

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

INVESTIGAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE, PERFIL INFLAMATÓRIO
E DANO AO DNA EM PACIENTES COM DOENÇA DE GAUCHER TRATADOS
COM A TERAPIA DE REPOSIÇÃO ENZIMÁTICA

ELIAS TURCATEL

ORIENTADORA: Prof^ª. Dra Angela T.S. Wyse
CO-ORIENTADORA: Prof^ª. Dra Janice C. Coelho

Porto Alegre 2015

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

INVESTIGAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE, PERFIL INFLAMATÓRIO
E DANO AO DNA EM PACIENTES COM DOENÇA DE GAUCHER TRATADOS
COM A TERAPIA DE REPOSIÇÃO ENZIMÁTICA

ELIAS TURCATEL

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica da
Universidade Federal do Rio Grande
do Sul, como requisito para a obtenção
de título de Mestre em Bioquímica.

ORIENTADORA: Prof^ª. Dra Angela T.S. Wyse

Co-orientadora: Prof^ª. Dra Janice C. Coelho

Porto Alegre 2015

Agradecimentos

À minha orientadora, Prof^a Dra. Angela T. S. Wyse, pela confiança e competência, por todos esses anos de orientação que contribuíram muito para meu crescimento pessoal e profissional.

À minha co-orientadora, Prof^a Dra. Janice C. Coelho, que contribuiu muito com meu trabalho. Agradeço muito a co-orientação do trabalho.

Aos meus colegas de laboratório: Cassi, Bruna, Paula, Aline, Emi, Jana, Tiago, Felipe, Samanta e Eduardo pelas contribuições, amizade e excelente convívio, fazendo todos esses anos extremamente agradáveis e divertidos. Um agradecimento especial aos colegas: André Felipe, Bruna S e Paula Pierozan, que auxiliaram no desenvolvimento do estudo.

Aos meus pais, Sérgio e Elga, e meu irmão, Ricardo, que com muito carinho e amor puderam me apoiar nas decisões mais importantes da minha vida.

Aos meus amigos Tatiana e Thiago, pelos grandes momentos de descontração, à grande amiga Claudete Tres, que desde sempre foi como uma mãe e tornarem os momentos muito mais descontraídos e a minha tia Helza pelos ensinamentos e pela paciência.

Aos colegas de departamento, em especial o laboratório 25.

À Genzyme do Brasil, pelo suporte.

À Prof^a Dra. Maria Lúcia Pedroso, que contribuiu com a aquisição das amostras.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) pela oportunidade de realizar o estudo.

À CAPES e CNPq por custear a pesquisa.

À todos muito obrigado.

“VENI, VIDI, VICI”
Julio César

Sumário

Resumo	VII
Abstract	IX
Lista de abreviaturas	X
Lista de figuras	XI
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Erros Inatos do Metabolismo.....	1
1.2 Doença de Gaucher	2
1.2.1 Diagnóstico e Tratamento.....	4
1.3 Estresse Oxidativo.....	5
1.4 Homeostasia do óxido nítrico e inflamação.....	7
2. OBEJETIVO GERAL.....	8
2.1 Objetivo Específicos	9
3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS E RESULTADOS	10
3.1 Artigo Científico	11
4. DISCUSSÃO.....	37
5. CONCLUSÕES.....	42
6. PERSPECTIVAS	43
7. REFERÊNCIAS	44
8. APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	53

Resumo

A doença de Gaucher (DG) é uma doença de armazenamento lisossômico causada por uma mutação no gene que codifica a enzima β -glicosidase, a deficiência dessa enzima provoca o acúmulo de glicosilceramidas nos lisossomos do sistema retículo endotelial. A DG é divididas em três tipos, o tipo I é a forma mais branda e mais prevalente da doença. As consequências desta doença incluem hepatoesplenomegalia, deficiências ósseas, manifestações hematológicas e neurodegeneração, porém os mecanismos fisiopatológicos ainda não estão totalmente esclarecidos. Portanto, a fim de esclarecer a fisiopatologia envolvida na DG, o presente estudo avaliou a produção de espécies reativas de oxigênio, as atividades da superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, os níveis de nitritos, os imunocorrelatos de iNOS e de pNF-kB, os danos ao DNA e o conteúdo sulfidrilas em diferentes componentes da sangue de indivíduos afetados. Os pacientes foram divididos em dois grupos: controles com diagnóstico negativo para DG e pacientes diagnosticados com DG tipo I, tratados com terapia de reposição enzimática. O sangue foi coletado 5 minutos antes do tratamento. Os resultados mostraram que a atividade de superóxido dismutase foi reduzida em eritrócitos, enquanto atividade da glutathione peroxidase foi aumentada no plasma de pacientes com DG. Os níveis de nitritos e o imunocorrelato pNF-kB estavam significativamente aumentados no plasma e leucócitos, respectivamente. Ensaio do cometa foi realizada no sangue total e indicou danos no DNA. Observou-se também um dano oxidativo a proteínas, devido a redução do conteúdo sulfidrilas em plasma e eritrócitos. Nossos resultados sugerem que pacientes com DG, mesmo em tratamento, apresentam alteração no status oxidativo/nitrativo e parâmetros inflamatórios, bem como evidências de danos ao DNA no sangue, o que poderia ser, pelo menos em parte, associado à fisiopatologia da DG.

Palavras-chave: doença lisossômica de depósito, dano ao DNA, inflamação, estresse oxidativo.

Abstract

Gaucher disease (GD) is a lysosomal storage disorder caused by a mutation in the gene encoding β -glucosidase enzyme, this enzyme deficiency leads to glucosylceramides accumulation in the lysosomes of the reticulum endothelial system. GD divided into three types, where in type I is the mildest and most prevalent form of disease. The consequences of this disease include hepatosplenomegaly, bone impairments, hematologic manifestations and neurodegeneration, but pathophysiology mechanisms are still not well elucidated. Therefore, in order to clarify the pathophysiology involved in GD, the present study evaluated reactive oxygen species production, superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities, nitrite levels, immunocontent of iNOS and pNF- κ B, DNA damage and sulfhydryl content in different components of blood from affected individuals. Patients were divided into two groups: controls with negative diagnosis to GD and patients diagnosed to GD type I treated with enzyme replacement therapy. Blood were collected 5 minutes before the treatment. Results showed that superoxide dismutase activity was reduced in erythrocytes while glutathione peroxidase activity was increased in plasma of GD patients. Nitrite levels and pNF- κ B immunocontent were significantly increased in plasma and leukocytes, respectively. Comet assay was performed in whole blood and indicated DNA damage. We also observed an oxidative damage to proteins elicited by decreased sulfhydryl content in plasma and erythrocytes. Our findings suggest that patients with GD, even in treatment, have altered oxidative/nitrative status and inflammatory parameters, as well as evidence of DNA damage in blood, what could be at least in part, associated with pathophysiology of GD.

Keywords: lysosomal storage disease, DNA damage, inflammation, oxidative stress.

Lista de abreviaturas

CAT: Catalase

DG: Doença de Gaucher

DLDs: Doenças Lisossômicas de Depósito

EIM: Erros Inatos do Metabolismo

ERN: Espécies Reativas de Nitrogênio

EROs: Espécies Reativas de Oxigênio

FD -%: Frequência da Dano

GSH-Px: Glutathione Peroxidase

ID: Índice de Dano

iNOS: Óxido Nítrico Sintase Induzida

NF- κ B: Fator Nuclear Kappa B

NO: Óxido Nítrico

SNC: Sistema Nervoso Central

SOD: Superóxido Dismutase

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral alfa

TRE: Terapia de Reposição Enzimática

Lista de figuras

Introdução

Figura I

Figura I. Fotografia da célula de Gaucher, citoplasma com aspecto de “papel de seda” amassado, coloração Hematoxilina-Eosina.

Resultados

Figure 1

Effect of patients with GD on Nitrite levels in plasma (A) and imunocontent of iNOS in leukocytes (B). Results are expressed as means \pm SD for 8 patients in each group when analyzing niritries, and 6 patients in each group when analyzing imunocontent of iNOS. Different from control, $**p < 0.01$ (Student's t-test).

Figure 2

Effect of patients with GD on imunocontent of pNF- κ B in leucocytes. Results are expressed as means \pm SD for 6 patients in each group. Different from control, $**p < 0.01$ (Student's t-test).

Figure 3

Effect of patients with GD on frequency of DNA damage (A) and DNA damage index (B) in whole blood. Results are expressed as means \pm SD for ten patients in each group. Different from control, $***p < 0.001$ (Student's t-test).

Figure 4

Effect of patients with GD on sulfhydryl content in plasma (A) and erythrocytes (B). Results are expressed as means \pm SD for ten patients in each group. Different from control, $*p < 0.05$; $**p < 0.01$ (Student's t-test).

1 INTRODUÇÃO

1.1 Erros Inatos do Metabolismo

Os erros inatos do metabolismo (EIM) são definidos como doenças que resultam da falta ou deficiência na atividade de proteínas ou enzimas específicas. Como consequência, pode haver um bloqueio em rotas metabólicas, levando a um acúmulo de intermediários metabólicos (Ballabio, 2009). Os EIM podem apresentar formas graves, moderadas e leves para uma mesma doença (Chen & Wang, 2008; Bodamer & Hung 2010). A incidência de EIM na população é rara, em geral, 1:1000 nascidos vivos (Alfadhel et al., 2013).

Os EIM são classificados em 3 grupos, o grupo I corresponde as doenças lisossomais e peroxissomais, a Doença de Gaucher (DG) é um exemplo de doença pertencente ao grupo I. O grupo II corresponde aos defeitos no metabolismo intermediário, onde se destacam as aminoacidopatias, os defeitos dos ácidos orgânicos e do ciclo da uréia e as intolerâncias aos açúcares. O grupo III corresponde às deficiências na produção ou utilização de energia, nesse grupo estão defeito de β -oxidação de ácidos graxos, doenças mitocôndrias e doenças de depósito de glicogênio (Nussbaum R, 2008).

Atualmente já foram descritas mais de 50 doenças lisossômicas de depósito (DLDs). As DLDs são distúrbios metabólicos hereditários que resultam da deficiência de enzimas lisossomais (Staretz-Chacham et al., 2009). As DLDs são classificadas de acordo com substrato acumulado no organismo e são divididas em: mucopolissacaridoses, esfingolipidoses, mucolipidoses, lipidoses, glicoproteinoses, glicogenoses e lipofucinoses (Neufeld 1991).

1.2 Doença de Gaucher

A DG foi descrita pela primeira vez em 1882, pelo médico francês Philippe Gaucher (Beutler & Grabowski 1995). A DG é considerada uma glicosfingolipidose pertencente ao grupo das DLDs. Na DG ocorre uma mutação no gene que codifica a enzima β -glicosidase, (Hughes & Pastores, 2013). A enzima β -glicosidase hidrolisa a conversão de glicosilceramidas em glicose e ceramidas. As glicosilceramidas encontram-se em todas as membranas celulares, resultando principalmente da decomposição de leucócitos e outras células sanguíneas. Nos pacientes com DG essa conversão ocorre lentamente ou não ocorre, dessa forma, as glicosilceramidas não conseguem atravessar a membrana celular, acumulando-se no interior das células (Wennekes et al., 2009).

O acúmulo de glicosilceramidas ocorre no interior dos lisossomos do sistema retículo-endotelial (monócitos/macrófagos), formando as “Células de Gaucher” (Figura I), essas células de tamanho aumentado comprometem o funcionamento de órgão como baço, fígado, medula óssea, pulmão e gânglios linfáticos (Chen & Wang, 2008; Bodamer & Hung 2010; Hughes & Pastores, 2013).

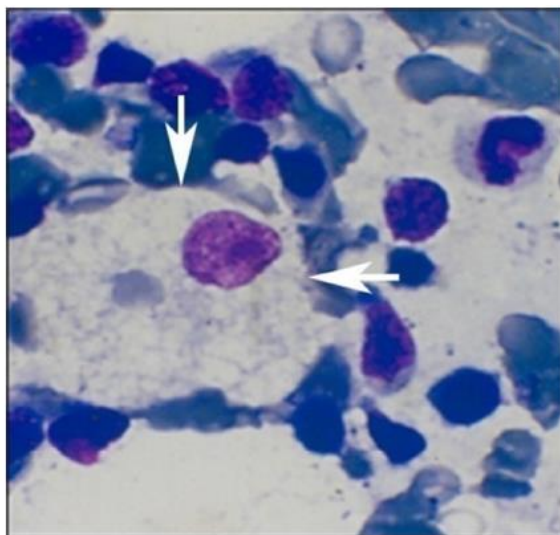


Figura I. Fotografia da célula de Gaucher, citoplasma com aspecto de “papel de seda” amassado, coloração Hematoxilina-Eosina (Nagral 2014).

A DG tem um padrão de herança do tipo autossômico recessivo definida pela presença de dois alelos mutantes para o gene da β -glicosidase, localizado na região q21 do cromossomo 1 (Chen & Wang, 2008; Bodamer & Hung 2010). Mais de 300 mutações já foram descritas para o gene da β -glicosidase, reduzindo totalmente ou parcialmente a atividade da enzima (Grabowski 2008). A DG tem uma incidência de 1:100.000 nascidos vivos, tornando-a a doença mais freqüente do grupo das DLDs (Chen & Wang, 2008).

A DG foi classificada em 3 tipos de acordo com o comprometido do sistema nervoso central. A DG tipo I é a forma mais branda da doença e também a forma mais comum da doença, correspondendo a mais de 90% dos casos diagnosticados (Ficicioglu 2008; Bodamer & Hung 2010). Nesses pacientes não há envolvimento neurológico, por isso também é conhecida como forma não neuropática. Os pacientes com a DG tipo I respondem bem a terapia de reposição enzimática (TRE). Além disso, os pacientes acometidos com essa forma da doença apresentam hepatoesplenomegalia, anemia, trombocitopenia e lesões ósseas (Ficicioglu 2008). Apesar da DG tipo I não haver comprometimento do sistema nervoso central (SNC) é um fator de risco para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como o Parkinson (Altarescu et al., 2014).

A variante tipo II é a variante mais grave da doença, classificada como neuropática aguda, devido ao rápido comprometimento neurológico. Os pacientes acometidos por essa variante sobrevivem até os 2 anos de idade (Chen & Wang, 2008; Bodamer & Hung 2010). A variante tipo III, classificada como neuropática subaguda, possui quadro clínico semelhante a variante do tipo I com envolvimento neurológico. Os pacientes com essa variante podem sobreviver e atingir a segunda década de vida (Chen & Wang, 2008; Bodamer & Hung 2010).

A DG pode prejudicar a qualidade de vida dos pacientes e de suas famílias. O comprometimento ósseo pode ser uma causa muito importante da diminuição na habilidade para executar as atividades normais da vida diária. As complicações podem incluir dor, aguda e/ou crônica, infecções, problemas nos ossos ou nas articulações (Hughes & Pastores, 2013).

1.2.1 Diagnóstico e Tratamento

O diagnóstico da DG pode se realizado por meio da observação microscópica de “células de Gaucher” em aspirado de medula óssea, entretanto o padrão ouro para o diagnóstico da doença é a mensuração da atividade da β -glicosidase nos leucócitos ou em fibroblastos da pele (Staretz-Chacham et al., 2009). A análise molecular dos alelos mutantes para o gene da β -glicosidase serve como verificação do diagnóstico (Aerts et al., 2011). A quitotriosidase é uma enzima plasmática que serve para auxiliar o diagnóstico e monitoramento da DG. Essa enzima apresenta uma atividade aumentada durante a progressão da DG, porém a TRE reduz sua atividade consideravelmente (Aertz et al., 1999).

O tratamento para a DG se baseia na TRE, porém nos subtipos II e III esse tratamento é pouco eficaz, uma vez que o medicamento não atravessa a barreira cérebro-sangue (Desnick & Schuchman, 2012). A TRE teve início com aglucerase (Ceredase®; Genzyme Corporation) em 1991 por meio do estudo de Barton e colaboradores (1991). Nesse estudo foi realizada a infusão intravenosa de β -glicosidase derivada de macrófagos de placenta humana, os 12 pacientes do estudo obtiveram melhora clínica dos sinais da DG. Ainda na década de 90, foi desenvolvido outro medicamento a imiglucerase (Cerezyme®), também produzido pela Genzyme Corporation), uma forma recombinante da enzima produzida por meio de células de

ovário de hamster chineses. A imiglucerase é um dos medicamentos mais utilizados no Brasil e no mundo para tratamento da DG (Ministério da Saúde 2011; Zimran 2012). Além da aglucerase e da imglucerase, ainda existem mais dois medicamentos, a alfa velaglicerase e a taliglucerase alfa (Zimran 2012). Além da TRE existem ainda mais dois tipos de tratamento, a terapia de redução de substrato e a terapia com chaperonas (Ficicioglu 2008; Zimran 2012).

1.3 Estresse Oxidativo

Muitos estudos têm correlacionado os EIM com o aumento de espécies reativas de oxigênio e deficiência na atividade de enzimas antioxidantes, contribuindo para o estresse oxidativo. Evidências sugerem que o estresse oxidativo possa ser um importante fator patológico de inúmeros EIM (Guire et al., 2009; Stefanello et al., 2009; Rocha & Martins 2012; Vázquez et al., 2012; Vanzin et al., 2011).

O estresse oxidativo é definido como sendo o desequilíbrio entre os mecanismos pró-oxidantes e antioxidantes (Halliwell 2009). Contribuem para os mecanismos pró-oxidantes diversas espécies de oxigênio como os radicais superóxido (O_2^-), hidroxil (OH^-), peroxil (RO_2^-), hidroperoxil (HRO_2^-) e, ainda, algumas espécies não-radicaais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Também as espécies de nitrogênio, representadas por radicais como o óxido nítrico (NO) e o dióxido de nitrogênio (NO_2^-), e espécies não-radicaais como o peroxinitrito ($ONOO^-$), óxido nitroso (HNO_2^-) podem também contribuir para os mecanismos pró-oxidantes (Halliwell 2009).

As Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e as Espécies Reativas de Nitrogênio (ERNs), em condições fisiológicas, podem ser formadas pelo metabolismo do organismo, entretanto são controladas pelas defesas antioxidantes (Halliwell 2009). Dentre as defesas antioxidantes temos as defesas enzimáticas, que podemos destacar as

enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GSH-Px).

A SOD converte o ânion superóxido a peróxido de hidrogênio e pode ser classificada em três grupos. A SOD1 ou CuZn-SOD está presente no citoplasma celular, já a SOD2 ou Mn-SOD está presente no interior das mitocôndrias, enquanto a SOD3 ou CuZn-SOD está presente no meio extracelular, como por exemplo plasma (Kwon et al., 2012; Lee & Won 2014). A CAT é outra importante enzima antioxidante, sua ação é principalmente intracelular. Tanto a CAT quanto a GSH-Px convertem o peróxido de hidrogênio a água e oxigênio, porém a atividade da CAT é na matriz mitocondrial enquanto a GSH-Px está presente tanto no meio intracelular quanto no plasma sanguíneo (Jacobson et al., 2007; Lee & Won 2014).

Entre as defesas não enzimáticas podemos citar as vitaminas C, D e E, a glutathiona, além elementos traços como zinco, selênio e outros (Johansen, 2005). As espécies reativas formadas em excesso têm a capacidade de oxidar moléculas biológicas, promovendo lipoperoxidação, além de inativarem ou alterarem a função de proteínas estruturais (Halliwell 2009). Também podem reagir com o DNA e o RNA, levando a mutações somáticas e a distúrbios de transcrição (Delanty, 1998). Uma das técnicas utilizadas para detecção de danos ao DNA é o teste do cometa. Nesse teste é feita aplicações de corrente elétrica sobre as lâminas contendo as células em estudo. Os fragmentos de DNA são transportados para fora do núcleo quando as células possuem danos ao DNA, e dessa forma, pode-se avaliar o índice e a frequência de quebras ao DNA (Santos et al., 2009). A migração deste fragmento utilizando eletroforese gera uma imagem que lembra um cometa com uma cabeça e uma cauda, originando assim o nome do ensaio (Speit et al., 2008).

Este ensaio é amplamente utilizado para a detecção de quebras de fita, ligações cruzadas e sítios álcali-lábeis no DNA nuclear, entretanto este teste não permite diferenciar o sítio aonde o dano ocorreu, ou seja, observamos a mesma morfologia para os três tipos de danos, entretanto acredita-se que caudas muito longas sejam devido ao grau de toxicidade das substâncias as quais as células foram expostas (Ueno et al., 2007). O genoma humano está permanentemente exposto a agentes que danificam o DNA, entre esses agentes pode-se destacar produtos do metabolismo celular, como os espécies reativas, que constituem uma fonte de danos a integridade do DNA mesmo em condições fisiológicas (Liao et al., 2009). Se as lesões ao DNA se não forem reparadas podem provocar uma mutação ou bloqueio da replicação do DNA (Brüning et al., 2014).

A literatura mostra que a deficiência da enzima β -glicosidase em cultura de fibroblastos humanos aumenta a quantidade de espécies reativas (Deganuto et al., 2007). Outro trabalho em pacientes mostra que a deficiência da β -glicosidase altera a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase em eritrócitos (Roversi et al., 2006).

1.4 Homeostasia do óxido nítrico e inflamação

O NO pode ser sintetizado pelo terminal nitrogenado da L-arginina, na presença de oxigênio molecular, formando dessa forma NO e L-citrulina. Essa reação é catalisada pela enzima óxido nítrico-sintase (Wu & Morris 2001, Luiking et al., 2012).

Atualmente existe 3 isoformas descritas da enzima óxido nítrico-sintase. A óxido nítrico-sintase neuronal presente, principalmente, em neurônios e células do SNC e sistema nervoso periférico (Wu & Morris 2001; Starr et al., 2013). A óxido nítrico-sintase endotelial, produzida no endotélio vascular, responsável por inibir a agregação

plaquetária e regular a pressão sanguínea (Luiking et al., 2012). A outra isoforma é a óxido nítrico-sintase induzida (iNOS) a qual é produzida principalmente por citocinas e não depende de cálcio, produz grande quantidade de NO por inibição de enzimas que contenham ferro. O aumento de iNOS pode ser o resultado de uma resposta inflamatória devido a danos teciduais (Janakiram & Rao 2012).

O processo de inflamação é caracterizado por infiltração de células inflamatórias como os monócitos. Durante o processo inflamatório ocorre liberação de citocinas inflamatórias, ativando o Fator Nuclear kappa B (NF-kB) (Brevetti et al., 2010). Em células no estado de homeostase, o NF-kB mantém-se no citoplasma, podendo ser ativado por processos inflamatórios ou radicais livres. A ativação do NF-kB requer fosforilação, permitindo dessa forma a translocação para o núcleo (Zingarelli 2005). O depósito de glicosilceramidas no interior dos macrófagos, principal célula afetada na DG, promove a ativação dessas células (Barak et al., 1999). Os macrófagos ativados produzem NO e citocinas inflamatórias como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), um composto altamente reativo que reage com biomoléculas, promovendo danos oxidativos (Hong et al., 2006; Vitner et al., 2012; Pandey & Grabowski 2013).

2 OBEJETIVO GERAL

Considerando que diversos estudos mostram os efeitos deletérios das EROs e ERNs associados a alterações inflamatórias e danos ao DNA em diversas patologias, incluindo os EIM (Pandey & Grabowski 2013; Halliwell 2009; Vanzin et al., 2014) e que poucos estudos avaliam esses parâmetros em sangue periférico de pacientes diagnosticados com DG tipo 1. O objetivo geral desse trabalho foi investigar alterações oxidativas, inflamatórias e dano ao DNA em sangue periférico de pacientes diagnosticados com DG tipo 1 em tratamento com a TRE.

2.1 Objetivo Específicos

1. Verificar as espécies reativas de oxigênio pela oxidação da 2',7'-diclorofluoresceína (H₂DCF) em plasma de pacientes diagnosticados com DG tipo 1 em tratamento com a TRE;
2. Avaliar a atividade antioxidante da SOD, GSH-Px e CAT em plasma e/ou eritrócitos de pacientes diagnosticados com DG tipo 1 em tratamento com a TRE;
3. Avaliar os níveis de nitritos em plasma e o imunocnteuo de iNOS e de pNF-kB em leucócitos de pacientes diagnosticados com DG tipo 1 em tratamento com a TRE;
4. Verificar o dano a biomoléculas (DNA e proteínas), pelas técnicas do cometa em sangue total e conteúdo de sulfidrilas em plasma e eritrócitos de pacientes diagnosticados com DG tipo 1 em tratamento com a TRE.

3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS E RESULTADOS

Os Procedimentos Experimentais e Resultados serão apresentados na forma de artigo científico intitulado:

Investigation of inflammatory profile, antioxidant capacity and DNA damage in patients with Gaucher disease type I treated with enzyme replacement therapy

Elias Turcatel^a, Bruna M. Schweinberger^a, André Felipe Rodrigues^a, Aline Longoni^a, Paula Pierozan^a, Cristiano Trindade^b, João A.P. Henriques^b, Janice C. Coelho^a, Angela T.S. Wyse^a

Status: A ser submetido

Investigation of inflammatory profile, antioxidant capacity and DNA damage in patients with Gaucher disease type I treated with enzyme replacement therapy

Elias Turcatel^a, Bruna M. Schweinberger^a, André Felipe Rodrigues^a, Paula Pierozan^a, Aline Longoni^a, Cristiano Trindade^b, João A.P. Henriques^b, Janice C. Coelho^a, Angela T.S. Wyse^a

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica. Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

^bInstituto de Educação para Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação Tecnológica – ROYAL Unidade GENOTOX – ROYAL/Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

Address reprint requests to: Dr. Angela T. S. Wyse, Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Ramiro Barcelos, 2600-Anexo, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil, Phone: 55 51 3308 5573, Fax: 55 51 3308 5535, E-mail: wyse@ufrgs.br

Abstract

Objectives: Gaucher disease (GD) is a lysosomal storage disorder caused by a mutation in the gene encoding β -glucosidase, which leads to glucosylceramides accumulation in the lysosomes of the reticulum endothelial system. GD divided into three types, where in type I is the mildest and most prevalent form. The consequences of this disease include hepatosplenomegaly, bone impairments, hematologic manifestations and neurodegeneration, but mechanisms are still not well elucidated. Therefore, in order to clarify the pathophysiology involved in GD, the present study evaluated reactive oxygen species production, superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities, nitrite levels, immunocontent of iNOS and pNF- κ B, DNA damage and sulfhydryl content in different components of blood from affected individuals.

Design and methods: Patients were divided into two groups: controls with negative diagnosis to GD and patients diagnosed to GD type I treated with enzyme replacement therapy. Blood were collected 15 days after the last treatment.

Results: Results showed that superoxide dismutase activity was reduced in erythrocytes while glutathione peroxidase activity was increased in plasma of GD patients. Nitrite levels and pNF- κ B immunocontent were significantly increased in plasma and leukocytes, respectively. Comet assay was performed in whole blood and indicated DNA damage. We also observed an oxidative damage to proteins elicited by decreased sulfhydryl content in plasma and erythrocytes.

Concluions: Our findings suggest that patients with GD, even in treatment, have altered oxidative/nitrative status and inflammatory parameters, as well as evidence of DNA damage in blood, what could be at least in part, associated with pathophysiology of GD.

Keywords: lysosomal storage disease, DNA damage, inflammation, oxidative stress.

Introduction

Gaucher disease (GD) is a genetic disorder, GD is the most prevalent lysosomal storage disease with an estimated incidence rate of approximately 1 in 100,000 live births [1, 2]. It is caused by a mutation in the gene encoding β -glucosidase (EC 3.2.1.45), resulting in glucosylceramides accumulation in the lysosomes of the reticuloendothelial system (monocytes/macrophages). The affected organs include liver, spleen and bone marrow. In this context, hepatosplenomegaly, bone impairments and hematologic manifestations are usually observed. However, it has been reported that GD may also affect the central nervous system (CNS), leading to neurodegeneration [3, 4].

There are 3 types of GD based on the CNS damage. Type I is characterized by the absence of CNS involvement (non-neuropathic form). It is the mildest form of the disease and the most common type, accounting for majority of diagnosed cases [1]. Types II and III affect the CNS and are not responsive to enzyme replacement therapy (ERT), the main treatment for GD type I [2-4]. ERT reduces glucosylceramides deposits within monocytes/macrophages, although there are evidence that patients with GD present altered oxidative status and inflammation even when under treatment [5-7].

The pathophysiology involved in GD is still not completely understood. However, it has been reported the participation of oxidative stress, which is a consequence of an imbalance between the production and detoxification of reactive oxygen species (ROS) by antioxidants. ROS are extremely reactive chemical molecules [8] that may react with proteins, lipids and DNA, leading to damage of these biomolecules that can lead to cell death. In this context, it has been demonstrated that deficiency of β -glucosidase increases the amount of ROS and alters the activities of the antioxidant enzymes catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) in different cells [5, 9].

In addition, studies have suggested that glucosylceramides storage in macrophages of GD patients induces an inflammatory response [10]. Inflammation process is characterized by infiltration of inflammatory cells and release of cytokines and activation of Nuclear Factor Kappa-B (NF- κ B) [11], which plays an important role in transcriptional regulation of many pro-inflammatory genes, such as inducible nitric oxide synthase (iNOS) [12]. This enzyme produces a high rate of nitric oxide (NO) and mediates some diseases such as chronic inflammation and sepsis [13]. However, excessive NO may induce nitrative stress, leading to cell death and tissue injury [14].

To our knowledge there are no studies relating oxidative status, inflammation and biomolecules damage in peripheral blood of patients with GD type I, the objective of this study was to evaluate ROS production, SOD, glutathione peroxidase (GSH-Px) and CAT activities, nitrite levels, immunocontent of iNOS and pNF- κ B, DNA damage and sulfhydryl content in different components of blood from patients with GD type I.

Materials and methods

Ethics statement

This project was approved by the Ethics Committee of Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil (project number 26361). All participants signed informed consent.

Patients

Patients were divided in two groups: patients with negative diagnosis to GD (controls, N=10) and patients diagnosed to GD type I (patients, N=10). All GD patients were being treated with ERT. Diagnosis was defined when β -glucosidase activity was

reduced and chitotriosidase activity was increased, according to Goldim and collaborators 2012 [15]. The ERT é performed twice a month, because of this the blood were collected 15 days before ERT. 3 mL of blood were collected with EDTA and 9mL of blood were collected with heparin anticoagulant. The age of the patients ranged from 15 to 47 years old (table 1). Whole blood, plasma, erythrocytes, and leukocytes were used for analyzes. Plasma was separated by centrifugation at 1550 g for 10 minutes and the supernatant was aliquoted for analyses. The pellet was washed three times with cold saline solution (0.9% sodium chloride). Hemolysate was prepared by the addition of 1 mL of distilled water to 100 µL of washed erythrocytes. Leukocytes were separated according to Skoog & Beck 1956 [16]. All samples were frozen at -80°C.

Fluorescence of Dichlorofluorescein (DCF)

The generation of reactive species was measured in plasma. The method is based on the oxidation of 2'7'-dichlorofluorescein (H₂DCF) [17]. Plasma (60 µL) was incubated for 30 min at 37°C with 240 µL of 100 µM 2'7'-dichlorofluorescein diacetate (H₂DCF-DA) solution in a 96-well plate, in the dark. H₂DCF-DA is cleaved by cellular esterases, resulting in H₂DCF, which is oxidized by reactive species present in samples. The last reaction produces a fluorescent compound namely dichlorofluorescein (DCF), which may be quantified following 488 nm excitation and 525 nm emission. Results were reported as nmol DCF/mg protein.

Superoxide Dismutase Assay

The SOD activity was measured in erythrocytes and plasma. This assay is based on the capacity of pyrogallol to autoxidize. This process is extremely dependent on superoxide, the substrate for SOD. The inhibition of pyrogallol autoxidation occurs in

the presence of SOD, whose activity can be then indirectly measured at 420 nm [18]. SOD activity present in the samples was calculated using a calibration curve performed with purified SOD as standard.

Glutathione Peroxidase Assay

The GSH-Px activity was measured in erythrocytes and plasma. NADPH disappearance was monitored at 340 nm using a double-beam spectrophotometer with temperature control. The reaction medium contained 2 mM glutathione, 0.15 U/ml glutathione reductase, 0.4 mM azide, 0.5 mMtertbutyl-hydroperoxide, and 0.1 mM NADPH. One GSH-Px unit is defined as 1 μ mol of NADPH consumed per minute and the specific activity is represented as units/mg protein [19].

Catalase Assay

CAT activity was measure in erythrocytes. The method used is based on the disappearance of hydrogen peroxide at 240 nm in a reaction medium containing 20 mM hydrogen peroxide, 0.1 % Triton X-100, 10 mM potassium phosphate buffer pH 7.0, and 0.1–0.3 mg protein/mL [20]. One CAT unit is defined as 1 μ mol of hydrogen peroxide consumed per minute, and the results were represented as CAT units/mg protein.

Nitrite Levels

Nitrite levels were measures in plasma. In brief, 100 μ L of plasma was mixed with 100 μ L Griess reagent (1:1 mixture of 1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid and 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride in water) and incubated in 96-well plates during 10 min at room temperature. The absorbance was determined through a

microplate reader at a wavelength of 543 nm. Sodium nitrite standards were used to calculate nitrite levels [21].

Western Blot Analysis

The western blot was performed in leukocytes. Equal amounts of protein from each sample were boiled in buffer [62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% (w/v) SDS, 5% β -mercaptoethanol, 10% glycerol (v/v) Blue 0.002% bromophenol (w/v)] and analyzed in SDS polyacrylamide gel electrophoresis 10% (w/v) (30 μ g total protein/lane) and transferred (Trans-blot SD semidry transfer cell; Bio-Rad, Hercules, CA) to nitrocellulose membranes for 1 hour at 15 V in transfer buffer (48 mM Trizma, 39 mM glycine, 20% methanol, and 0.25% SDS). Equal loading of the samples was confirmed by Ponceau staining. The following monoclonal antibodies were used: anti-iNOS (1:5000) and pNF- κ B (1:2000). β -actin (1:1000) was used as a loading control. After incubation overnight with primary antibody at room temperature, membranes were washed and incubated with peroxidase-conjugated anti-rabbit immunoglobulin (IgG) at a dilution of 1:5000 for 2 h. The blot was developed with the chemiluminescence ECL kit (Amersham). Then, the films were scanned and the bands were quantified using AlphaEasyFC Software.

Alkaline Comet Assay

The Comet assay was performed in leukocytes of peripheral blood. A standard protocol for preparation and analysis was adopted. The slides were prepared by mixing 5 μ L peripheral blood sample with 95 μ L of 0.75% low melting point agarose. The mixture (blood/agarose) was added to a fully frosted microscope slide coated with a layer of 500 μ L of normal melting agarose (1%). After solidification, the cover slip was

gently removed and the slides were placed in lyses solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, and 0 mM Tris, pH 10.0–10.5, with freshly added 1% Triton X-100 and 10% DMSO) for one day. Subsequently, the slides were incubated in freshly made alkaline buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH 13) for 20 min at 4 °C. The DNA was electrophoresed during 20 min at 25 V (0.90 V/cm) and 300 mA, after electrophoresed the slides was neutralized with Tris buffer (0.4 M; pH 7.5). Finally, the DNA was stained with silver nitrate [22]. The slides were coded for blind analysis. After electrophoresis, neutralized and stained comets (100 randomly cells) were blindly analyzed by optical microscopy. Cells were scored from 0 (undamaged) to 4 (maximally damaged), according to the tail intensity (size and shape), resulting in a single DNA damage score for each cell, and, consequently, for each group. Therefore, the damage index (DI) is based on the length of migration and on the amount of DNA in the tail and is considered a sensitive measurement of DNA damage. The DI ranges from 0 (100 completely undamaged cells \times 0) to 400 (100 cells with maximum damage \times 4). The damage frequency (DF – %) was calculated based on the number of cells with tails *versus* those without tails.

Determination of Sulfhydryl Content

Sulfhydryl content was measured in erythrocytes and plasma. This method is based on the reduction of 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) by thiols, which become oxidized (disulfide), leading to the generation of a yellow derivative namely thionitrobenzoic acid (TNB), whose absorption is spectrophotometrically quantified at 412 nm [23]. 50 μ L of plasma were added to 1 mL of PBS buffer pH 7.4 containing 1 mM EDTA. Next, 30 μ L of 10 mM DTNB, (prepared in a 0.2 M potassium phosphate solution pH 8.0) were added. After 30 min incubation time in the dark and at room

temperature, the absorption was determined at 412 nm through a Beckman DU1 640 spectrophotometer. The sulfhydryl content is inversely related to proteins oxidative damage. Results were reported as nmol TNB/mg protein.

Protein Determination

Protein was determined according to Lowry and collaborators 1951 [24]. Bovine serum albumin was used as standard.

Statistical Analysis

The data were gathered in a database, then analyzes were performed using the Grafphad Prism 6. Statistical differences were considered significant when $p < 0.05$. Statistical analysis was performed using the Student's t-test for independent samples.

Results

This study was conducted in patients with GD, the variation in age, sex, splenectomized patients and the duration of treatment are listed in Table 1.

Antioxidants enzymes activity and ROS quantification

The activities of the antioxidant enzymes CAT, SOD and GSH-Px were evaluated in erythrocytes (Table 2). We observed that SOD activity was reduced in erythrocytes of GD patients [T(16)=3.279; $p < 0.01$]. While GSH-Px [T(17)= 0.7027; $p > 0.05$] and CAT activity was not altered [T(17)=0.9226; $p > 0.05$].

Plasma ROS production were measured by DCF levels, but we did no observe alteration in this parameter when compared with controls [T(16)=0.2035; $p > 0.05$].

Inflammatory analyzes

We determined the levels of nitrites and iNOS immunocontent in plasma and leukocytes, respectively. We observed an increase in nitrite levels (Figure 1A) [T(11)=3.437; p <0.01] without changes in iNOS (Figure 1B) [T(10)=1.167; p>0.05].

In addition, we tested pNF- κ B immunocontent and we observed an increase in this parameter as compared to control (Figure 2) [T(8)=3.949; p <0.01].

Biomolecules damage

Biomolecules damage was investigated by comet assay (DNA) and sulfhydryl content (proteins). Regarding to comet assay, we observed an increase in DNA damage frequency (Figure 3A) [T(15)=15.14; p <0.001] and in damage index (Figure 3B) [T(16)=11.23; p <0.001]. Proteins were also affected by GD since sulfhydryl content was reduced in plasma (Figure 4A) [T(17)=2.905; p <0.05] and in erythrocytes (Figure 4B) [T(16)=2.657; p <0.05].

Discussion

GD type 1 is a chronic inflammatory disease with a low frequency in the population and is considered a risk factor for the development of neurodegenerative diseases [4]. The pathophysiologic events of this disorder include the storage of glucosylceramides in macrophages, leading to an occurrence of a chronic inflammatory condition and increase in ROS production [6, 7, 25]. Although such pathological mechanisms have been described, little is known about the oxidative/nitrative alterations, immunocontent of iNOS and NF- κ B, and DNA damage during disease progression in plasma and/or blood cells of patients with GD in ERT. In this context, we

extended the studies about the effects of GD on these parameters to better establish the pathophysiology of this disease.

In the present work we did not observe alteration in plasma ROS levels but we verified an increased GSH-Px activity in plasma from GD patients. The increase of these antioxidant enzyme activities may represent an adjustment against a possible augment in hydrogen peroxide production. However, it is possible that the enhanced antioxidant protection was enough to scavenge the excess of ROS in plasma, explaining the non-altered DCF levels. Controversially, a previous study performed in a human dopaminergic cell line treated with an irreversible inhibitor of β -Glucosidase, showed mitochondrial alterations characterized by increase in ROS levels and decrease in GSH-Px activity [26]. Other study in fibroblasts from GD patients also showed an increase in ROS levels [9]. Since GD is a lysosomal storage disease and lysosomes are more vulnerable to reactive species generation [25], plasma may be less affected since it presents no cells. Recent study showed that GD patients untreated present an increase in SOD and CAT in plasma [27]. In our study we observed that GD patients treated with ERT did not present alteration in these enzymes, suggesting that this treatment might have normalized the SOD and CAT activities. In addition, we cannot discard the involvement of ERT in the augment of GSH-Px activity.

Regarding to red blood cells, we observed a significant decrease in the activity of SOD in GD patients. CAT activity was also measured but no alteration was verified. These results are in agreement with a previous study performed by Roversi and collaborators 2006 [5], who demonstrated a decline in the activity of SOD (but not of GSH-Px) in GD erythrocytes. The reduced power/antioxidant capacity is the first step in the prediction of oxidative stress. Therefore, the observation that SOD activity was compromised is important because this condition may become the cell environment

more susceptible to anion superoxide formation and consequent oxidative damage to cells and biomolecules. Oxidative stress may also stimulate immune responses and contribute to the development of a chronic inflammation state [28].

Next, we determined plasma nitrite levels, an indirect measure of NO. This compound is a cellular signaling molecule that plays a key role in the pathogenesis of inflammation, but is also required for normal physiological conditions, such as vasodilation and neurotransmission [29]. NO is produced by NO synthase (NOS), which is present in three isoforms: endothelial NOS (eNOS), neuronal NOS (nNOS) and inducible NOS (iNOS). The last one is responsible for the excessive generation of NO by macrophages during inflammation [30]. In the present study, we found augmented levels of NO in plasma from GD patients. Since overproduction of NO is related to the pathogenesis of inflammation disorders [31], it may be associated to the symptoms observed during GD. Besides, excessive NO can react with superoxide anion and form peroxynitrite, a powerful oxidant molecule [32]. Controversially, Zahran and collaborators 2015 [7], did not observe changes in nitrite levels in children with GD type I during ERT. This contradiction may be a result from the difference of age in our study.

Considering that increased plasma NO levels may reflect the activity of iNOS, which is highly expressed in white blood cells, we also verified iNOS immunocontent in leukocytes but now difference was found when compared with control. Although the amount of molecules of iNOS was not altered, we cannot discard the possibility that the activity of this enzyme and/or other isoforms of NOS are increased, what could lead to the increased NO levels observed in plasma. On the other hand, we found an important increase in leukocytes immunocontent of pNF- κ B, an important transcription factor that regulates inflammatory genes. NF- κ B may be activated by proinflammatory molecules,

such as TNF α , and has a role in the expression of other cytokines. Therefore, the augment in this transcription factor may be related to the increase in TNF- α and interleukin-6 observed during GD Type I [10, 33]. Besides, since the activation of NF- κ B may be associated with apoptosis [34], it could lead to a decrease in the survival of blood cells in GD patients.

Once we found evidences also show that GD is related to oxidative stress and inflammation, and these conditions may alter DNA [35]. With this in mind, comet assay was performed in whole blood. We observed that GD patients have increased DNA damage, suggesting that this disorder confers genotoxicity to peripheral blood cells. DNA damage occurs when there are defects in its normal conformation and when the damage is not repaired, mutation or the blocking of DNA replication may occur [36]. Frequent causes for these alterations include accumulation of ROS and/or deficiency in repairing DNA. In addition, there are reports that other inborn errors of metabolism, such as homocystinuria and mucopolysaccharidosis, induce DNA damage [37,38]. Moreover, a study in patients with mucopolysaccharidosis type II showed that ERT attenuates this effect [39]. In our study we found that classes lesions type I and II are more frequent, but these classes of lesions are easily repaired, once these types of damage are considered minimal or moderate [39].

Besides DNA, other biomolecules may be affected by ROS. Among them, proteins are the major targets since they are abundant in cells and plasma. Furthermore, proteins have rapid rates of reaction with oxidants [40]. In the present study, we found a significant decrease in sulfhydryl content in both plasma and erythrocytes from GD patients, indicating protein damage. We believe that the reduction of the sulfhydryl content may be due to increased superoxide anion and nitrite formation [41]. In agreement, it has been reported that fibroblasts of patients with GD presented increase

in protein damage elicited by enhanced carbonyl groups amounts [9]. The consequences of this alteration include protein fragmentation and loss in specific protein function.

Conclusions

The ERT has greatly improved the prognosis of patients with GD. However, in the present work we verified that patients, even under the treatment, have altered oxidative/nitrative status in different components of blood elicited by increased nitrite levels in plasma, reduced SOD activity in erythrocytes. In addition, we found evidence of inflammatory process since immunocontent of pNF- κ B was enhanced in leukocytes. DNA damage was also observed, indicating genotoxicity. However, more studies are needed to understand the pathological mechanisms involved in GD.

Legends

Figure 1

Effect of patients with GD on nitrite levels in plasma (A) and immunocent of iNOS in leukocytes (B). Results are expressed as means \pm SD for eight patients in each group when analyzing nitrites, and 6 patients in each group when analyzing immunocent of iNOS. Different from control, ** $p < 0.01$ (Student's t-test).

Figure 2

Effect of patients with GD on immunocent of pNF- κ B in leukocytes. Results are expressed as means \pm SD for six patients in each group. Different from control, ** $p < 0.01$ (Student's t-test).

Figure 3

Effect of patients with GD on frequency of DNA damage (A) and DNA damage index (B) in whole blood. Results are expressed as means \pm SD for ten patients in each group. Different from control, *** $p < 0.001$ (Student's t-test).

Figure 4

Effect of patients with GD on sulfhydryl content in plasma (A) and erythrocytes (B). Results are expressed as means \pm SD for ten patients in each group. Different from control, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (Student's t-test).

References

- [1] Bodamer OA, Hung C. Laboratory and genetic evaluation of Gaucher disease. *Wien Med Wochenschr* 2010;160(23-24):600-4.
- [2] Nagral A. Gaucher disease. *J Clin Exp Hepatol* 2014;4(1):37-50.
- [3] Simpson WL, Hermann G, Balwani M. Imaging of Gaucher disease. *World J Radiol* 2014;6(9):657-68.
- [4] Thomas AS, Mehta A, Hughes DA. Gaucher disease: haematological presentations and complications. *Br J Haematol* 2014;165(4):427-40.
- [5] Roversi FM, Galdieri LC, Grego BH, Souza FG, Micheletti C, Martins AM, et al. Blood oxidative stress markers in Gaucher disease patients. *Clin Chim Acta* 2006;364(1-2):316-20.
- [6] Braudeau C, Graveleau J, Rimbart M, Néel A, Hamidou M, Grosbois B, et al. Altered innate function of plasmacytoid dendritic cells restored by enzyme replacement therapy in Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis* 2013;50(4):281-8.
- [7] Zahran AM, Elsayh KI, El-Deek SE, El-Baz MA. Oxidative stress, trace elements, and circulating microparticles in patients with Gaucher disease before and after enzyme replacement therapy. *Clin Appl Thromb Hemost* 2015;21(1):58-65.
- [8] Durackova Z. Some current insights into oxidative stress. *Physiol Res* 2010;59(4):459-69.

- [9] Deganuto M, Pittis MG, Pines A, Dominissini S, Kelley MR, Garcia R, et al. Altered intracellular redox status in Gaucher disease fibroblasts and impairment of adaptive response against oxidative stress. *J Cell Physiol* 2007;212(1):223-35.
- [10] Jmoudiak M, Futerman AH. Gaucher disease: pathological mechanisms and modern management. *Br J Haematol* 2005;129(2):178-88.
- [11] Brevetti G, Giugliano G, Brevetti L, Hiatt WR. Inflammation in peripheral artery disease. *Circulation* 2010;122(18):1862-75.
- [12] Hsing C H, Lin MC, Choi PC, Huang WC, Kai JI, Tsai CC, et al. Anesthetic propofol reduces endotoxic inflammation by inhibiting reactive oxygen species-regulated Akt/IKK β /NF- κ B signaling. *PLoS ONE* 2011;6: e17598.
- [13] Kim YJ, Shin YS, Lee KH, Kim TJ. *Anethum graveolens* flower extracts inhibited a lipopolysaccharide- induced inflammatory response by blocking iNOS expression and NF- κ B activity in macrophage. *Biosci Biotechnol Biochem* 2012;76(6):1122-7.
- [14] Bae DS, Kim CY, Lee JK. Anti-inflammatory effects of dehydrogeijerin in LPS-stimulated murine macrophages. *Int Immunopharmacol* 2012;14(4):734-9.
- [15] Goldim MP, Garcia CS, de Castilhos CD, Daitx VV, Mezzalira J, Breier AC, et al. Screening of high-risk Gaucher disease patients in Brazil using miniaturized dried blood spots and leukocyte techniques. *Gene* 2012;508(2):197-8.
- [16] Skoog WA, Beck WS. Studies on the fibrinogen, dextran and phytohemagglutinin methods of isolating leukocytes. *Blood* 1956;11(5):436-54.
- [17] LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 20, 70-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 1992;5(2):227-31.

- [18] Marklund SL. Pyrogallol autoxidation. In: Greenwald RA, editor. Handbook for oxygen radical research. Boca Raton: CRC Press. 1985;243–7.
- [19] Wendel A. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1981;77:325-33.
- [20] Aebi H. Catalase, in vitro. *Methods Enzymol* 1984;105:121–6.
- [21] Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982;126(1):131-8.
- [22] Nadin SB, Vargas-Roig LM, Ciocca DR. A silver staining method for single-cell gel assay. *J Histochem Cytochem* 2001;49(9):1183-6.
- [23] Aksenov MY, Markesbery WR. Change in thiol content and expression of glutathione redox system gene in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 2001; 302:141–145.
- [24] Lowry OH, Rosenbrough MJ, Farr AL, Randall RL. Protein measurement with the foline reagent. *J Biol Chem* 1951;193(1):265-75.
- [25] Zancan I, Bellesso S, Costa R, Salvalaio M, Stroppiano M, Hammond C, et al. Glucocerebrosidase deficiency in zebrafish affects primary bone ossification through increased oxidative stress and reduced Wnt/ β -catenin signaling. *Hum Mol Genet* 2015;24(5):1280-94.
- [26] Cleeter MW, Chau KY, Gluck C, Mehta A, Hughes DA, Duchon M, et al. Glucocerebrosidase inhibition causes mitochondrial dysfunction and free radical damage. *Neurochem Int* 2013;62(1):1-7.
- [27] Mello AS, Garcia CS, Machado FS, Medeiros NS, Wohlenberg MF, Marinho JP, Dani C, Funchal C, Coelho JC. Oxidative stress parameters of Gaucher disease type I patients. *Molecular Genetics and Metabolism Reports* 2015;4:1–5.

- [28] Geronikaki AA, Gavalas AM. Antioxidants and inflammatory disease: Synthetic and natural antioxidants with anti-inflammatory activity. *Comb Chem High Throughput Screen* 2006;9(6):425-42.
- [29] Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993;329(27):2002-12.
- [30] Nussler AK, Billiar TR. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J Leukoc Biol* 1993;54(2):171-8.
- [31] Ruan RS. Possible roles of nitric oxide in the physiology and pathophysiology of the mammalian cochlea. *Ann N Y Acad Sci* 2002;962:260–74.
- [32] Huie RE, Padmaja S. The reaction rate of nitric oxide with superoxide. *Free Radic Res Commun* 1993;18(4):195-9.
- [33] Allen MJ, Myer BJ, Khokher AM, Rushton N, Cox TM. Pro-inflammatory cytokines and the pathogenesis of Gaucher's disease: increased release of interleukin-6 and interleukin-10. *QJM* 1997; 90(1):19-25.
- [34] Park Y, Jin HS, Aki D, Lee J, Liu YC. The ubiquitin system in immune regulation. *Adv Immunol* 2014;124:17-66.
- [35] Møller P, Danielsen PH, Karotki DG, Jantzen K, Roursgaard M, Klingberg H, et al. Oxidative stress and inflammation generated DNA damage by exposure to air pollution particles. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2014;762:133-66.
- [36] Brüning JG, Howard JL, McGlynn P. Accessory replicative helicases and the replication of protein-bound DNA. *J Mol Biol* 2014;426(24):3917-28.
- [37] Vanzin CS, Manfredini V, Marinho AE, Biancini GB, Ribas GS, Deon M, et al. Homocysteine contribution to DNA damage in cystathionine β -synthase-deficient patients. *Gene* 2014;539(2):270-4.

- [38] Filippon L, Wayhs CA, Atik DM, Manfredini V, Herber S, Carvalho CG, et al. DNA damage in leukocytes from pretreatment mucopolysaccharidosis type II patients; protective effect of enzyme replacement therapy. *Mutat Res* 2011;721(2):206-10.
- [39] Loft S, Møller P, Cooke MS, Rozalski R, Olinski R. Antioxidant vitamins and cancer risk: is oxidative damage to DNA a relevant biomarker?. *Eur J Nutr* 2008;47 Suppl 2:19-28.
- [40] Hawkins CL, Morgan PE, Davies MJ. Quantification of protein modification by oxidants. *Free Radic Biol Med* 2009;46:965–88.
- [41] Bindoli A, Fukuto JM, Forman HJ. Thiol chemistry in peroxidase catalysis and redox signaling. *Antioxid Redox Signal* 2008;10(9):1549-64.

Table 1

Mean of age, variation of age, sex, splenectomized patients, duration of ERT and variation of duration of ERT.

Variable	Controls	Patients
Age (years), mean \pm SD	28.5 \pm 10.2	29 \pm 10.5
Male, n (%)	5 (50)	2(20)
Splenectomized, n (%)	-	2(20)
Duration of ERT (years), mean \pm SD	-	10.8 \pm 7.5

ERT = Enzyme Replacement Therapy;

Table 2

Antioxidant activity (CAT, SOD and GSH-Px) in plasma or erythrocytes from controls and patients with GD.

Parameters (units/mg protein)	Plasma		Erythrocytes	
	Controls	Patients	Controls	Patients
SOD	2.0±0.25	1.95±0.2	5.36±1.23	3.77±0.25**
GSH-Px	3.1±0.6	4.2±0.4***	22.33±4.24	19.93 ±1.73
CAT	-	-	3.54 ±0.61	3.61± 0.58

Results are expressed as means ± SD (Control N=10, Patients N=10), **p<0.01;

***p<0.001, compared to Controls (Student's t-test).

Figure 1

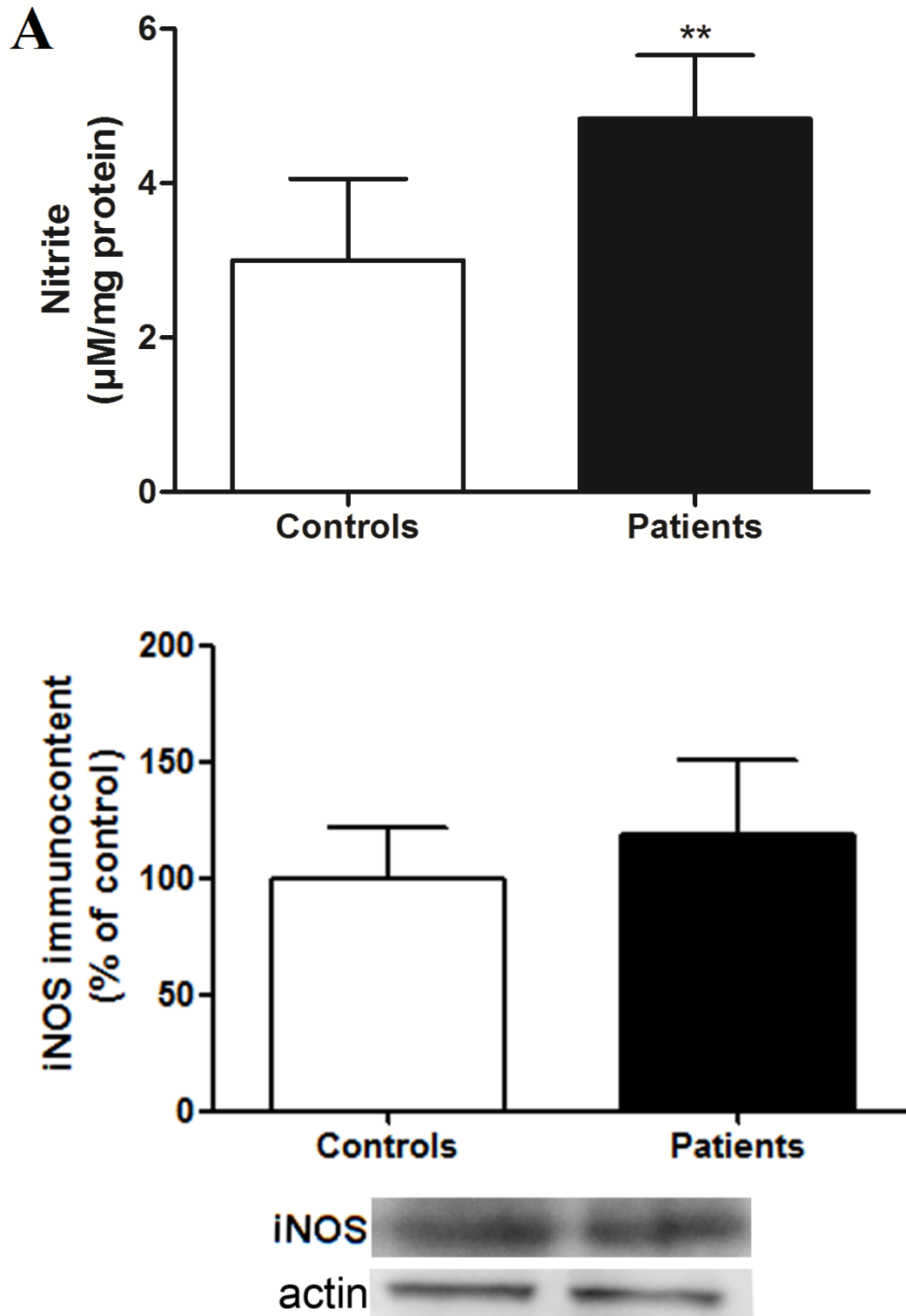


Figure 2

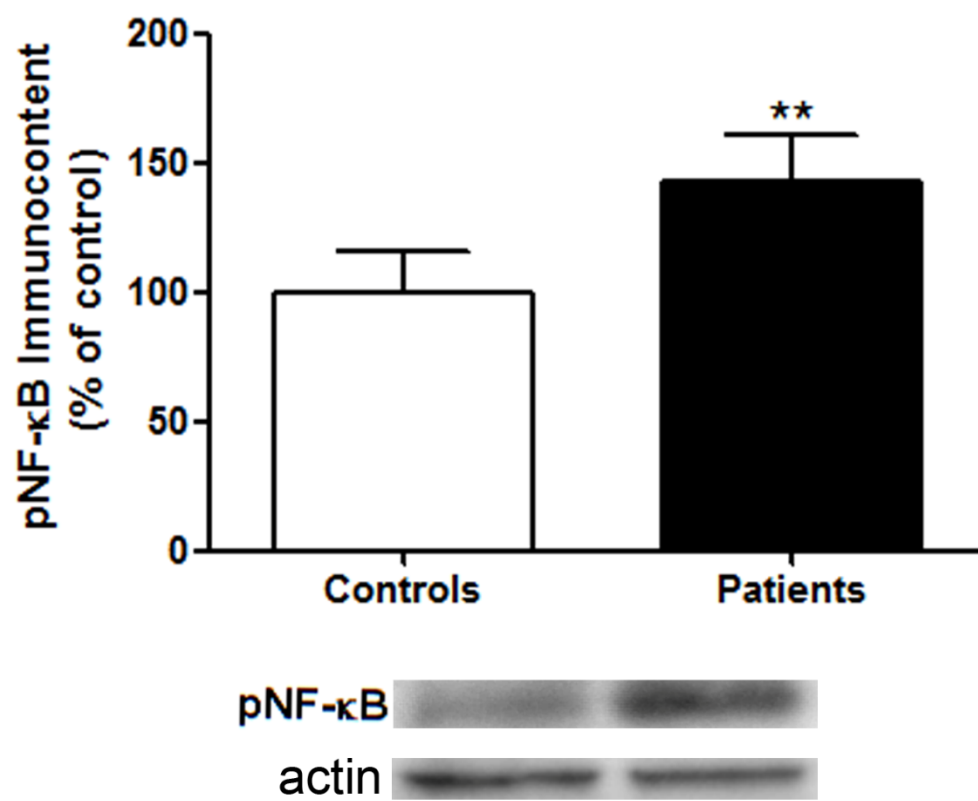


Figure 3

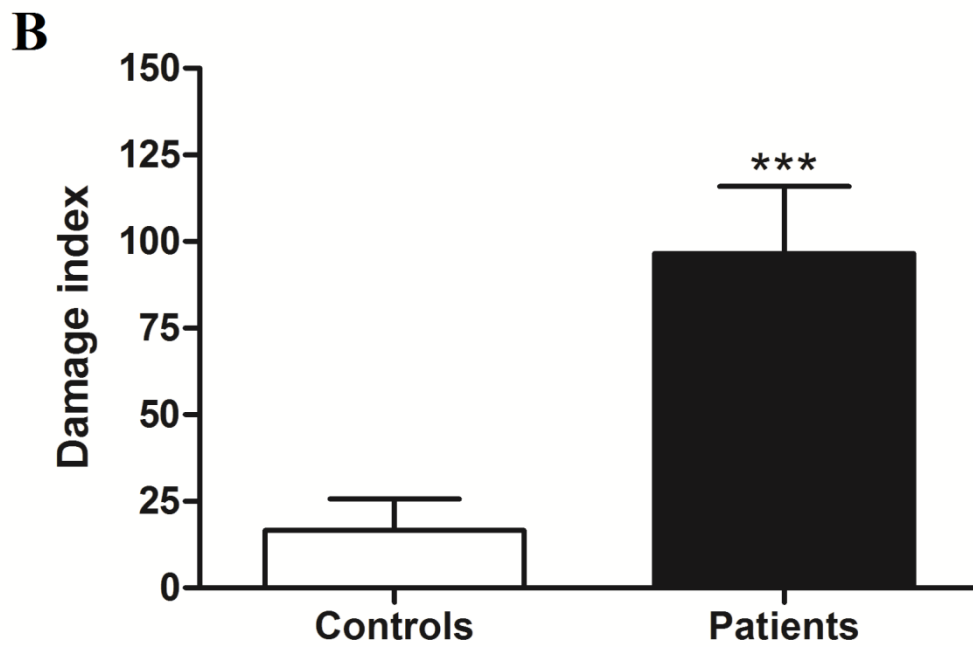
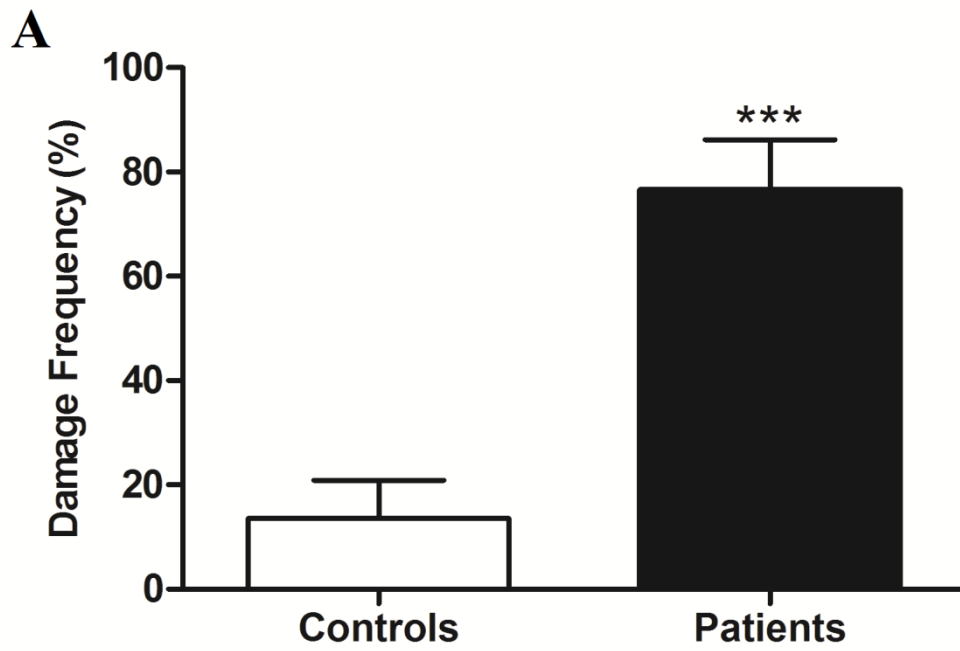
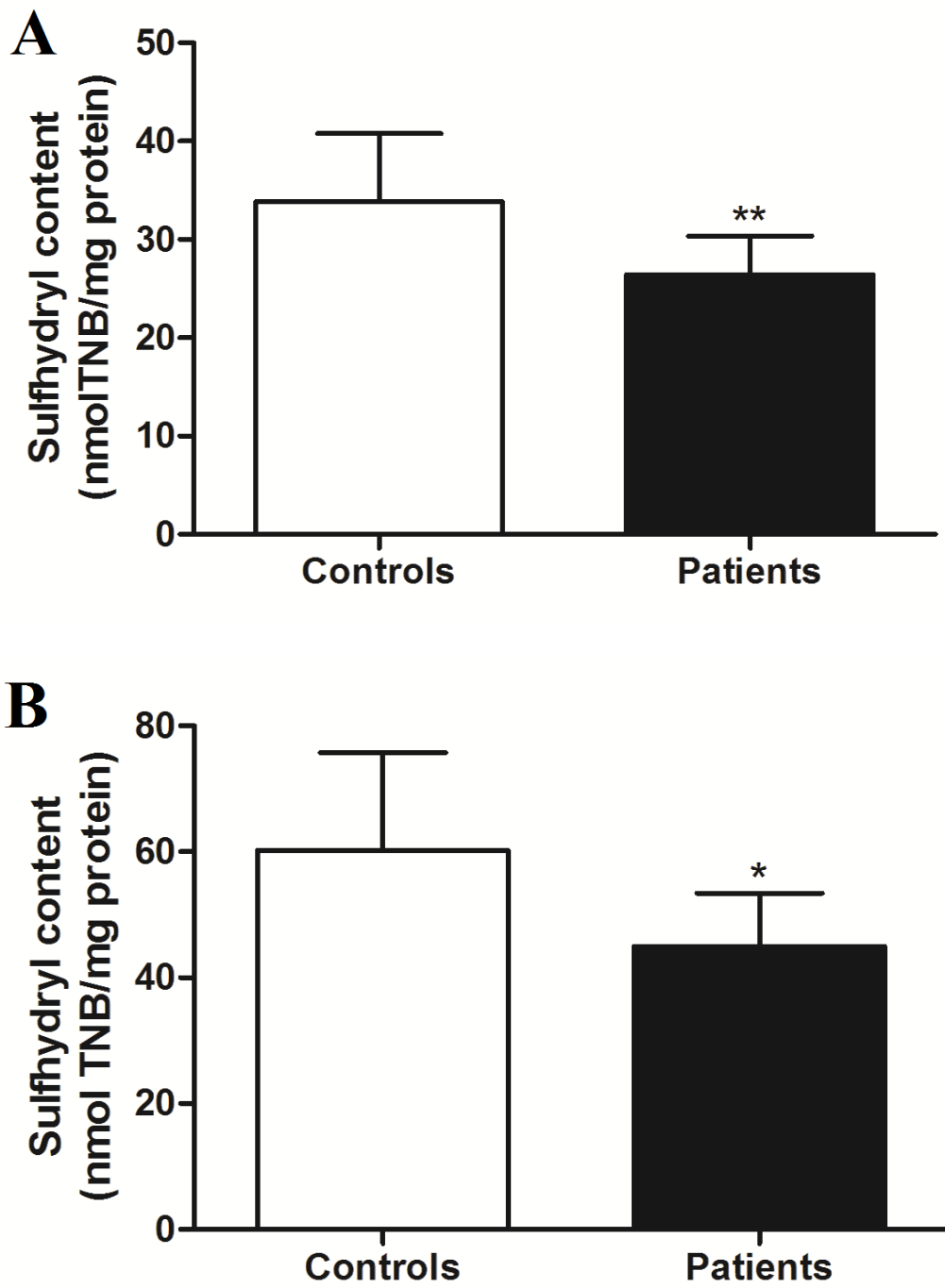


Figure 4



4 DISCUSSÃO

A DG é uma doença inflamatória crônica, considerada um fator de risco para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson. A DG é um EIM e possui baixa frequência na população, aproximadamente 1:100.000, apesar da DG ser rara os EIM de uma forma geral apresentam uma frequência de cerca de 1:1000 nascidos vivos (Alfadhel et al., 2013), essas doenças possuem muitas características em comum, como por exemplo aumento de espécies reativas, danos ao DNA e inflamação (Stefanello et al., 2009; Filippon et al., 2011; Vanzin et al., 2014; Thomas et al., 2014).

Os eventos fisiopatológicos da DG incluem o armazenamento da glicosilceramidas no interior dos lisossomos de macrófagos e monócitos. O aumento dos lisossomos devido a grande quantidade de glicosilceramidas provoca a ativação das células do sistema retículo endotelial, levando a uma condição inflamatória crônica, além de um aumento na quantidade de EROs (Braudeau et al., 2013; Zancan et al., 2014; Zahran et al., 2015.). Além disso, a DG interfere na qualidade de vida dos pacientes com essa patologia, por meio da TRE a qualidade de vida desses pacientes melhorou consideravelmente (Hughes & Pastores, 2013), porém parece que algumas alterações oxidativas e inflamatórias ainda permanecem. Embora esses mecanismos patológicos envolvendo a DG tenham sido descritos, pouco se sabe sobre que alterações oxidativas, imunociteína de iNOS e pNF-kB e danos de DNA pelo teste do cometa, durante a progressão da doença no plasma e/ou células sanguíneas de pacientes com a DG sob TRE. Neste contexto, no presente trabalho, estendemos os estudos sobre os efeitos da DG sobre esses parâmetros para melhor compreender a fisiopatologia da doença.

No presente trabalho, não observamos alteração nos níveis plasmáticos de EROs, por meio da oxidação do DCF no plasma. Entretanto, verificamos um aumento da atividade de GSH-Px no plasma de pacientes com DG. O aumento da atividade dessa enzimas antioxidantes pode representar uma regulação contra um possível aumento na produção de peróxido de hidrogênio. No entanto, é possível que o aumento dessa anti-oxidante no plasma tenha sido suficiente para eliminar o excesso de EROs no plasma, justificando os níveis não alterados DCF. Por outro lado, um estudo realizado numa linha celular humana dopaminérgica tratados com um inibidor irreversível das β -glicosidase, mostraram alterações mitocondriais caracterizados pelo aumento dos níveis de EROs e diminuição na atividade de GSH-Px (Cleeter et al., 2013). Outro estudo em fibroblastos de pacientes com DG também mostraram um aumento nos níveis de EROs (Deganuto et al., 2007). Porém a DG é uma doença de depósito lisossômico e lisossomos são mais vulneráveis à geração de espécies reativas (Zancan et al., 2015), dessa forma o plasma pode ser menos afetado, uma vez que não apresenta células. Estudo recente mostrou que os pacientes com DG não tratados apresentam um aumento de SOD e CAT no plasma (Mello et al., 2015). Em nosso estudo observamos que os pacientes com DG tratados com TRE não apresentaram alteração dessas enzimas, o que sugere que este tratamento poderia ter normalizado as atividades da SOD e CAT. Além disso, não podemos descartar o envolvimento da TRE no aumento da atividade GSH-Px.

No que diz respeito às células vermelhas do sangue, observou-se uma diminuição significativa na atividade de SOD em pacientes com DG. A atividade da CAT também foi medida, mas não foi verificada nenhuma alteração. Estes resultados estão de acordo com um estudo anterior realizado por Roversi e colaboradores (2006), que demonstraram um declínio na atividade da SOD, mas não da GSH-Px, em

eritrócitos de pacientes com DG. A redução do poder/capacidade antioxidante é o primeiro passo na predição de estresse oxidativo. Por conseguinte, a observação de que a atividade da SOD foi comprometida é importante, pois esta condição no ambiente intracelular seja mais susceptíveis à formação de ânion superóxido e consequente dano oxidativo a células e biomoléculas. O estress oxidativo também pode estimular respostas imunes e contribui para o desenvolvimento de um estado de inflamação crônica (Geronikaki & Gavalas 2006).

Em seguida, foram determinados os níveis de nitrito no plasma, uma medida indireta do NO. Este composto é uma molécula de sinalização celular que desempenha um papel chave na patogênese da inflamação, porém o NO também desempenha funções necessárias para as condições fisiológicas normais, como vasodilatação e neurotransmissão (Moncada & Higgs 2002). O NO é produzido por NO sintase (NOS), que está presente em três isoformas: NOS endotelial (eNOS), NOS neuronal (nNOS) e NOS induzível (iNOS). A última é responsável pela produção excessiva de NO por macrófagos durante a inflamação (Nussler & Billiar.1993). No presente estudo, encontramos níveis aumentados de nitritos no plasma de pacientes com DG. Nesse contexto, a super produção de NO está relacionada com a patogênese de desordens inflamatórias (Ruan 2002), que poderia estar associado aos sintomas observados durante patogênese da DG. Além disso, o excesso de NO poderia reagir com o ânion superóxido e forma o peroxinitrito, uma poderosa molécula oxidante (Huie & Padmaja). Por outro lado, Zahran e colaboradores (2015), não observaram mudanças nos níveis de nitrito em crianças com DG tipo I em TRE. Essa contradição pode ser um resultado da diferença de idade no presente estudo.

Considerando-se que o aumento dos níveis de nitritos no plasma de pacientes com DG poderia refletir no aumento do imunoconteúdo de iNOS, que é altamente

expresso em células brancas do sangue, por isso, foi verificado o imunocontéudo de iNOS em leucócitos. Porém não observamos diferença quando comparado com o grupo controle. Embora a quantidade de moléculas de iNOS não tenha sido alterada, não se pode descartar a possibilidade de que a atividade desta enzima e/ou de outras isoformas de NOS estejam aumentadas, o que poderia levar ao aumento dos níveis de nitritos no plasma. Por outro lado, verificou-se, em leucócitos, um aumento importante no imunocontéudo de pNF-kB, um importante fator de transcrição que regula genes inflamatórios. O NF-kB pode ser ativado por moléculas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , o qual possui um papel importante na expressão de outras citocinas. Portanto, o aumento no NF-kB pode estar relacionado com o aumento do TNF- α e interleucina-6 observado na DG tipo I (Allen et al., 1997; Jmoudiak & Futerman 2005). Além disso, a ativação de NF-kB pode estar associada com apoptose (Park et al., 2014), que poderia levar a um decréscimo na sobrevivência de células do sangue em pacientes DG.

Além disso, encontramos evidências que mostram que a DG está relacionada ao estresse oxidativo e inflamação, e que essas condições poderiam provocar danos à estrutura do DNA (Møller et al., 2014). Pensando nisso, realizamos o ensaio do cometa em sangue total. Observamos que os pacientes com DG têm aumentado de dano ao DNA, sugerindo que esta desordem confere genotoxicidade para as células do sangue periférico. Dano ao DNA ocorre quando há defeitos na sua conformação normal e quando o dano não for reparado pode ocorrer mutação ou o bloqueio da replicação do DNA (Brüning et al., 2014). As causas frequentes para estas alterações incluem a acumulação de EROs e/ou deficiência na reparação de DNA. Além disso, há relatos de que outros EIM, como a homocistinúria e mucopolissacaridose também provoquem danos DNA em sangue de pacientes (Filippon et al., 2011; Vanzin et al., 2014). Além disso, um estudo em pacientes com mucopolissacaridose tipo II mostrou que a TRE

atenua este efeito (Loft et al., 2008). Em nosso estudo, verificamos que as lesões são de classes danos do tipo I e II são mais frequentes, entretanto essas classes de danos são facilmente reparadas, uma vez que estes tipos de danos são considerados mínimos ou moderados (Loft et al., 2008).

Além do DNA, outras biomoléculas pode ser afetadas por EROs. Entre elas, as proteínas são os principais alvos, por serem abundantes nas células e no plasma. Além disso, as proteínas têm rápidas taxas de reação com oxidantes (Hawkins et al., 2009). No presente estudo, verificou-se uma diminuição significativa no conteúdo sulfidrina no plasma e nos eritrócitos de pacientes com DG, indicando danos a proteínas. Acreditamos que a redução na quantidade de grupamento sulfidrina pode ser devido a um aumento da formação de ânion superóxido e nitritos (Bindoli et al., 2008). Em concordância, tem sido relatado que os fibroblastos de pacientes com DG apresentaram aumento de danos a proteínas provocado pelo aumento na quantidade de grupos carbonila (Deganuto et al., 2007). As consequências desta alteração incluem fragmentação e perda da função de proteínas específicas.

5 CONCLUSÕES

A ERT tem melhorado muito o prognóstico dos pacientes com DG. No entanto, observamos que:

- No plasma de pacientes com DG houve:
 - Aumento da atividade da GSH-Px;
 - Aumento de Nitritos;
 - Redução no conteúdo de sulfidrilas.
- Nos eritrócitos de pacientes com DG houve:
 - Redução da atividade da SOD;
 - Redução no conteúdo de sulfidrilas.
- Nos leucócitos de pacientes com DG houve:
 - Aumento do imunoconteúdo de pNF-κB.
- No sangue total de pacientes com DG houve:
 - Aumento dos danos ao DNA.

6 PERSPECTIVAS

- Avaliar a função mitocondrial em leucócitos de pacientes com DG em TRE;
- Avaliar cadeia respiratória: níveis de ATP e Na⁺,K⁺-ATPase em leucócitos de pacientes com DG em TRE;
- Velocidade de recuperação de DNA em sangue total de pacientes com DG em TRE;
- Captação de glicose em eritrócitos de pacientes com DG em TRE.

7 REFERÊNCIAS

- Aebi H. (1984) Catalase, in vitro. *Methods Enzymol* 105:121–6.
- Aerts J.M., Boot R.G., Bloommaart E.F.C., Renkema G.H., van Weely S., Hollak C.E.M. (1999) Chitotriosidase: applications and features of the enzyme. *Gaucher Clin Perspect* 7:4-8.
- Aerts J.M., Kallemeijn W.W, Wegdam W., Joao Ferraz M., van Breemen M.J., Dekker N., Kramer G., Poorthuis B.J., Groener J.E., Cox-Brinkman J., Rombach S.M., Hollak C.E., Linthorst G.E., Witte M.D., Gold H., van der Marel G.A., Overkleeft H.S., Boot R.G. (2011) Biomarkers in the diagnosis of lysosomal storage disorders: proteins, lipids, and inhibodies. *J Inherit Metab Dis* 34:605-19.
- Aksenov M.Y., Markesbery W.R. (2001) Change in thiol content and expression of glutathione redox system gene in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 302:141–145.
- Alfadhel M., Al-Thihli K., Moubayed H., Eyaid W., Al-Jeraisy M. (2013) Drug treatment of inborn errors of metabolism: a systematic review. *Arch Dis Child* 98:454-61; 2013.
- Allen M.J., Myer B.J., Khokher A.M., Rushton N., Cox T.M. (1997) Pro-inflammatory cytokines and the pathogenesis of Gaucher's disease: increased release of interleukin-6 and interleukin-10. *QJM* 90:19-25.
- Altarescu G., Ioscovich D., Alcalay R.N, Zimran A., Elstein D. (2014) α -Synuclein rs356219 polymorphisms in patients with Gaucher disease and Parkinson disease. *Neurosci Lett* 580:104-7.
- Ballabio A. (2009) Disease pathogenesis explained by basic science: lysosomal storage diseases as autophagocytic disorders. *Int J Clin Pharmacol Ther* 47: 34-38.

- Barak V., Acker M., Nisman B., Kalickman I., Abrahamov A., Zimran A., Yatziv S. (1999) Cytokines in Gaucher's disease. *Eur Cytokine Netw* 10:205–10.
- Barton N.W., Brady R.O., Dambrosia J.M., Di Bisceglie A.M., Doppelt S.H., Hill S.C., Mankin H.J., Murray G.J., Parker R.I., Argoff C.E, Raji P., Kian-Ti Y.. (1991) Replacement therapy for inherited enzyme deficiency--macrophage-targeted glucocerebrosidase for Gaucher's disease. *N Engl J Med* 324:1464-70.
- Beutler E., Grabowski G.A. (1995) Gaucher's disease. In; Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S., et al. eds; Childs B., Kinzler K.W., Vogelstein B. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed. New York: McGraw-Hill 2641–70.
- Bindoli A., Fukuto J.M., Forman H.J. (2008) Thiol chemistry in peroxidase catalysis and redox signaling. *Antioxid Redox Signal* 10:1549-64.
- Bodamer O.A., Hung C. (2010) Laboratory and genetic evaluation of Gaucher disease. *Wien Med Wochenschr* 160:600-4.
- Braudeau C., Graveleau J., Rimbart M., Néel A., Hamidou M., Grosbois B., Besançon A., Giraudet S., Terrien C., Josien R., Masseau A. (2013) Altered innate function of plasmacytoid dendritic cells restored by enzyme replacement therapy in Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis* 50:281-8.
- Brevetti G., Giugliano G., Brevetti L., Hiatt W.R. (2010) Inflammation in peripheral artery disease. *Circulation* 122:1862-75.
- Brüning J.G., Howard J.L., McGlynn P. (2014) Accessory replicative helicases and the replication of protein-bound DNA. *J Mol Biol* 426:3917-28.
- Cleeter M.W., Chau K.Y., Gluck C., Mehta A., Hughes D.A., Duchon M., Wood N.W., Hardy J., Mark Cooper J., Schapira A.H. (2013) Glucocerebrosidase inhibition causes mitochondrial dysfunction and free radical damage. *Neurochem Int* 62(1):1-7.

- Chen M., Wang J. (2008) Gaucher disease: review of the literature. *Arch Pathol Lab Med* 132:851-853.
- Deganuto M, Pittis M.G., Pines A., Dominissini S., Kelley M.R., Garcia R., Quadrifoglio F., Bembi B., Tell G. (2007) Altered intracellular redox status in Gaucher disease fibroblasts and impairment of adaptive response against oxidative stress. *J Cell Physiol* 212:223-35.
- Delanty N., Dichter, M.A. (1998) Oxidative injury in the nervous system. *Acta Neurol. Scand* 98:145-153.
- Desnick R.J., Schuchman E.H. (2012) Enzyme replacement therapy for lysosomal diseases: lessons from 20 years of experience and remaining challenges. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 13:307-35.
- Ficicioglu C. (2008) Review of miglustat for clinical management in Gaucher disease type 1. *Ther Clin Risk Manag* 4:425-31.
- Filippon L., Wayhs C.A., Atik D.M., Manfredini V., Herber S., Carvalho C.G., Schwartz I.V., Giugliani R., Vargas C.R. (2011) DNA damage in leukocytes from pretreatment mucopolysaccharidosis type II patients; protective effect of enzyme replacement therapy. *Mutat Res* 721:206-10.
- Geronikaki A.A., Gavalas A.M. (2006) Antioxidants and inflammatory disease: Synthetic and natural antioxidants with anti-inflammatory activity. *Comb Chem High Throughput Screen* 9:425-42.
- Goldim M.P., Garcia C.S., de Castilhos C.D., Daitx V.V., Mezzalira J., Breier A.C., Cé J., Mello A., Andrade C.V., Sartori N., Coelho J.C. (2012) Screening of high-risk Gaucher disease patients in Brazil using miniaturized dried blood spots and leukocyte techniques. *Gene* 508:197-8.

- Grabowski G.A. (2008) Phenotype, diagnosis, and treatment of Gaucher's disease. *Lancet* 372:1263-71.
- Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J., Skipper P.L., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R. (1982) Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126(1):131-8.
- Guire P.J., Parikh A., Diaz G.A. (2009) Profiling of oxidative stress in patients with inborn errors of metabolism. *Mol Genet Metab* 98:173-80.
- Halliwell B. (2009) The wanderings of a free radical. *Free Radical Biol Med* 46:531–542.
- Hawkins C.L., Morgan P.E., Davies M.J. (2009) Quantification of protein modification by oxidants. *Free Radic Biol Med* 46:965–88.
- Hong Y.B., Kim E.Y., Jung S.C. (2006) Upregulation of proinflammatory cytokines in the fetal brain of the Gaucher mouse. *J Korean Med Sci* 21:733-8.
- Hughes D.A., Pastores G.M. (2013) Haematological manifestations and complications of Gaucher disease. *Curr Opin Hematol* 20:41-7.
- Huie R.E., Padmaja S. (1993) The reaction rate of nitric oxide with superoxide. *Free Radic Res Commun* 18:195-9.
- Jacobson G.A., Yee K.C., Ng C.H. (2007) Elevated plasma glutathione peroxidase concentration in acute severe asthma: comparison with plasma glutathione peroxidase activity, selenium and malondialdehyde. *Scand J Clin Lab Invest* 67:423-30.
- Janakiram N.B., Rao C.V. (2012) iNOS-selective inhibitors for cancer prevention: promise and progress. *Future Med Chem* 4:2193-204.
- Jmoudiak M., Futerman A.H. (2005) Gaucher disease: pathological mechanisms and modern management. *Br J Haematol* 129:178-88.

- Johansen J.S., Harris A.K., Rychly D.J., Ergul, A. (2005) Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovasc. Diabetol* 4:5.
- Kwon M.J., Kim B., Lee Y.S., Kim T.Y. (2012) Role of superoxide dismutase 3 in skin inflammation. *J Dermatol Sci* 67:81-7.
- LeBel C.P., Ischiropoulos H., Bondy S.C. (1992) Evaluation of the probe 20, 70-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 5:227-31.
- Lee J.C., Won M.H. Neuroprotection of antioxidant enzymes against transient global cerebral ischemia in gerbils. *Anat Cell Biol* 47:149-56.
- Liao W., Mcnutt M.A., Zhu W.G. (2009) The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods* 48:46-53.
- Loft S., Møller P., Cooke M.S., Rozalski R., Olinski R. (2008) Antioxidant vitamins and cancer risk: is oxidative damage to DNA a relevant biomarker?. *Eur J Nutr* 47:19-28.
- Lowry O.H., Rosenbrough M.J., Farr A.L., Randall R.L. (1951) Protein measurement with the foline reagent. *J Biol Chem* 193:265-75.
- Luiking Y.C., Ten Have G.A., Wolfe R.R., Deutz N.E. (2012) Arginine de novo and nitric oxide production in disease states. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 303:E1177-89.
- Mistério da Saúde. (2011) Portaria SAS/MS nº 708, de 25 de outubro de 2011. Secretaria de Atenção à Saúde. Disponível em https://http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2011/prt0708_25_10_2011.html. Acessado em 20 de maio de 2015.

- Møller P, Danielsen PH, Karotki DG, Jantzen K, Roursgaard M, Klingberg H, Jensen D.M., Christophersen D.V., Hemmingsen J.G., Cao Y., Loft S. (2014) Oxidative stress and inflammation generated DNA damage by exposure to air pollution particles. *Mutat Res Rev Mutat Res* 762:133-66.
- Marklund S.L. (1985) Pyrogallol autoxidation. In: Greenwald RA, editor. *Handbook for oxygen radical research*. Boca Raton: CRC Press 243–7.
- Moncada S., Higgs A. (1993) The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329:2002-12.
- Nadin S.B., Vargas-Roig L.M., Ciocca D.R. A silver staining method for single-cell gel assay. *J Histochem Cytochem* 49:1183-6.
- Neufeld E.F. (1991) Lysosomal storage diseases. *Annu Rev Biochem* 60:257-80.
- Nussbaum R.L., McInnes R.R., Willard H.F. (2008) Thompson *Genética Médica* 7ª edição.
- Nussler A.K., Billiar T.R. (1993) Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J Leukoc Biol* 54:171-8.
- Pandey M.K., Grabowski G.A. (2013) Immunological cells and functions in Gaucher disease. *Crit Rev Oncog* 18:197-220.
- Park Y., Jin H.S., Aki D., Lee J., Liu Y.C. (2014) The ubiquitin system in immune regulation. *Adv Immunol* 124:17-66.
- Rocha J.C., Martins M.J. (2012) Oxidative stress in phenylketonuria: future directions. *J Inherit Metab Dis* 35:381-98.
- Roversi F.M., Galdieri L.C., Grego B.H., Souza F.G., Micheletti C., Martins A.M., D'Almeida V. (2006) Blood oxidative stress markers in Gaucher disease patients. *Clin Chim Acta* 364:316-20.

- Ruan R.S. (2002) Possible roles of nitric oxide in the physiology and pathophysiology of the mammalian cochlea. *Ann N Y Acad Sci* 962:260–74.
- Santos D.B., Schiar V.P.P., Paixão M.W., Nogueira C.W., Aschner, M., Rocha Speit, G., Vasquez M., Hartmann A. (2009) The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity. *Mutation Research* 681:3–12.
- Skoog W.A., Beck W.S. (1956) Studies on the fibrinogen, dextran and phytohemagglutinin methods of isolating leukocytes. *Blood* 11:436-54.
- Speit G., Schutz P., Hoffman H. (2007) Genotoxic effects of exposure to radiofrequency electromagnetic fields (RF-EMF) in cultured mammalian cells are not independently reproducible. *Mutation Research* 626:42–47.
- Staretz-Chacham O., Lang T.C., LaMarca M.E., Krasnewich D., Sidransky E. (2009) Lysosomal Storage Disorders in the Newborn. *Pediatrics* 123:1191-1207.
- Starr A., Hussein D., Nandi M. (2013) The regulation of vascular tetrahydrobiopterin bioavailability. *Vascul Pharmacol* 58:219-30.
- Stefanello F.M., Matté C., Pederzolli C.D, Kolling J., Mescka C.P., Lamers M.L., de Assis A.M., Perry M.L., dos Santos M.F., Dutra-Filho C.S., Wyse A.T. (2009) Hypermethioninemia provokes oxidative damage and histological changes in liver of rats. *Biochimie* 91:961-8.
- Thomas A.S., Mehta A., Hughes D.A. (2014) Gaucher disease: haematological presentations and complications. *Br J Haematol* 165:427-40.
- Ueno S., Kashimoto T., Susa N., Natsume H., Toya M., Ito N., Takeda-Homma S., Nishimura Y., Sasaki Y.F., Sugiyama M. (2007) Assessment of DNA damage in multiple organs of mice after whole body X-irradiation using the comet assay. *Mutation Research* 634:135-45.

- Vanzin C.S., Biancini G.B., Sitta A., Wayhs C.A., Pereira I.N., Rockenbach F., Garcia S.C., Wyse A.T., Schwartz I.V., Wajner M., Vargas C.R. (2011) Experimental evidence of oxidative stress in plasma of homocystinuric patients: a possible role for homocysteine. *Mol Genet Metab* 104:112-7; 2011.
- Vanzin C.S., Manfredini V., Marinho A.E., Biancini G.B., Ribas G.S., Deon M., Wyse A.T., Wajner M., Vargas C.R. (2014) Homocysteine contribution to DNA damage in cystathionine β -synthase-deficient patients. *Gene* 539:270-4.
- Vázquez M.C., Balboa E., Alvarez A.R., Zanlungo S. (2012) Oxidative stress: a pathogenic mechanism for Niemann-Pick type C disease. *Oxid Med Cell Longev* 2012:205713.
- Vitner E.B., Farfel-Becker T., Eilam R., Biton I., Futerman A.H. (2012) Contribution of brain inflammation to neuronal cell death in neuronopathic forms of Gaucher's disease. *Brain* 135:1724-35.
- Wendel A. (1981) Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 77:325-33.
- Wennekes T., van den Berg R.J., Boot R.G., van der Marel G.A., Overkleeft H.S., Aerts J.M. (2009) Glycosphingolipids--nature, function, and pharmacological modulation. *Angew Chem Int Ed Engl* 48:8848-69.
- Wu G., Morris Jr S.M. (1998) Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* 336:1-17.
- Zahran A.M., Elsayh K.I., El-Deek S.E., El-Baz M.A. (2015) Oxidative stress, trace elements, and circulating microparticles in patients with Gaucher disease before and after enzyme replacement therapy. *Clin Appl Thromb Hemost* 21:58-65.
- Zancan I., Bellesso S., Costa R., Salvalaio M., Stroppiano M., Hammond C., Argenton F., Filocamo M., Moro E. (2015) Glucocerebrosidase deficiency in zebrafish affects

primary bone ossification through increased oxidative stress and reduced Wnt/ β -catenin signaling. Hum Mol Genet 24:1280-94.

Zimran A. (2011) How I treat Gaucher disease. Blood 118:1463-71.

Zingarelli B. (2005) Nuclear factor-kappaB. Crit Care Med 33:S414-6.

8 APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO ÚNICO - TCLEU

Você ou seu filho (a) está sendo convidado a participar do trabalho cujo objetivo é *determinar novos fatores que contribuem com a fisiopatologia da Doença de Gaucher*, dentro do projeto “*Avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo e atividade da butirilcolinesterase em plasma de pacientes com doença de Gaucher*”.

Caso você participe da pesquisa será solicitada a doação de 9mL de sangue periférico. O desconforto causado será o de uma coleta habitual de sangue, podendo haver, eventualmente, um pequeno hematoma e desconforto local, em caso de dificuldade de coleta poderá ser necessário mais de uma punção. Após a coleta será recomendado que o paciente fique com um pequeno curativo que deverá ser mantido por 30 minutos. Os dados advindos com a sua doação são de importância científica relevante para a melhor compreensão dos mecanismos que promovem alterações no status normal do organismo. O material será utilizado apenas para fins do projeto de pesquisa, sendo garantida a confidencialidade das informações obtidas, sendo reservado ao doador acesso às mesmas.

Pelo presente, declaro que fui devidamente informado sobre o projeto de pesquisa, de forma clara e detalhada, da liberdade de não participar do estudo e tive minhas dúvidas esclarecidas. Estou ciente que receberei uma cópia deste TCLEU, onde se encontra o objetivo do projeto e os contatos dos pesquisadores e do comitê de ética em pesquisa da UFRGS.

Tipo de Amostra doada: () sangue

Data: _____

Indivíduo ou Responsável: _____

Assinatura do pesquisador responsável: _____

Pesquisadora responsável: Profa. Dra. Angela T.S. Wyse (fone 3308 5574)

Pesquisador: Elias Turcatel

Comitê de ética em Pesquisa CEP-UFRGS: (51) 3308 3738