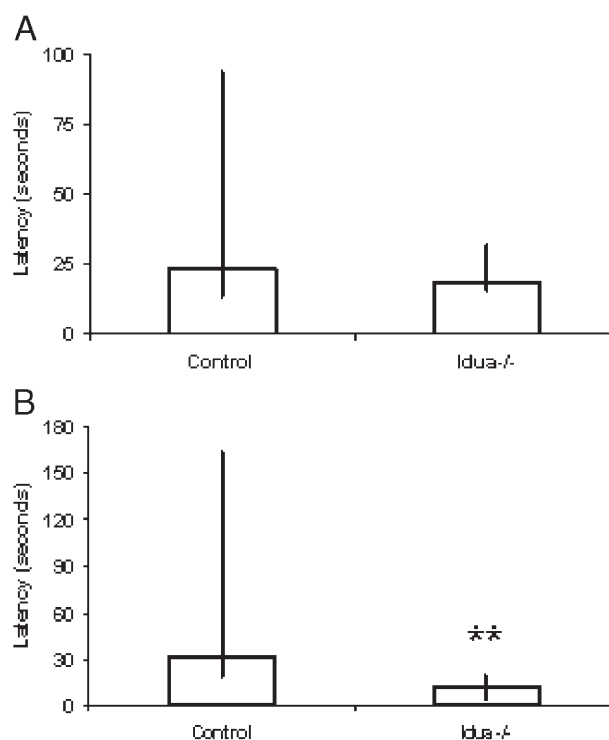


Fig. 3 – Memory for inhibitory avoidance training in *Idua*^{-/-} and control mice. Memory retention was tested at (A) 1.5 h (short-term memory retention) or (B) 24 h (long-term memory retention) after training. Data are median (interquartile ranges) retention test latencies to step-down. *N* = 8 animals per group. **Significant difference from the control group (*P* < 0.01).

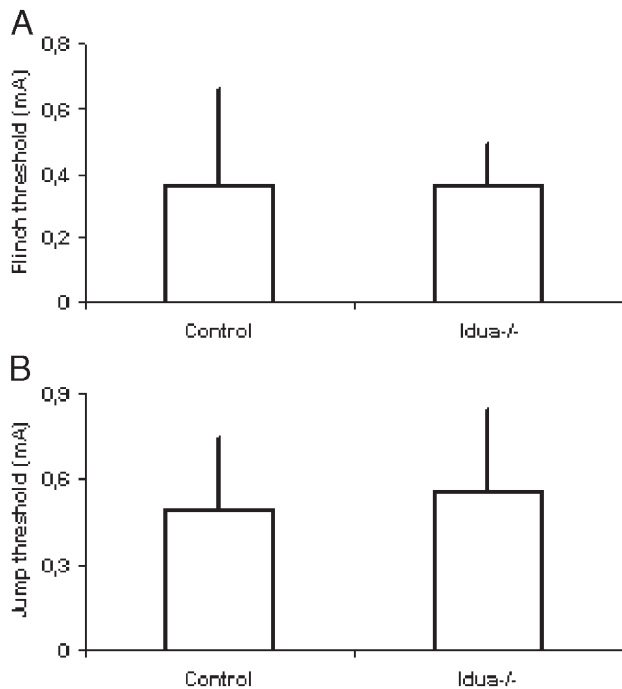


Fig. 4 – Footshock reactivity in *Idua*^{-/-} and control mice. Data are means \pm SE (A) flinch and (B) jump thresholds (mA). *N* = 7 animals per group. There was no significant difference between groups.

exposure to emotional events, and the basolateral amygdala is a critical brain area mediating these modulatory influences on long-term memory consolidation (for a review, see McGaugh (2000)). Thus, it is possible that alterations in hormonal responses to stressful events and/or changes in amygdala function are involved in the selective impairment of long-term aversive memory in *Idua*^{-/-} mice observed in the present study. Memory function has also been investigated in other mouse models of lysosomal storage diseases. Thus, MPS VII mice show impaired spatial memory assessed either in the Morris water maze (Chang et al., 1993; Frisella et al., 2001) or in a reward learning protocol (Brooks et al., 2002). In a mouse model of Niemann-Pick type C disease, knockout animals showed reduced exploratory behavior and impairments of spatial memory and habituation (Vöikar et al., 2002). Evaluating memory function in a mouse model of metachromatic leukodystrophy (MLD), Consiglio et al. (2001) observed that MLD mice showed impaired memory in a radial arm maze task and a nonsignificant reduction in performance in inhibitory avoidance and active avoidance tasks. Our finding that *Idua*^{-/-} mice show impaired long-term inhibitory avoidance memory indicates that aversively motivated mouse models of learning and memory can be used for the characterization of neurological deficits associated with those diseases as well as for the evaluation of the effects of potential novel therapeutics.

Further research is necessary to investigate the neurochemical and neuropathological alterations mediating the selective dysfunction of long-term aversive memory in *Idua*^{-/-} mice observed in the present study. Although both short- and long-term memory for inhibitory avoidance depend on the

functional integrity of the dorsal hippocampus (Izquierdo and Medina, 1997; McGaugh, 2000; Roesler et al., 2003; Quevedo et al., 2004), formation of these types of memory is mediated by different neurochemical mechanisms. For instance, consolidation of long- but not short-term memory for inhibitory avoidance is disrupted by intrahippocampal administration of a protein synthesis inhibitor (Quevedo et al., 2004). Previous studies have indicated that the cognitive deficits associated with mouse models of heritable lysosomal storage diseases are at least partially mediated by dysfunction of hippocampal neurons. Thus, MLD mice show selective degeneration of pyramidal cells in the dorsal hippocampus, and in vivo gene therapy using lentiviral vectors protects against both the degeneration of hippocampal neurons and memory deficits in that model (Consiglio et al., 2001). An inflammatory component associated with microglia activation in cortical areas is also likely to mediate cognitive deficits in the *Idua*^{-/-} MPS I mouse model (Ohmi et al., 2003). Further studies aiming at examine alterations in synaptic transmission and cellular signaling pathways at the hippocampus and other brain areas in animal models as well as patients are necessary to increase our understanding of the mechanisms underlying cognitive deficits associated with lysosomal storage diseases.

In summary, our results show a specific impairment of aversively motivated memory and reduced exploratory behavior in *Idua*^{-/-} mice, a genetic model of MPS I. Future studies could use aversive memory tasks to evaluate the potential protective effect of experimental therapeutic approaches against cognitive deficits in mouse models of MPS.

4. Experimental procedures

4.1. Animals

Eighteen adult male C57-BL6 *Idua*^{-/-} mice (153–208 days of age and mean body weight of 26.68 g at the date of first experiment) were used as experimental subjects. It has been previously shown that *Idua*^{-/-} mice with 5 months of age show lysosomal storage in a number of tissues, increased urinary GAG levels, craniofacial abnormalities, increased body weight, and impaired habituation (Hartung et al., 2004). Sixteen adult male wild-type C57-BL6 inbred mice (155–202 days of age and mean body weight of 23.04 g at the date of first experiment) were used as controls. *Idua*^{-/-} mice produced by targeted disruption of the murine *IDUA* gene (Clarke et al., 1997; Ohmi et al., 2003; Hartung et al., 2004) were derived from animals kindly provided by Dr. Elizabeth Neufeld (University of California, Los Angeles, CA). Homozygous mutants were identified at the 21st day of life by polymerase chain reaction (Clarke et al., 1997; Hartung et al., 2004). Animals were maintained on a 12-h light/dark cycle with food and water available ad libitum. Brothers and sisters were bred, and the colony was maintained by mating of heterozygotes. Experiments were conducted in homozygotes KO (-/-) and normal homozygotes (+/+) were used as controls. Behavioral procedures were conducted between 9:00 and 17:30. All experimental procedures were in accordance with the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication No. 85-23

revised 1996) and the procedures of the Brazilian College of Laboratory Animals (COBEA).

4.2. Behavioral testing

The same animals (9 control and 11 *Idua*^{-/-} mice) were used in three different behavioral tests. They were submitted first to open field exploration (Roesler et al., 1999b), followed by a novel object recognition task (Rosa et al., 2003) carried out in the same open field arena 1 day later. Finally, animals were trained and tested in a single-trial step-down inhibitory avoidance task (Roesler et al., 1999b) 1 week after the end of the recognition memory test. Four animals (1 control mouse and 3 *Idua*^{-/-} mice) were removed from the inhibitory avoidance experiment because animals failed to step down from the platform within 60 s during the training trial. Another group of mice (7 control and 7 *Idua*^{-/-} mice) were subsequently used for a footshock reactivity test.

4.2.1. Open field behavior

Open field exploration was carried out as previously described (Roesler et al., 1999b). The open field was a 50 × 25-cm arena, surrounded by 50-cm high walls, made of brown plywood with a frontal glass wall. The floor of the arena was divided into 12 equal squares by black lines. Mice were put in the apparatus, placed on its left rear quadrant, and left to freely explore the arena for 5 min. Crossings of the black lines, rearings performed, latency to start locomotion, and the number of fecal pellets were counted. The number of crossings and rearings was used respectively as measures of locomotor activity and exploratory behavior, whereas the latency to start locomotion and the number of fecal pellets were used as measures of anxiety (Roesler et al., 1999b; Fernandez-Teruel et al., 2002; Henderson et al., 2004; Singer et al., 2005).

4.2.2. Novel object recognition

The object recognition task is a nonspatial, nonaversive memory test which has been shown to be a useful experimental tool for assessing changes in brain function in mouse genetic models (Tang et al., 1999; Rampon et al., 2000). The novel object recognition task was performed as previously described (Rosa et al., 2003). Training in the object recognition task took place in the same arena used for the open field, thus the open field exploration trial was used as a habituation trial for the recognition memory task. Twenty-four hours after arena exploration, training was conducted by placing individual mice for 5 min into the arena, in which two identical objects (objects A₁ and A₂; Duplo Lego toys) were positioned in two adjacent corners, 10 cm from the walls. In a short-term memory retention test given 1.5 h after training, the mice explored the open field for 5 min in the presence of one familiar (A) and one novel (B) object. All objects presented similar textures, colors, and sizes, but distinctive shapes. The exploratory preference was defined as percentage of the total exploration time that the animal spent investigating object A₂ (in the training trial) or the novel object (in short- and long-term retention test trials). Differences in exploratory preferences between training and retention test trials were used as memory retention scores. Between trials the objects were washed with 10% ethanol solution. In a long-term memory

retention test given 24 h after training, the same mice explored the field for 5 min in the presence of familiar object A and a novel object C. Recognition memory was evaluated as for the short-term memory test. Exploration was defined as sniffing or touching the object with the nose and/or forepaws.

4.2.3. Inhibitory avoidance

Inhibitory avoidance in rodents is a widely used animal model of aversively motivated learning and memory (for reviews, see Izquierdo and Medina, 1997; McGaugh 2000). The step-down inhibitory avoidance apparatus and procedures were described in a previous study (Roesler et al., 1999b). The inhibitory avoidance training box was a 50 × 25 × 25-cm acrylic box whose floor consisted of parallel stainless steel bars (1 mm diameter) spaced 1 cm apart. A 10-cm² wide, 2-cm high platform was placed on the center of the floor. Animals were placed on the platform, and their latency to step-down on the grid with all four paws was recorded with an automated device. In the training trial, immediately after stepping down on the grid, animals were given a 0.4 mA, 2.0 s footshock. In retention test sessions, carried out 1.5 h (short-term memory retention) and 24 h (long-term memory retention) after training, no footshocks were given and a ceiling of 180 s was imposed in the step-down latency. The differences between retention test and training trial step-down latencies were used as memory retention scores.

4.2.4. Footshock reactivity

A control experiment evaluating the animals' reactivity to the footshock was carried out in the same apparatus used for inhibitory avoidance as described in previous studies (Roesler et al., 1999a, 2000). Briefly, the platform was removed, and each animal was placed on the grid and allowed a 1-min habituation period prior to the start of a series of footshocks (0.5 s) delivered at 10-s intervals. Shock intensities ranged from 0.1 to 0.8 mA in 0.1-mA increments. The adjustments in shock intensity were made in accordance to each animal's response. Shock intensity was raised by 1 U when no response occurred and lowered by 1 U when a response was made. A "flinch" response was defined as withdrawal of one paw from the grid floor, and a "jump" response was defined as a rapid withdrawal of three or four paws. Two measurements of the "flinch" threshold were made, and then two measures of the "jump" threshold were made. For each animal, the mean of the two scores for the flinch and jump thresholds was considered.

4.3. Statistics

Data for inhibitory avoidance retention test latencies and exploratory preferences in the object recognition task are shown as median (interquartile ranges). Using nonparametric statistics is preferred for the analysis of data for memory tasks such as inhibitory avoidance because a ceiling is imposed in retention test trials (Roesler et al., 1999a,b, 2000, 2003; Rosa et al., 2003; Quevedo et al., 2004). Comparisons between groups were performed using Mann-Whitney *U* tests, two-tailed. Comparisons between trials within the same group were done using Wilcoxon tests. Data for open field behavior, inhibitory avoidance training trial latencies, and nociceptive thresholds

are shown as mean \pm SE (Roesler et al., 1999b, 2000). Comparisons between groups were performed using unpaired Student *t* tests. In all comparisons, *P* values of less than 0.05 were considered to indicate statistical significance.

Acknowledgments

This research was supported by the Millennium Institute of Gene Therapy (CNPq-MCT grant 420036/2005-9), FAPERGS-RS, PROPESQ-UFRGS, and the South American Office for Anticancer Drug Development. G.K.R. is a recipient of a CAPES-MEC fellowship. Authors thank Dr. Elizabeth F. Neufeld for her generous gift of *Idua*^{-/-} mice.

REFERENCES

- Brooks, A.I., Stein, C.S., Hughes, S.M., Heth, J., McCray, P.M., Sauter, S.L., Johnston, J.C., Cory-Slechta, D.A., Federoff, H.J., Davidson, B.L., 2002. Functional correction of established central nervous system deficits in an animal model of lysosomal storage disease with feline immunodeficiency virus-based vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 6216–6221.
- Chang, P.L., Lambert, D.T., Pisa, M.A., 1993. Behavioural abnormalities in a murine model of a human lysosomal storage disease. *NeuroReport* 4, 507–510.
- Clarke, L.A., Russell, C.S., Pownall, S., Warrington, C.L., Borowski, A., Dimmick, J.E., Toone, J., Jirik, F.R., 1997. Murine mucopolysaccharidosis type I: targeted disruption of the murine alpha-L-iduronidase gene. *Hum. Mol. Genet.* 6, 503–511.
- Consiglio, A., Quattrini, A., Martino, S., Bensadoun, J.C., Dolcetta, D., Trojani, A., Benaglia, G., Marchesini, S., Cestari, V., Oliverio, A., Bordinon, C., Naldini, L., 2001. In vivo gene therapy of metachromatic leukodystrophy by lentiviral vectors: correction of neuropathology and protection against learning impairments in affected mice. *Nat. Med.* 7, 310–316.
- Fernandez-Teruel, A., Escorihuela, R.M., Gray, J.A., Aguilar, R., Gil, L., Gimenez-Llort, L., Tobena, A., Bhomra, A., Nicod, A., Mott, R., Driscoll, P., Dawson, G.R., Flint, J., 2002. A quantitative trait locus influencing anxiety in the laboratory rat. *Genome Res.* 12, 618–626.
- Frisella, W.A., O'Connor, L.H., Vogler, C.A., Roberts, M., Walkley, S., Levy, B., Daly, T.M., Sands, M.S., 2001. Intracranial injection of recombinant adeno-associated virus improves cognitive function in a murine model of mucopolysaccharidosis type VII. *Mol. Ther.* 3, 351–358.
- Hartung, S.D., Frandsen, J.L., Pan, D., Koniar, B.L., Graupman, P., Gunther, R., Low, W.C., Whitley, C.B., McIvor, R.S., 2004. Correction of metabolic, craniofacial, and neurologic abnormalities in MPS I mice treated at birth with adeno-associated virus vector transducing the human alpha-L-iduronidase gene. *Mol. Ther.* 9, 866–875.
- Henderson, N.D., Turri, M.G., DeFries, J.C., Flint, J., 2004. QTL analysis of multiple behavioral measures of anxiety in mice. *Behav. Genet.* 34, 267–293.
- Izquierdo, I., Medina, J.H., 1997. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol. Learn. Mem.* 68, 285–316.
- McGaugh, J.L., 2000. Memory—A century of consolidation. *Science* 287, 248–251.
- Ohmi, K., Greenberg, D.S., Rajavel, K.S., Ryazantsev, S., Li, H.H., Neufeld, E.F., 2003. Activated microglia in cortex of mouse models of mucopolysaccharidoses I and IIIB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 1902–1907.
- Quevedo, J., Vianna, M.R., Martins, M.R., Baricello, T., Medina, J.H., Roesler, R., Izquierdo, I., 2004. Protein synthesis, PKA, and MAP kinase are differentially involved in short- and long-term memory in rats. *Behav. Brain Res.* 154, 339–343.
- Rampon, C., Tang, Y.P., Goodhouse, J., Shimizu, E., Kyin, M., Tsien, J.Z., 2000. Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nat. Neurosci.* 3, 238–244.
- Roesler, R., Vianna, M.R., de-Paris, F., Quevedo, J., 1999a. Memory-enhancing treatments do not reverse the impairment of inhibitory avoidance retention induced by NMDA receptor blockade. *Neurobiol. Learn. Mem.* 72, 252–258.
- Roesler, R., Walz, R., Quevedo, J., de Paris, F., Zanata, S.M., Graner, E., Izquierdo, I., Martins, V.R., Brentani, R.R., 1999b. Normal inhibitory avoidance learning and anxiety, but increased locomotor activity in mice devoid of PrPc. *Mol. Brain Res.* 71, 349–353.
- Roesler, R., Vianna, M.R., de-Paris, F., Rodrigues, C., Sant'Anna, M.K., Quevedo, J., Ferreira, M.B., 2000. NMDA receptor antagonism in the basolateral amygdala blocks enhancement of inhibitory avoidance learning in previously trained rats. *Behav. Brain Res.* 112, 99–105.
- Roesler, R., Schröder, N., Vianna, M.R., Quevedo, J., Bromberg, E., Kapczinski, F., Ferreira, M.B., 2003. Differential involvement of hippocampal and amygdalar NMDA receptors in contextual and aversive aspects of inhibitory avoidance memory in rats. *Brain Res.* 975, 207–213.
- Rosa, R.M., Flores, D.G., Appelt, H.R., Braga, A.L., Henriques, J.A., Roesler, R., 2003. Facilitation of long-term object recognition memory by pretraining administration of diphenyl diselenide in mice. *Neurosci. Lett.* 341, 217–220.
- Scott, H.S., Bunge, S., Gal, A., Clarke, L.A., Morris, C.P., Hopwood, J.J., 1995. Molecular genetics of mucopolysaccharidosis type I: diagnostic, clinical, and biological implications. *Hum. Mutat.* 6, 288–302.
- Scriver, C.R.E.A., 2001. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*. McGraw-Hill, New York.
- Singer, J.B., Hill, A.E., Nadeau, J.H., Lander, E.S., 2005. Mapping quantitative trait loci for anxiety in chromosome substitution strains of mice. *Genetics* 169, 855–862.
- Tang, Y.P., Shimizu, E., Dube, G.R., Rampon, C., Kerchner, G.A., Zhuo, M., Liu, G., Tsien, J.Z., 1999. Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* 401, 63–69.
- Vianna, M.R., Alonso, M., Viola, H., Quevedo, J., de Paris, F., Furman, M., de Stein, M.L., Medina, J.H., Izquierdo, I., 2000. Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Learn. Mem.* 7, 333–340.
- Vöikar, V., Rauvala, H., Ikonen, E., 2002. Cognitive deficit and development of motor impairment in a mouse model of Niemann-Pick type C disease. *Behav. Brain Res.* 132, 1–10.

ARTIGO 2

Artigo publicado na revista Cellular and Molecular Neurobiology.:

REOLON, G. K.; REINKE, A.; DE OLIVEIRA, M. R.; BRAGA, L. M.; CAMASSOLA, M.; ANDRADES, M. E.; MOREIRA, J. C.; NARDI, N. B.; ROESLER, R.; DAL-PIZZOL, F. Alterations in oxidative markers in the cerebellum and peripheral organs in MPS I mice. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 29(4): 443-448, 2009.

Alterations in Oxidative Markers in the Cerebellum and Peripheral Organs in MPS I Mice

Gustavo Kellermann Reolon · Adalisa Reinke · Marcos Roberto de Oliveira · Luisa Macedo Braga · Melissa Camassola · Michael Éverton Andrades · José Cláudio Fonseca Moreira · Nance Beyer Nardi · Rafael Roesler · Felipe Dal-Pizzol

Received: 12 May 2008 / Accepted: 27 November 2008 / Published online: 25 December 2008
© Springer Science+Business Media, LLC 2008

Abstract Mucopolysaccharidosis type I is a lysosomal storage disease with alterations in several organs. Little is known about the pathways that lead to the pathology. Evidences point oxidative stress on lysosomal storage diseases and mucopolysaccharidosis type I. The aim of the present study was to evaluate oxidative biomarkers on mucopolysaccharidosis type I mice model. We evaluated antioxidant enzymatic activity, protein damage and lipid peroxidation in the forebrain, cerebellum, heart, lung, diaphragm, liver, kidney and spleen. Superoxide dismutase activity was increased on cerebellum, lung, diaphragm, liver and kidney of mucopolysaccharidosis type I mice. Catalase activity was

increased on cerebellum, spleen and lung. There was no alteration on glutathione peroxidase activity on any of the analyzed organs. Mucopolysaccharidosis type I mice showed increased carbonyl groups on cerebellum, heart and spleen. There was a decrease of thiobarbituric acid-reactive substances on the cerebellum of mucopolysaccharidosis type I mice. The results indicate a oxidative imbalance in this model. As lysosomes are very susceptible to oxidative damage, leading inclusive to cellular death, and lysosomal storage diseases present several alterations on this organelles, this finding can help to elucidate the cellular damage pathways on mucopolysaccharidosis type I.

G. K. Reolon · R. Roesler (✉)
Department of Pharmacology, Cellular and Molecular Neuropharmacology Research Group, Institute for Basic Health Sciences, and Cancer Research Laboratory, Academic Hospital Research Center, Federal University of Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500, ICBS, Campus Centro/UFRGS, 90046-900 Porto Alegre, RS, Brazil
e-mail: rroesler@terra.com.br

A. Reinke · F. Dal-Pizzol
Department of Medicine, Laboratory of Physiopathology, University of Southern Santa Catarina, 88806-000 Criciúma, SC, Brazil

M. R. de Oliveira · M. É. Andrades · J. C. F. Moreira
Department of Biochemistry, Center for Oxidative Stress Research, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

L. M. Braga · M. Camassola · N. B. Nardi
Department of Genetics, Immunogenetics Laboratory, Institute for Biosciences, Federal University of Rio Grande do Sul, 91540-000 Porto Alegre, RS, Brazil

Keywords Mucopolysaccharidosis type I · Lysosomal storage diseases · Oxidative stress · Genetic mouse models

Abbreviations

CAT	Catalase
DNPH	Dinitrophenylhydrazine
GAG	Glycosaminoglycans
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione
IDUA	α -L-iduronidase
LSD	Lysosomal storage diseases
MDA	Malondialdehyde
MPS	Mucopolysaccharidosis
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase
RNS	Reactive nitrogen species
ROS	Reactive oxygen species
SOD	Superoxide dismutase
TBARS	Thiobarbituric acid-reactive substances
TCA	Trichloroacetic acid

Introduction

Lysosomal storage diseases (LSD) are a group of inherited metabolic disorders that share a common pathophysiology, in which a deficiency of enzymes catalyzing the stepwise degradation of macromolecular substrate causes their gradual lysosomal accumulation. This accumulation eventually results in cell, tissue and organ dysfunctions. Mucopolysaccharidoses are LSD, the type I (MPS I) is caused by deficiency of the enzyme α -L-iduronidase (IDUA), i.e., the lysosomal protein necessary to start the breakdown of the glycosaminoglycans (GAGs) heparan sulfate and dermatan sulfate. Total loss of IDUA function results in the worst phenotype, Hurler syndrome. There is an involvement of multiple organs, some symptoms are growth delay, hepatosplenomegaly, coarse facial features, excessive urinary GAGs, skeletal abnormalities and neurodegeneration (Neufeld and Muenzer 1995).

The lysosomes in LSD increase in size and number in an attempt to retain the growing concentration of undegraded material. This is well characterized as the primary cause of the disease; however, the delineation of the biochemical and cellular pathways that cause the pathology remains the most intriguing question on these disorders (Futerman and van Meer 2004). One explanation is that the lysosomal stability is compromised, leading to the release of hydrolases and accumulated metabolites in the cytosol. It is well known that lysosomal destabilization can lead to apoptosis and necrosis.

Lysosomes are very susceptible to oxidative stress (for a review, see Terman et al. 2006), reactive species damage the lysosomes endangering their permeability. Free radicals and other reactive species are involved in human diseases, being related in over 100 of them (Halliwell and Gutteridge 1999), and these reactive molecules are formed during normal aerobic metabolism in cells; however, uncontrolled production of free radicals results in damage to biomolecules, leading to altered function and disease (Evans and Halliwell 1999). In LSD this imbalance might be even more important due to the lysosomal overload. Despite many studies relating oxidative damage to several disorders, researches in LSD, especially MPS, lag seriously behind. This mouse model of MPS I was generated by Neufeld and colleagues through disruption of the *Idua* gene by insertion in exon 6 of the neomycin resistance gene in the opposite orientation. Through repeated back-crossing, the mutant gene was inserted on C57BL/6 inbred background (Ohmi et al. 2003). We have previously described a specific impairment of aversively motivated memory on these mice (Reolon et al. 2006); this memory task could be used to evaluate the potential protective effect of experimental therapeutic approaches against cognitive deficits in

mouse models of MPS I. The aim of this study was to evaluate oxidative stress biomarkers in the mice model of MPS I. To our knowledge, this is the first study evaluating oxidative biomarkers in MPS I mice.

Methods

Animals

Five adult male C57BL/6 knockout mice for the *Idua* gene (*Idua*^{-/-}) with 192 to 221 days of age were used as experimental subjects. Five adult male C57BL/6 homozygous and heterozygous mice for the *Idua* gene with 192 to 221 days of age were used as controls. Heterozygotes are asymptomatic and are commonly used as controls. *Idua*^{-/-} mice were produced by target disruption of the murine *Idua* gene (Ohmi et al. 2003). The heterozygote animals precursors of the colony were kindly provided by Dr. Elizabeth Neufeld (University of California, Los Angeles, CA, USA). Homozygous mutants were identified on the 21st day of life by polymerase chain reaction. Animals were maintained on a 12-h light/dark cycle with food and water available ad libitum. Brothers and sisters were bred and the colony was maintained by mating heterozygotes. Animals were sacrificed by decapitation, and organs were quickly removed and stored for later analyses. The total lack of IDUA activity makes the knockout mice a MPS I Hurler model.

All experimental procedures were in accordance with the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication No. 85-2 3 revised 1996) and the procedures of the Brazilian College of Laboratory Animals and were approved by the institutional research ethics and animal care committee.

Superoxide Dismutase Activity

Superoxide dismutase (SOD) activity was assayed by measuring the inhibition of adrenaline auto-oxidation, as previously described (Bannister and Calabrese 1987).

Catalase Activity

Catalase (CAT) activity was assayed by measuring the rate of decrease of H₂O₂ absorbance at 240 nm (Aebi 1984).

Glutathione Peroxidase Activity

Measuring glutathione peroxidase (GPx) activity was assayed measuring nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase (NADPH) oxidation at 340 nm in the

presence of reduced glutathione, tert-Butyl hydroperoxide, and glutathione reductase (Flohé and Günzler 1984).

Protein Damage

The oxidative damage to proteins was assessed by the determination of carbonyl groups based on the reaction with dinitrophenylhydrazine (DNPH), as previously described (Levine et al. 1990). Briefly, proteins were precipitated by the addition of 20% trichloroacetic acid (TCA) and redissolved in DNPH and the absorbance read at 370 nm.

Lipid Peroxidation

As an index of lipid peroxidation, the formation of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) during an acid-heating reaction has been used (Draper and Hadley 1990). Briefly, the samples were mixed with 1 ml of TCA 10% and 1 ml of thiobarbituric acid 0.67%, then heated in a boiling water bath for 15 min. TBARS were determined by the absorbance at 535 nm. All the results were normalized by the protein content (Lowry et al. 1951).

Statistical Analysis

All data were presented as means \pm standard error of the mean (SEM). Comparisons between control and MPS mice were performed with independent samples Student *t*-tests. Differences between the groups were rated significant at $P < 0.05$.

Results

SOD is considered a key antioxidant defense, dismutating superoxide anion-free radical into hydrogen peroxide, thus protecting the cells from its damage. Results for SOD activity are shown in Fig. 1. There were no statistically significant differences between knockout and control mice in the forebrain, heart and spleen. Knockout mice showed increased SODs activity in the lung, liver and kidney ($P < 0.05$), cerebellum and diaphragm ($P < 0.01$).

Hydrogen peroxide also represents a risk for cells, two enzymatic defenses convert it into water and ground state oxygen, catalase and GPx. Results for catalase activity are shown in Fig. 2. No statistically significant differences were found between knockout and control mice in the forebrain, heart, diaphragm, liver and kidney. Knockout mice showed increased catalase activity in the cerebellum, spleen ($P < 0.05$), and in the lung ($P < 0.01$). There was no significant difference between knockout and control

mice in GPx activity in any of the analyzed organs (data not shown).

The carbonyl assay measures the formation of carbonyl groups on proteins, these groups being formed after reactive species attacked the protein backbone. Results for carbonyl assay are shown in Fig. 3. No statistically significant differences were found between knockout and control mice in the forebrain, lung, diaphragm, liver and kidney. Knockout mice showed a high increase on carbonyl groups in the cerebellum, heart and spleen ($P < 0.01$).

TBARS assay measures the formation of malondialdehydes (MDA), which are products of lipid peroxidation. Results for TBARS assay are shown in Fig. 4. There was no significant difference between knockout and control mice in the forebrain, heart, lung, diaphragm, liver, kidney and spleen. Knockout mice showed a decrease of thiobarbituric acid-reactive substances in the cerebellum ($P < 0.05$).

Discussion

Considerable evidence points toward the participation of reactive oxygen species (ROS), reactive nitrogen species (RNS) and free radicals in human diseases. Disturbing cell homeostasis produces oxidative stress through several mechanisms (Halliwell and Gutteridge 1999). The intralysosomal GAGs accumulation, directly or not, may have an influence on oxidative imbalance. Cells exposed to oxidative stress enhance the antioxidant defenses in an attempt to reestablish homeostasis. Our results showed an increase on SOD activity in the cerebellum, lung, diaphragm, liver and kidney; CAT activity was increased on the cerebellum, lung and spleen. We found abnormal damage to proteins on the heart, spleen and cerebellum. The TBARS level was decreased on the cerebellum. It is possible that the enzymatic defense is unable to prevent the protein damage through enhanced production of reactive species on the heart, spleen and cerebellum while this compensation could be occurring on the other tissues. The cerebellum, where two enzymatic defenses were enhanced, could not prevent protein damage; however, it diminished basal lipid damage.

In different neurodegenerations, an inflammatory process on the central nervous system is believed to be involved in the neuronal death. Pathological activation of microglia might trigger the release of neurotoxic substances, such as ROS and RNS. On LSD, microglia have also been suggested as having an involvement in the pathology of MPS I and MPS IIIB (Ohmi et al. 2003), GM1 gangliosidosis (Jeyakumar et al. 2003), metachromatic leukodystrophy (Hess et al. 1996), Niemann-Pick type C (German et al. 2002) and Krabe disease (Wu et al. 2000).

Fig. 1 Superoxide dismutase activity in different organs of normal and knockout mice. Data are expressed as mean \pm SEM. $n = 5$ animals per group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared to the control group

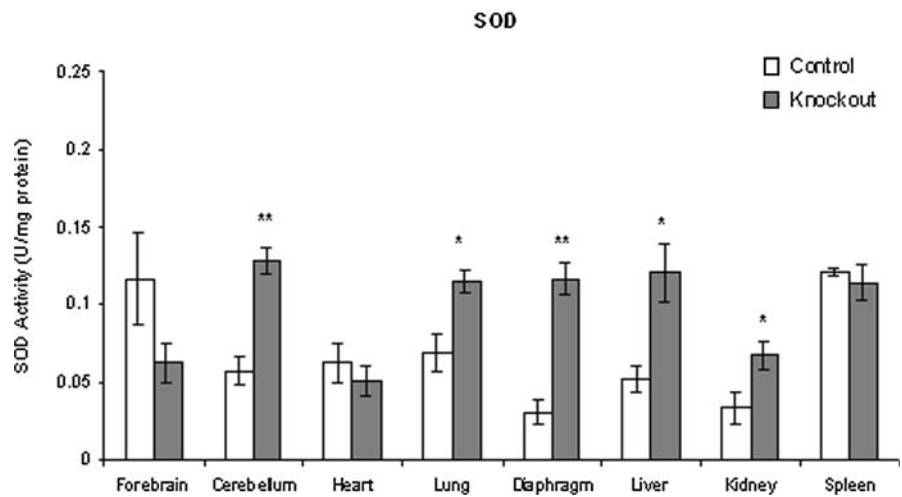


Fig. 2 Catalase activity on different organs of normal and knockout mice. Data are expressed as mean \pm SEM. $n = 5$ animals per group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared to the control group

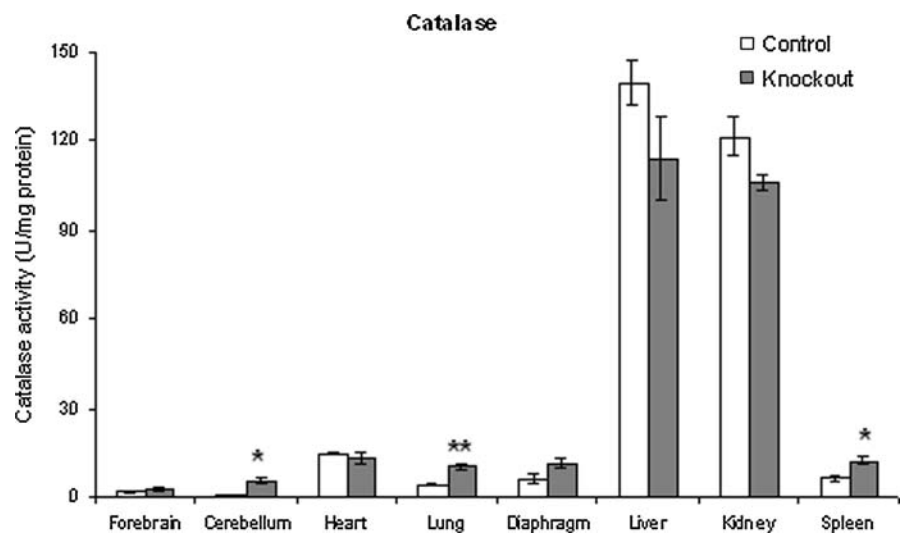
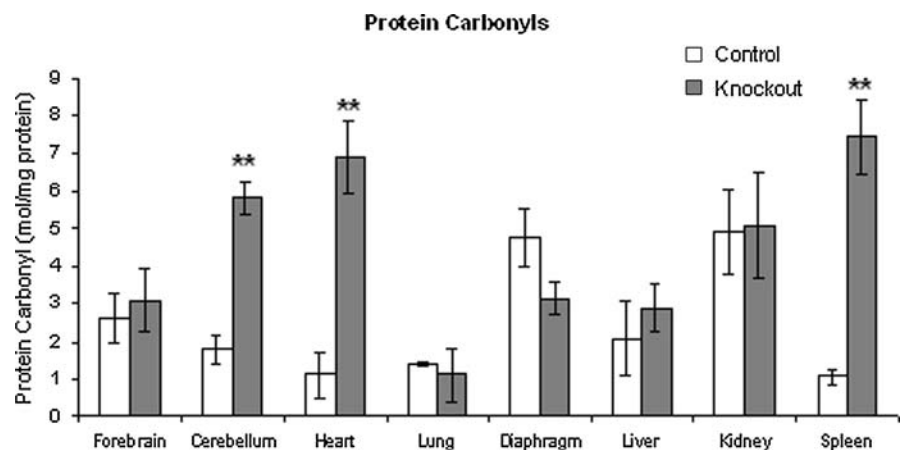


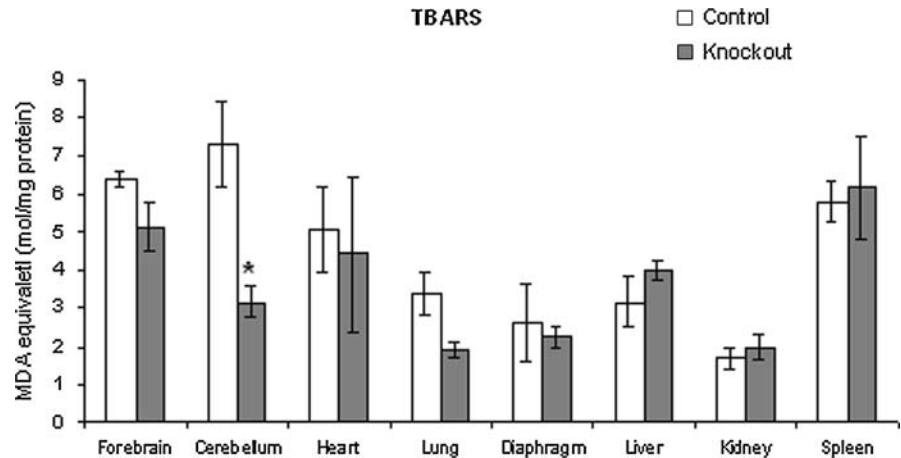
Fig. 3 Protein carbonyl concentration on different organs of normal and knockout mice. Data are expressed as mean \pm SEM. $n = 5$ animals per group. ** $P < 0.01$ compared to control group



On GM1 gangliosidosis (Jeyakumar et al. 2003), a footprint of nitric oxide was found on macrophages, an indication that these cells could be causing oxidative damage. The authors suggest that microglial activation enhances damage through inflammation and/or through ROS/RNS released.

There was a ninefold increase in MDA levels, and a diminished glutathione (GSH, an important antioxidant) on the brain of Sandhoff mice (Jeyakumar et al. 2004). The use of anti-inflammatory and antioxidant drugs delays loss of motor coordination and ameliorate other parameters in

Fig. 4 Malondialdehyde (MDA) concentration on different organs of normal and knockout mice. Data are expressed as mean \pm SEM. $n = 5$ animals per group. * $P < 0.05$ compared to control group



the mouse model of Sandhoff (Jeyakumar et al. 2004) and Niemann-Pick C diseases (Bascañan-Castillo et al. 2004).

MPS I and MPS IIIB mice models have been shown to have activated microglia with large storage vacuoles on the forebrain (Ohmi et al. 2003). Both diseases showed increased microglia gene expression of cytochrome b558 that is part of the NADPH oxidase complex, which is responsible for the oxidative burst of phagocytes (Klegeris and McGeer 1994). In MPS IIIB mice, an increased expression of components of the phagocyte NADPH oxidase was observed in the brain and cerebellum (Villani et al. 2007).

MPS I patients showed increased blood CAT activity and a transient decrease in SOD activity after enzyme replacement therapy. TBARS and GSH levels were increased when compared to reference levels (Pereira et al. 2008). The authors suggest that as erythrocytes can absorb hydrogen peroxide from other cells (Halliwell and Gutteridge 1999) the alterations observed might be caused by increased production of hydrogen peroxide from different tissues.

Our results showed no alteration on any parameter on the forebrain. At first look this might seem in discordance with a previous work that showed activated microglia on the forebrain of MPS I mice (Ohmi et al. 2003). However, as a neurodegenerative disease, time is a crucial factor on a cross-sectional study. We analyzed 6–7 months males. Ohmi et al. (2003) observed that the number of activated microglia cells increased at 6 months and evolved with time, being more significant at 9 months. Thus, analyses of older mice will probably show forebrain alteration. Studies of different time sections will reveal the progression of this damage. It is important to acknowledge that there are different oxidative stress biomarkers, not used on this work. Our results show no alteration on the forebrain, but that does not exclude the possibility that there is a damage occurring which could be shown if other parameters were measured.

The heart, spleen and cerebellum presented a high formation of carbonyl groups. It is known that this can cause an autoimmune response through misidentification of those damaged proteins as exogenous ones (Halliwell and Gutteridge 1999), which in turn might trigger and/or enhance inflammation.

A special attention should be given to the cerebellum. It was altered on every biomarker (except for GPx). Russell et al. (1998) observed a progressive loss of Purkinje cells on the cerebellum of a similar *Idua*^{-/-} mice model, starting at 4–5 months and increasing with time. The intralysosomal accumulation could be damaging Purkinje cells and other cells on cerebellum through lysosomal labilization and/or oxidative stress. This oxidative imbalance can work as a damage enhancer. It is not known if Purkinje cells die through apoptosis or necrosis; if it is due to the former, then more oxidative imbalance could be occurring. It is possible that this loss of neurons activated microglia through phagocytosis and therefore triggered inflammation with posterior oxidative damage. The protein damage could enhance even more this pathological inflammation. In the Sandhoff model (Jeyakumar et al. 2003), the inflammation is place specific, which might be the same for MPS I, occurring on the cerebellum without affecting the forebrain. Or, another possibility is an influence on the onset of forebrain damage. It is possible that the intralysosomal accumulation is leading to an intricated positive feedback damage mechanism. It is noteworthy to say that, to our knowledge, no studies evaluating inflammation with microglia involvement on the cerebellum of MPS I have been done.

In summary, in the present study, we evaluate for the first time the alterations in oxidative biomarkers in different tissues in a mouse MPS model. Further experiments should examine the time course of the alterations in oxidative stress across different time intervals and the possible reversal of the alterations by enzyme replacement. The findings suggest the possibility that antioxidants might be

useful as adjuvant therapies to ameliorate or delay the symptoms of MPS. Future studies analyzing the effect of experimental therapies on oxidative biomarkers may help to elucidate an important question: Whether oxidative stress has a significant influence on MPS I or is a response to the primary disease processes without influencing the disorder progression? Our results indicate that, at least, some attention to this matter should be given.

Acknowledgments This research was supported by the Millennium Institute of Gene Therapy (CNPq-MCT grant 420036/2005-9), and grants and fellowships from FAPERGS-RS and CAPES. The authors thank Dr. Elizabeth F. Neufeld for her generous gift of *Idua*^{+/-} mice.

References

- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121–126. doi:10.1016/S0076-6879(84)05016-3
- Bannister JV, Calabrese L (1987) Assays for SOD. *Methods Biochem Anal* 32:279–312. doi:10.1002/9780470110539.ch5
- Bascuñan-Castillo EC, Erickson RP, Howison CM, Hunter RJ, Heidenreich RH, Hicks C, Trouard TP, Gillies RJ (2004) Tamoxifen and vitamin E treatments delay symptoms in the mouse model of Niemann-Pick C. *J Appl Genet* 45:461–467
- Draper HH, Hadley M (1990) Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 186:421–431. doi:10.1016/0076-6879(90)86135-1
- Evans P, Halliwell B (1999) Free radicals and hearing: cause, consequence, and criteria. *Ann NY Acad Sci* 884:19–40. doi:10.1111/j.1749-6632.1999.tb08633.x
- Flohé L, Günzler WA (1984) Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 105:114–121. doi:10.1016/S0076-6879(84)05015-1
- Futerman AH, van Meer G (2004) The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:554–565. doi:10.1038/nrm1423
- German DC, Liang CL, Song T, Yazdani U, Xie C, Dietschy JM (2002) Neurodegeneration in the Niemann-Pick C mouse: glial involvement. *Neuroscience* 109:437–450. doi:10.1016/S0306-4522(01)00517-6
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1999) *Free radicals in biology and medicine*. Clarendon Press, Oxford
- Hess B, Saftig P, Hartmann D, Coenen R, Lüllmann-Rauch R, Goebel HH, Evers M, von Figura K, D’Hooge R, Nagels G, De Deyn P, Peters C, Gieselmann V (1996) Phenotype of arylsulfatase A-deficient mice: relationship to human metachromatic leukodystrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:14821–14826. doi:10.1073/pnas.93.25.14821
- Jeyakumar M, Thomas R, Elliot-Smith E, Smith DA, van der Spoel AC, d’Azzo A, Perry VH, Butters TD, Dwek RA, Platt FM (2003) Central nervous system inflammation is a hallmark of pathogenesis in mouse models of GM1 and GM2 gangliosidosis. *Brain* 126:974–987. doi:10.1093/brain/awg089
- Jeyakumar M, Smith DA, Williams IM, Borja MC, Neville DC, Butters TD, Dwek RA, Platt FM (2004) NSAIDs increase survival in the Sandhoff disease mouse: synergy with N-butyldeoxynojirimycin. *Ann Neurol* 56:642–649. doi:10.1002/ana.20242
- Klegeris A, McGeer PL (1994) Rat brain microglia and peritoneal macrophages show similar responses to respiratory burst stimulants. *J Neuroimmunol* 53:83–90. doi:10.1016/0165-5728(94)90067-1
- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 186:464–478. doi:10.1016/0076-6879(90)86141-H
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275
- Neufeld EF, Muenzer J (1995) The mucopolysaccharidoses. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The metabolic basis of inherited diseases*. McGraw-Hill, New York
- Ohmi K, Greenberg DS, Rajavel KS, Ryazantsev S, Li HH, Neufeld EF (2003) Activated microglia in cortex of mouse models of mucopolysaccharidoses I and IIIB. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:1902–1907. doi:10.1073/pnas.252784899
- Pereira VG, Martins AM, Micheletti C, D’Almeida V (2008) Mutational and oxidative stress analysis in patients with mucopolysaccharidosis type I undergoing enzyme replacement therapy. *Clin Chim Acta* 387:75–79. doi:10.1016/j.cca.2007.09.008
- Reolon GK, Braga LM, Camassola M, Luft T, Henriques JA, Nardi NB, Roesler R (2006) Long-term memory for aversive training is impaired in *Idua*(-/-) mice, a genetic model of mucopolysaccharidosis type I. *Brain Res* 1076:225–230. doi:10.1016/j.brainres.2006.01.008
- Russell C, Hendson G, Jevon G, Matlock T, Yu J, Aklujkar M, Ng KY, Clarke LA (1998) Murine MPS I: insights into the pathogenesis of Hurler syndrome. *Clin Genet* 53:349–361
- Terman A, Kurz T, Gustafsson B, Brunk UT (2006) Lysosomal labilization. *IUBMB Life* 58:531–539. doi:10.1080/15216540600904885
- Villani GR, Gargiulo N, Faraonio R, Castaldo S, Gonzalez Y, Reyero E, Di Natale P (2007) Cytokines, neurotrophins, and oxidative stress in brain disease from mucopolysaccharidosis IIIB. *J Neurosci Res* 85:612–622. doi:10.1002/jnr.21134
- Wu YP, Matsuda J, Kubota A, Suzuki K, Suzuki K (2000) Infiltration of hematogenous lineage cells into the demyelinating central nervous system of twitcher mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 59:628–639

DISCUSSÃO

A utilização de modelos animais de MPS I possibilita avaliar a eficácia de diferentes terapias (CLARKE *et al.*, 1997; OHMI *et al.*, 2003). Os parâmetros utilizados na avaliação terapêutica na MPS I são: o acúmulo lisossomal, a atividade da α -L-iduronidase, a concentração dos GAGs excretados pela urina e as anormalidades esqueléticas.

No SNC, esses parâmetros são: o acúmulo lisossomal, o acúmulo de GM2 e GM3 e a morte neuronal no cerebelo (RUSSELL *et al.*, 1998; DESMARIS *et al.*, 2004; HARTUNG *et al.*, 2004; CHUNG *et al.*, 2007). Os critérios acima mencionados não avaliam a função cognitiva. Devido ao comprometimento do SNC, é necessária a caracterização de parâmetros de déficit cognitivo que possam ser utilizados na avaliação terapêutica. Até o momento, somente HARTUNG *et al.* (2004) avaliaram a memória de habituação no campo aberto de um modelo de MPS I.

Nosso trabalho utilizou dois paradigmas de aprendizado, a esquiva inibitória e o reconhecimento de objeto. A esquiva inibitória é um modelo amplamente utilizado de memória aversiva (IZQUIERDO & MEDINA, 1997; MCGAUGH, 2000). O reconhecimento de objeto avalia a memória não aversiva, sendo um teste útil na avaliação de mudanças no SNC de modelos genéticos (TANG *et al.*, 1999; RAMPON *et al.*, 2000). Também avaliamos o comportamento no campo aberto e a resposta dos animais ao choque do aparelho de esquiva inibitória.

Os resultados da esquiva inibitória não demonstraram diferença significativa entre os grupos no treino ou na memória de curta duração. Contudo, a memória de longa duração estava prejudicada nos animais *knockout*. No teste de reconhecimento de objeto, não houve diferença entre os grupos no treino, na memória de curta e de longa duração. No comportamento de campo aberto, não existiu diferença significativa entre os grupos na latência, no número de *crossings* e no número de bolos fecais. Houve uma redução no número de *rearings* nos animais *knockout*. A reatividade ao choque não se mostrou alterada nesses animais, não havendo diferença significativa entre os grupos no *flinch* e no *jump*.

O principal achado deste trabalho é o déficit apresentado pelos camundongos *Idua*^{-/-} na memória de longa duração de esquiva inibitória. Todavia, a memória de curta duração não estava afetada.

A formação de memórias aversivas de longa duração é modulada pela liberação de hormônios e neurotransmissores associados à exposição a eventos emocionais. A amígdala basolateral é crítica na consolidação da memória aversiva de longa duração (MCGAUGH, 2000). É possível que a diferença observada nos animais seja devido a alterações na liberação de hormônios associados a eventos estressantes e/ou mudanças na funcionalidade normal da amígdala. Até o momento, não foram realizados estudos sobre os hormônios associados a eventos estressantes ou à função da amígdala na MPS I.

As memórias de curta e de longa duração de esquiva inibitória necessitam da integridade do hipocampo dorsal, mas possuem diferentes mecanismos neuroquímicos (IZQUIERDO & MEDINA, 1997; MCGAUGH, 2000; ROESLER *et al.*, 2003; QUEVEDO *et al.*, 2004). O déficit na esquiva inibitória pode ser devido à

alteração na funcionalidade normal do hipocampo. No modelo murino da MPS I, já foi demonstrado o acúmulo patológico dos GAGs em neurônios hipocampais (DESMARIS *et al.*, 2004; HARTUNG *et al.*, 2004). No modelo da Leucodistrofia Metacromática (outra LSD) ocorre degeneração seletiva de neurônios piramidais do hipocampo dorsal (CONSIGLIO *et al.*, 2001).

Nos animais *knockout*, o teste de reconhecimento de objeto não se mostrou alterado. A memória desse teste é declarativa não aversiva, diferindo da esQUIVA inibitória, cuja memória é não declarativa e aversiva. As diferenças entre as duas memórias podem explicar os resultados distintos observados. HARTUNG *et al.* (2004) encontraram déficit de memória não aversiva e não associativa, o que contrasta com os nossos resultados, que indicaram déficit na memória aversiva, mas não na memória não aversiva de camundongos *Idua*^{-/-}. A diferença entre os achados pode ser decorrente do tipo de teste utilizado.

Em modelos animais com dano cerebral, o teste de parâmetros comportamentais precisa excluir a influência de disfunções no Sistema Sensorial ou Locomotor, pois os achados poderiam ser erroneamente interpretados como alterações cognitivas. Os pacientes portadores da síndrome de Hurler apresentam alterações importantes no Sistema Sensorial e Locomotor (NEUFELD & MUENZER, 2001) e o modelo murino reproduz adequadamente o amplo espectro de alterações observadas nos pacientes (RUSSELL *et al.*, 1998).

Avaliamos animais com a idade média de 25 semanas e nossos resultados indicam que, nessa idade, as alterações esqueléticas ainda não incapacitam a locomoção. Considerando os problemas articulares e esqueléticos que os pacientes portadores da síndrome de Hurler e os camundongos apresentam, essa

é uma questão relevante a ser observada. No campo aberto, os animais testados mostraram a mesma locomoção do grupo controle. Esses animais apresentam anormalidades esqueléticas que iniciam às quatro semanas de idade; com oito semanas, ocorrem alterações nas patas. Na idade de 40 semanas, os animais não são mais capazes de se movimentarem. O quadro clínico característico das LSD, a disostose múltipla, só é completamente evidenciado na 57ª semana de vida.

As articulações dos pacientes com MPS I-Hurler são gravemente afetadas, impossibilitando a realização de diversos movimentos. No modelo animal, não foram avaliadas as alterações articulares. A redução do comportamento exploratório observado no campo aberto pode ser devida à incapacidade do animal de erguer-se e/ou se manter sobre as duas patas. Dessa forma, essa alteração necessita de estudos posteriores visando determinar sua causalidade.

Na síndrome de Hurler, os pacientes apresentam alterações importantes no Sistema Sensorial. Os animais aprenderam normalmente a tarefa de esquiva inibitória e a tarefa de reconhecimento de objeto que envolvem diferentes sentidos para o aprendizado. Esses dados indicam que, na idade média de 25 semanas, a funcionalidade do Sistema Sensorial capacita os animais a aprenderem os testes de reconhecimento de objeto e de esquiva inibitória.

O déficit observado na memória de longa duração de esquiva inibitória poderia ser devido a alterações no Sistema Nociceptivo. Para excluir a interferência de possíveis alterações nociceptivas, avaliamos a resposta ao choque, tendo os animais *knockout* e o grupo controle apresentado a mesma resposta.

Após o controle das variáveis relacionadas a fatores sensoriais e/ou locomotores, podemos afirmar que o déficit observado na memória de longa duração de esQUIVA inibitória não foi causado por alterações nociceptivas e/ou sensorio-motoras. Nossos resultados mostram um déficit específico na memória aversiva de longa duração de esQUIVA inibitória. Os achados acima possibilitam ao teste de esQUIVA inibitória sua utilização na avaliação dos efeitos de diferentes abordagens terapêuticas sobre os déficits cognitivos no modelo murino da MPS I-Hurler. Estudos posteriores serão necessários para investigar as alterações responsáveis pela disfunção da memória.

É importante ressaltar que foram utilizados animais com a idade média de 25 semanas, idade na qual é possível observar danos diversos que são parâmetros utilizados na avaliação de diferentes terapias (RUSSELL *et al.*, 1998). Entretanto, o dano ao SNC, incluindo a morte celular cerebelar e a inflamação cerebral, ocorre mais tardiamente nos animais *knockout*. O estudo de parâmetros cognitivos em diferentes idades pode definir o início e a progressão de diferentes danos cognitivos. Provavelmente, animais mais velhos terão danos cognitivos mais graves do que os apresentados pelos camundongos do presente estudo.

O estresse oxidativo é o desequilíbrio entre antioxidantes e pró-oxidantes. Em doenças, isso geralmente ocorre pelo aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e/ou espécies reativas de nitrogênio (ERNs). Existe uma forte relação entre a inflamação no SNC e o desequilíbrio oxidativo, podendo o processo inflamatório levar ao estresse oxidativo (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Diferentes trabalhos encontraram inflamação com participação da microglia no SNC dos pacientes portadores das

LSD. Já foi proposto que o acúmulo de GAGs e/ou a morte neuronal ativariam patologicamente a microglia, levando à liberação aumentada de EROs/ERNs. A melhora observada em modelos animais de LSD tratados com antioxidantes indica uma possível influência do estresse oxidativo nessas patologias.

Células expostas ao estresse oxidativo aumentam suas defesas antioxidantes na tentativa de restabelecer o equilíbrio. Nossos resultados mostraram um aumento das defesas antioxidantes dos animais *knockout* quando comparadas ao grupo controle. O cerebelo, o pulmão, o diafragma, o fígado e o rim apresentaram aumento na atividade da superóxido dismutase (SOD). A atividade da catalase estava aumentada no cerebelo, no pulmão e no baço. Este achado pode refletir a tentativa de restabelecimento da homeostase. Ao analisarmos a formação de grupos carbonil, biomarcador de dano a proteínas por radicais livres, verificou-se seu aumento no cerebelo, no coração e no baço dos camundongos *knockout* em relação aos animais do grupo controle. Não foram observadas alterações das defesas antioxidantes no coração. Dessa forma, poder-se-ia atribuir o dano observado ao aumento das espécies reativas. É possível que, no cerebelo e no baço, o aumento verificado das defesas antioxidantes não consiga impedir o dano a proteínas, enquanto em outros órgãos ocorra essa compensação.

Nos camundongos *knockout*, o cerebelo, o coração e o baço apresentam várias alterações (RUSSELL *et al.*, 1998; JORDAN *et al.*, 2005). Os canais de potássio são susceptíveis ao ataque das EROs/ERNs. No SNC e no músculo cardíaco, os canais de potássio desempenham papel importante, podendo influir na morte neuronal e na disfunção cardíaca. O baço apresenta grande infiltração

de macrófagos, existindo a possibilidade dessas células exercerem influência sobre o dano proteico.

O SNC é altamente sensível ao estresse oxidativo. Dentre as possíveis causas da susceptibilidade cerebral ao estresse oxidativo, encontram-se o alto consumo de oxigênio e a utilização de Ca^{+2} . Além disso, muitos neurotransmissores são moléculas auto-oxidantes, podendo reagir com oxigênio e gerar EROs.

No cerebelo, a morte das células de Purkinje pode ocorrer devido à necrose. A morte neuronal por necrose pode aumentar o estresse oxidativo das regiões circunjacentes através da liberação de íons metálicos, pró-oxidantes e enzimas lisossomais. Além disso, a morte neuronal, seja por necrose ou apoptose, pode ativar a microglia através da fagocitose dos restos celulares desencadeando e/ou aumentando o estresse oxidativo.

A forma neuronal da enzima óxido nítrico sintetase (nNOS) é regulada positivamente por Ca^{+2} / calmodulina. O desequilíbrio na homeostase do Ca^{+2} presente em algumas LSD pode aumentar a liberação de óxido nítrico. No SNC, o cerebelo possui a mais alta concentração de nNOS. Dessa forma, é a região cerebral mais susceptível ao desequilíbrio do Ca^{+2} . Caso o desequilíbrio do Ca^{+2} ocorra também no modelo murino da MPS I, poderia ser uma explicação para os achados a nível cerebelar.

VILLANI *et al.* (2007) avaliaram a expressão gênica da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase no telencéfalo e no cerebelo de camundongos MPS IIIB, tendo ambos apresentado aumento da sua expressão em cerca de 10 vezes.

Foi o primeiro trabalho a estudar o processo inflamatório cerebelar nas MPS. Estudos anteriores sobre as alterações inflamatórias das LSD enfocaram principalmente o telencéfalo, sem, contudo, avaliar as modificações no cerebelo.

As proteínas podem sofrer grande dano por radicais livres sem perda da sua função. Nas enzimas, a perda da função ocorre devido à modificação de um aminoácido pertencente ou próximo ao sítio ativo. O dano a proteínas pode prejudicar o funcionamento celular alterando receptores, enzimas e proteínas estruturais. As proteínas danificadas podem ser reconhecidas pelo Sistema Imunológico como exógenas, iniciando uma reação autoimune. Caso isso ocorra no modelo murino da MPS I, o estresse oxidativo poderia iniciar e/ou exacerbar a reação inflamatória no cerebelo, coração e baço.

A peroxidação lipídica apresentou alteração somente no cerebelo, diminuindo a formação de dialdeído malônico (MDA). O SNC possui grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados (lipídios de maior suscetibilidade à peroxidação lipídica), sendo esperado aumento na peroxidação lipídica e na formação de MDA. Diferentes espécies reativas atacam preferencialmente algumas biomoléculas. Indaga-se se o aumento observado na SOD e na catalase poderia prevenir e reduzir a peroxidação lipídica, embora não consiga evitar o dano a proteínas.

Entre os mecanismos propostos de dano ao SNC na MPS I e em outras LSD, encontra-se o processo inflamatório com possível influência da micróglia. Talvez o estresse oxidativo esteja também contribuindo para a progressão da doença. Existe a possibilidade de outras LSD apresentarem esse desequilíbrio.

Existe extensa literatura sobre a contribuição da inflamação crônica em doenças neurodegenerativas, porém, não há consenso sobre o papel da micróglia. As moléculas sintetizadas por essas células e o seu padrão de expressão podem mudar ao longo da evolução da doença (MINGHETTI, 2005). Considera-se a possibilidade do seu papel inicial ser benéfico, fagocitando restos celulares e GAGs da matriz extracelular. Entretanto, a micróglia apresenta modificações com a progressão da patologia. A ativação excessiva e o envelhecimento são dois fatores comprovados de ativação patológica de fagócitos passíveis de desencadear danos.

Trabalhos sugerem que os GAGs possuam propriedades antioxidantes (PRESTI & SCOTT, 1994; ALBERTINI *et al.*, 1999; ARAI *et al.*, 1999). Estudos *in vitro* com fibroblastos normais mostraram que heparan sulfato e dermatan sulfato têm pouca atividade antioxidante (CAMPO *et al.*, 2004), protegendo as células do dano induzido por ferro e cobre. As implicações desses achados para a MPS I ainda não foram estudadas.

É importante ressaltar o papel do dano tecidual como promotor do estresse oxidativo. Desta forma, a causa primária da patologia, o acúmulo de GAGs, poderia ser a causa da alteração do equilíbrio oxidativo. Em segundo lugar, indaga-se sobre a real influência do desequilíbrio oxidativo no desenvolvimento da patologia. As células podem aumentar as defesas antioxidantes e, caso o estresse seja neutralizado, não ocorreria contribuição do desequilíbrio oxidativo para a doença. Se o estresse ocorrer na fase final da doença, geralmente por danos aos tecidos causados pela patologia, ela poderia não ter contribuição significativa ou poderia agravar ainda mais o dano. Caso o estresse oxidativo

ocorra no estágio inicial da doença, sem defesas antioxidantes adequadas, poderia haver uma contribuição significativa para o desenvolvimento da patologia.

É importante ressaltar a existência de diferentes biomarcadores de estresse oxidativo para tipos distintos de danos a biomoléculas. A utilização desses marcadores não exclui a possibilidade de ocorrência não detectada de outros danos, o que poderia explicar a ausência de dano ao telencéfalo. Estudos com marcadores distintos poderiam contribuir para melhor entendimento da doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBERTINI R.; DE LUCA G.; PASSI A.; MORATTI R. & ABUJA P. M. Chondroitin-4-sulfate protects high-density lipoprotein against copper-dependent oxidation. *Arch Biochem Biophys*, 365(1): 143-149, 1999.
2. ARAI H.; KASHIWAGI S.; NAGASAKA Y.; UCHIDA K.; HOSHII Y. & NAKAMURA K. Oxidative modification of apolipoprotein E in human very-low-density lipoprotein and its inhibition by glycosaminoglycans. *Arch Biochem Biophys*, 367(1): 1-8, 1999.
3. ARIKAWA-HIRASAWA E.; WILCOX W. R. & YAMADA Y. Dyssegmental dysplasia, Silverman-Handmaker type: unexpected role of perlecan in cartilage development. *Am J Med Genet*, 106(4): 254-257, 2001.
4. ARIKAWA-HIRASAWA E. & YAMADA Y. Roles of perlecan in development and disease: studies in knockout mice and human disorders. *Seikagaku*, 73(10): 1257-1261, 2001.
5. AULA P.; RAPPEL J. & ANDERSSON C. Distribution of cytoplasmatic vacuoles in blood T and B lymphocytes in two lysosomal disorders. *Virchows Arch B Cell Pathol*, 18(4): 263-271, 1975.
6. BAHR B. A. & BENDISKE J. The neuropathogenic contributions of lysosomal dysfunction. *J Neurochem*, 83(3): 481-489, 2002.
7. BASCUNAN-CASTILLO E. C.; ERICKSON R. P.; HOWISON C. M.; HUNTER R. J.; HEIDENREICH R. H.; HICKS C.; TROUARD T. P. & GILLIES R. J. Tamoxifen and vitamin E treatments delay symptoms in the mouse model of Niemann-Pick C. *J Appl Genet*, 45(4): 461-467, 2004.
8. BAUDRY M.; YAO Y.; SIMMONS D.; LIU J. & BI X. Postnatal development of inflammation in a murine model of Niemann-Pick type C disease: immunohistochemical observations of microglia and astroglia. *Exp Neurol*, 184(2): 887-903, 2003.
9. BERNFIELD M.; GOTTE M.; PARK P. W.; REIZES O.; FITZGERALD M. L.; LINCECUM J. & ZAKO M. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem*, 68: 729-777, 1999.
10. BRUCK W.; GOEBEL H. H. & DIENES P. B and T lymphocytes are affected in lysosomal disorders--an immunoelectron microscopic study. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 17(3): 219-222, 1991.

11. CAMPO G. M.; D'ASCOLA A.; AVENOSO A.; CAMPO S.; FERLAZZO A. M.; MICALI C.; ZANGHI L. & CALATRONI A. Glycosaminoglycans reduce oxidative damage induced by copper (Cu²⁺), iron (Fe²⁺) and hydrogen peroxide (H₂O₂) in human fibroblast cultures. *Glycoconj J*, 20(2): 133-141, 2004.
12. CHUNG S.; MA X.; LIU Y.; LEE D.; TITTIGER M. & PONDER K. P. Effect of neonatal administration of a retroviral vector expressing alpha-L-iduronidase upon lysosomal storage in brain and other organs in mucopolysaccharidosis I mice. *Mol Genet Metab*, 90(2): 181-192, 2007.
13. CLARKE L. A.; RUSSELL C. S.; POWNALL S.; WARRINGTON C. L.; BOROWSKI A.; DIMMICK J. E.; TOONE J. & JIRIK F. R. Murine mucopolysaccharidosis type I: targeted disruption of the murine alpha-L-iduronidase gene. *Hum Mol Genet*, 6(4): 503-511, 1997.
14. CONSIGLIO A.; QUATTRINI A.; MARTINO S.; BENSADOUN J. C.; DOLCETTA D.; TROJANI A.; BENAGLIA G.; MARCHESINI S.; CESTARI V.; OLIVERIO A.; BORDIGNON C. & NALDINI L. In vivo gene therapy of metachromatic leukodystrophy by lentiviral vectors: correction of neuropathology and protection against learning impairments in affected mice. *Nat Med*, 7(3): 310-316, 2001.
15. CONSTANTOPOULOS G.; IQBAL K. & DEKABAN A. S. Mucopolysaccharidosis types IH, IS, II, and IIIA: glycosaminoglycans and lipids of isolated brain cells and other fractions from autopsied tissues. *J Neurochem*, 34(6): 1399-1411, 1980.
16. CONSTANTOPOULOS G.; SHULL R. M.; HASTINGS N. & NEUFELD E. F. Neurochemical characterization of canine alpha-L-iduronidase deficiency disease (model of human mucopolysaccharidosis I). *J Neurochem*, 45(4): 1213-1217, 1985.
17. DEKABAN A. S. & CONSTANTOPOULOS G. Mucopolysaccharidosis type I, II, IIIA and V. Pathological and biochemical abnormalities in the neural and mesenchymal elements of the brain. *Acta Neuropathol*, 39(1): 1-7, 1977.
18. DESMARIS N.; VEROT L.; PUECH J. P.; CAILLAUD C.; VANIER M. T. & HEARD J. M. Prevention of neuropathology in the mouse model of Hurler syndrome. *Ann Neurol*, 56(1): 68-76, 2004.
19. ESKELINEN E. L.; TANAKA Y. & SAFTIG P. At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol*, 13(3): 137-145, 2003.
20. FUTERMAN A. H. & VAN MEER G. The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(7): 554-565, 2004.
21. GINSBERG S. D.; GALVIN J. E.; LEE V. M.; RORKE L. B.; DICKSON D. W.; WOLFE J. H.; JONES M. Z. & TROJANOWSKI J. Q. Accumulation of intracellular

amyloid-beta peptide (A beta 1-40) in mucopolysaccharidosis brains. *J Neuropathol Exp Neurol*, 58(8): 815-824, 1999.

22. GROFFEN A. J.; VEERKAMP J. H.; MONNENS L. A. & VAN DEN HEUVEL L. P. Recent insights into the structure and functions of heparan sulfate proteoglycans in the human glomerular basement membrane. *Nephrol Dial Transplant*, 14(9): 2119-2129, 1999.

23. HALLIWELL B. & GUTTERIDGE J. M. C. Free radicals in biology and medicine. 3a ed., Oxford University Press, 1999.

24. HARTUNG S. D.; FRANDBEN J. L.; PAN D.; KONIAR B. L.; GRAUPMAN P.; GUNTHER R.; LOW W. C.; WHITLEY C. B. & MCIVOR R. S. Correction of metabolic, craniofacial, and neurologic abnormalities in MPS I mice treated at birth with adeno-associated virus vector transducing the human alpha-L-iduronidase gene. *Mol Ther*, 9(6): 866-875, 2004.

25. HOCH W. Formation of the neuromuscular junction. Agrin and its unusual receptors. *Eur J Biochem*, 265(1): 1-10, 1999.

26. IOZZO R. V. Heparan sulfate proteoglycans: intricate molecules with intriguing functions. *J Clin Invest*, 108(2): 165-167, 2001.

27. IZQUIERDO I. & MEDINA J. H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem*, 68(3): 285-316, 1997.

28. JEYAKUMAR M.; DWEK R. A.; BUTTERS T. D. & PLATT F. M. Storage solutions: treating lysosomal disorders of the brain. *Nat Rev Neurosci*, 6(9): 713-725, 2005.

29. 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*, 126(Pt 4): 974-987, 2003.

30. JORDAN M. C.; ZHENG Y.; RYAZANTSEV S.; ROZENGURT N.; ROOS K. P. & NEUFELD E. F. Cardiac manifestations in the mouse model of mucopolysaccharidosis I. *Mol Genet Metab*, 86(1-2): 233-243, 2005.

31. JOURNET A.; CHAPEL A.; KIEFFER S.; ROUX F. & GARIN J. Proteomic analysis of human lysosomes: application to monocytic and breast cancer cells. *Proteomics*, 2(8): 1026-1040, 2002.

32. KIESEIER B. C.; WISNIEWSKI K. E. & GOEBEL H. H. The monocyte-macrophage system is affected in lysosomal storage diseases: an immunoelectron microscopic study. *Acta Neuropathol*, 94(4): 359-362, 1997.

33. LAPLANTE J. M.; FALARDEAU J.; SUN M.; KANAZIRSKA M.; BROWN E. M.; SLAUGENHAUPT S. A. & VASSILEV P. M. Identification and characterization of the single channel function of human mucopolipin-1 implicated in mucopolipidosis type IV, a disorder affecting the lysosomal pathway. *FEBS Lett*, 532(1-2): 183-187, 2002.
34. MCGAUGH J. L. Memory--a century of consolidation. *Science*, 287(5451): 248-251, 2000.
35. MINGHETTI L. Role of inflammation in neurodegenerative diseases. *Curr Opin Neurol*, 18(3): 315-321, 2005.
36. MYEROWITZ R.; LAWSON D.; MIZUKAMI H.; MI Y.; TIFFT C. J. & PROIA R. L. Molecular pathophysiology in Tay-Sachs and Sandhoff diseases as revealed by gene expression profiling. *Hum Mol Genet*, 11(11): 1343-1350, 2002.
37. MYEROWITZ R. & NEUFELD E. F. Maturation of alpha-L-iduronidase in cultured human fibroblasts. *J Biol Chem*, 256(6): 3044-3048, 1981.
38. NEUFELD E. F. & MUENZER E. The Mucopolysaccharidosis, in: SCRIVER, C. R., SLY W. S., CHILDS B., BEAUDET A. L., VALLE D., KINZLER K. W. & VOGELSTEIN B. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. 8a ed., New York, McGraw-Hill, Cap. 78, 3241-3452, 2001.
39. NEUMANN H. Microglia: a cellular vehicle for CNS gene therapy. *J Clin Invest*, 116(11): 2857-2860, 2006.
40. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(4): 1902-1907, 2003.
41. PEDCHENKO T. V. & LEVINE S. M. IL-6 deficiency causes enhanced pathology in Twitcher (globoid cell leukodystrophy) mice. *Exp Neurol*, 158(2): 459-468, 1999.
42. PELLE D.; RIEBELING C.; VAN ECHTEN-DECKERT G.; SANDHOFF K. & FUTERMAN A. H. Reduced rates of axonal and dendritic growth in embryonic hippocampal neurones cultured from a mouse model of Sandhoff disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 29(4): 341-349, 2003.
43. PRESTI D. & SCOTT J. E. Hyaluronan-mediated protective effect against cell damage caused by enzymatically produced hydroxyl (OH.) radicals is dependent on hyaluronan molecular mass. *Cell Biochem Funct*, 12(4): 281-288, 1994.
44. QUEVEDO J.; VIANNA M. R.; MARTINS M. R.; BARICHELLO T.; MEDINA J. H.; ROESLER R. & IZQUIERDO I. Protein synthesis, PKA, and MAP kinase are differentially involved in short- and long-term memory in rats. *Behav Brain Res*, 154(2): 339-343, 2004.

45. RAMPON C.; TANG Y. P.; GOODHOUSE J.; SHIMIZU E.; KYIN M. & TSIEN J. Z. Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nat Neurosci*, 3(3): 238-244, 2000.
46. ROESLER R.; SCHRODER N.; VIANNA M. R.; QUEVEDO J.; BROMBERG E.; KAPCZINSKI F. & FERREIRA M. B. Differential involvement of hippocampal and amygdalar NMDA receptors in contextual and aversive aspects of inhibitory avoidance memory in rats. *Brain Res*, 975(1-2): 207-213, 2003.
47. RUSSELL C.; HENDSON G.; JEVON G.; MATLOCK T.; YU J.; AKLUJKAR M.; NG K. Y. & CLARKE L. A. Murine MPS I: insights into the pathogenesis of Hurler syndrome. *Clin Genet*, 53(5): 349-361, 1998.
48. SERTIE A. L.; SOSSI V.; CAMARGO A. A.; ZATZ M.; BRAHE C. & PASSOS-BUENO M. R. Collagen XVIII, containing an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth, plays a critical role in the maintenance of retinal structure and in neural tube closure (Knobloch syndrome). *Hum Mol Genet*, 9(13): 2051-2058, 2000.
49. TANG Y. P.; SHIMIZU E.; DUBE G. R.; RAMPON C.; KERCHNER G. A.; ZHUO M.; LIU G. & TSIEN J. Z. Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature*, 401(6748): 63-69, 1999.
50. VAN HORSSSEN J.; WESSELING P.; VAN DEN HEUVEL L. P.; DE WAAL R. M. & VERBEEK M. M. Heparan sulphate proteoglycans in Alzheimer's disease and amyloid-related disorders. *Lancet Neurol*, 2(8): 482-492, 2003.
51. VILLANI G. R.; GARGIULO N.; FARAONIO R.; CASTALDO S.; GONZALEZ Y. R. E. & DI NATALE P. Cytokines, neurotrophins, and oxidative stress in brain disease from mucopolysaccharidosis IIIB. *J Neurosci Res*, 85(3): 612-622, 2007.
52. WADA R.; TIFFT C. J. & PROIA R. L. Microglial activation precedes acute neurodegeneration in Sandhoff disease and is suppressed by bone marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(20): 10954-10959, 2000.
53. WALKLEY S. U. Secondary accumulation of gangliosides in lysosomal storage disorders. *Semin Cell Dev Biol*, 15(4): 433-444, 2004.
54. WALKLEY S. U.; BAKER H. J.; RATTAZZI M. C.; HASKINS M. E. & WU J. Y. Neuroaxonal dystrophy in neuronal storage disorders: evidence for major GABAergic neuron involvement. *J Neurol Sci*, 104(1): 1-8, 1991.
55. WALKLEY S. U.; HASKINS M. E. & SHULL R. M. Alterations in neuron morphology in mucopolysaccharidosis type I. A Golgi study. *Acta Neuropathol*, 75(6): 611-620, 1988.
56. WALLACE B. G. Agrin-induced specializations contain cytoplasmic, membrane, and extracellular matrix-associated components of the postsynaptic apparatus. *J Neurosci*, 9(4): 1294-1302, 1989.

57. WRAITH J. E. The clinical presentation of lysosomal storage disorders. *Acta Neurol Taiwan*, 13(3): 101-106, 2004.

CURRICULUM VITAE RESUMIDO

REOLON G.K

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Gustavo Kellermann Reolon

Local e data de nascimento: Porto Alegre, RS, Brasil – 14/12/1982

Endereço profissional: Avenida Sarmiento Leite, 500. 90041-970, Porto Alegre

Telefone profissional: (51)33163892

E-mail: gkreolon@yahoo.com.br

2. FORMAÇÃO

Mestrando em Biologia Celular e Molecular, no Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Em andamento.

2000-2004 Bacharel em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3. Estágios:

Estágio: Estágio de iniciação científica

Período: março de 2004 a dezembro de 2005

Instituição: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Orientador: Rafael Roesler

Bolsa: Propesq

Estágio: Estágio de iniciação científica

Período: novembro de 2003 a fevereiro de 2004

Instituição: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Orientador: Rafael Roesler

Bolsa: Estágio voluntário

Estágio: Estágio de iniciação científica

Período: março de 2001 a outubro de 2003

Instituição: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Orientador: Giancarlo Pasquali

Bolsa: FAPERGS

Estágio: Estágio de iniciação científica

Período: outubro de 2000 a fevereiro de 2001

Instituição: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Orientador: Giancarlo Pasquali

Bolsa: Estágio voluntário

4. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

1. MACHADO, M. S.; ROSA, R. M.; DANTAS, A. S.; **REOLON, G. K.**; APPELT H. R.; BRAGA, A. L.; HENRIQUES, J. A. & ROESLER, R. An organic selenium compound attenuates apomorphine-induced stereotypy in mice. *Neurosci Lett*, 27;410(3):198-202, 2006.

2. REIRIZ, A. B.; **REOLON, G. K.**; PREISLER T.; ROSADO, J. O.; HENRIQUES, J. A.; ROESLER, R. & SCHWARTSMANN G. Cancer chemotherapy and cognitive function in rodent models: memory impairment induced by cyclophosphamide in mice. *Clin Cancer Res*, 15;12(16):5000, 2006.

3. **REOLON, G. K.**; BRAGA L. M.; LUFT, T.; HENRIQUES, J. A.; NARDI, N. B. & ROESLER, R. Long-term memory for aversive training is impaired in *Idua(-/-)* mice, a genetic model of mucopolysaccharidosis type I. *Brain Res*, 1076(1):225-230, 2006.

4. ROESLER, R.; **REOLON, G. K.**; LUFT, T.; MARTINS, M. R.; SCHRODER, N.; VIANNA, M. R. & QUEVEDO J. NMDA receptors mediate consolidation of contextual memory in the hippocampus after context preexposure. *Neurochem Res*, 30(11):1407-1411, 2005.