

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

ENVOLVIMENTO DO SISTEMA IMUNE NA DOENÇA DE
GAUCHER: análise de variantes dos genes *HLA* e *KIR*

FILIPPO PINTO E VAIRO

PORTO ALEGRE

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

ENVOLVIMENTO DO SISTEMA IMUNE NA DOENÇA DE
GAUCHER: análise de variantes dos genes *HLA* e *KIR*

FILIPPO PINTO E VAIRO

Orientadora: Prof. Dra. Ida Vanessa Schwartz

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Medicina: Ciências Médicas,
UFRGS, como requisito para obtenção do título
de Mestre.

PORTO ALEGRE

2012

CIP - Catalogação na Publicação

Vairo, Filippo Pinto e
ENVOLVIMENTO DO SISTEMA IMUNE NA DOENÇA DE
GAUCHER: análise de variantes dos genes HLA e KIR /
Filippo Pinto e Vairo. -- 2012.
104 f.

Orientadora: Ida Vanessa Doederlein Schwartz.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2012.

1. Doença de Gaucher. 2. genes KIR. 3. genes HLA.
4. Imunologia. I. Schwartz, Ida Vanessa Doederlein,
orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Serviço de Genética Médica e no Serviço de Imunologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. O estudo foi financiado pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX) do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS). Todos os experimentos apresentados nesta dissertação estão incluídos em projeto de pesquisa aprovado por seus aspectos éticos e metodológicos pelos comitês de ética e pesquisa do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre sob o número 09-398.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Ida Schwartz, pela oportunidade, orientação e troca de conhecimentos.

À equipe do Centro de Referência para tratamento de doença de Gaucher do Rio Grande do Sul pelo companheirismo em todos os momentos.

Ao Serviço de Imunologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sob a chefia do Prof. Luiz Fernando Jobim, pelo acolhimento e pela possibilidade de realização do trabalho em conjunto, em especial à Mariana Jobim e Patrícia Salim por todo o auxílio.

À Pâmela Portela pela amizade, comprometimento e dedicação para a concretização desse trabalho.

Aos amigos do Serviço de Genética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e do Centro de Terapia Gênica por todo o apoio.

Aos pacientes com doença de Gaucher por toda confiança depositada.

À Rafaella, pelo carinho, compreensão e torcida pelo meu sucesso.

Aos meus pais, irmã e amigos, responsáveis pela minha felicidade.

RESUMO

Introdução: A Doença de Gaucher (DG) é causada pela atividade reduzida da enzima lisossomal glucocerebrosidase, o que leva ao acúmulo de glicocerebrosídeo nas células e a uma estimulação crônica do sistema imune. Células *natural killer* (NK) possuem um papel importante na resposta imune e sua atividade é alterada na DG. Os receptores KIR (*Killer Immunoglobulin-like Receptors*) regulam a atividade das células NK através da interação com moléculas de HLA (*Human Leukocyte Antigen*) de classe I das células-alvo. **Objetivo:** Analisar a variabilidade dos genes *KIR* em uma coorte de pacientes com DG do Sul do Brasil, compará-las a um grupo controle e buscar associações com manifestações clínicas. **Metodologia:** Trinta e um pacientes com DG tipo I (24 com forma leve, 4 com forma moderada e 3 com forma grave) foram analisados e comparados a 250 controles saudáveis quanto a frequência dos genes *HLA* e *KIR*. **Resultados/Discussão:** Não houve diferença significativa nas frequências de variantes dos genes *KIR* entre os grupos. O alelo HLA B37 é mais frequente nos pacientes com DG do que no grupo controle ($p=0,011$). A idade de início dos sintomas mostrou associação com a combinação das variantes KIR2DL2 e KIR2DS2 com seu ligante HLA-C1 ($p=0,038$). Pacientes que apresentam a variante HLA-C2 parecem apresentar maior susceptibilidade a desenvolver bandas mono ou policlonais na eletroforese de proteínas ($p=0,007$, $OR=21,3$). Foi encontrada associação entre os alelos DR11 ($p=0,008$) e DR13 ($p=0,011$) e gravidade da doença. O alelo DR11 parece estar associado a comprometimento neurológico, enquanto o alelo DR13 ao desenvolvimento de osteonecrose. **Conclusão:** Nossos dados sugerem uma possível associação entre variantes dos genes *KIR* e *HLA* e a DG. Devem ser estudadas em outras coortes de pacientes já que parecem ser um fator modificador de fenótipo.

ABSTRACT

Background: Gaucher disease (GD) is caused by the reduced activity of a lysosomal enzyme glucocerebrosidase, which leads to the accumulation of glucocerebroside in the cells and a chronic stimulation of the immune system. Natural Killer (NK) cells play an important role in the immune response, and their activity is impaired in GD. Killer immunoglobulin-like receptors (KIR) regulate the activity of NK cells through an interaction with specific human leukocyte antigen (HLA) class I molecules on target cells. **Objectives:** To analyze the variability of KIR genes in a Southern Brazilian sample of GD patients, to compare it with controls, and to look for associations with clinical manifestations. **Methodology:** Thirty one GD type I patients (24 mild, 4 moderate, and 3 severe) were analyzed and compared to 250 healthy controls regarding the frequency of *HLA* and *KIR* genes. **Results/Discussion:** There was no significative difference in the frequencies of *KIR* gene variants between the groups. The HLA B37 allele is more frequent in patients with GD than in control group ($p=0.011$). The age of onset of symptoms was associated with KIR2DL2 and KIR2DS2 combination with the ligand HLA-C1 ($p=0.038$). Patients who have the HLA-C2 variant appear to have more mono/polyclonal bands in protein electrophoresis ($p=0.007$, OR=21.3). An association between the DR11 ($p=0.008$) and DR13 ($p=0.011$) alleles and disease severity was found. The DR11 allele appears to be associated with neurological impairment, while the DR13 allele to the development of osteonecrosis. **Conclusion:** Our data suggest a possible association between *KIR* genes and *HLA* genes and GD. They should be studied in other cohorts of GD patients as they seem to be a phenotype modifying factor.

LISTA DE TABELAS

Revisão da Literatura

Tabela 1. Comparação dos tipos de Doença de Gaucher.....	21
--	----

Artigo original: KIR genes and HLA class I ligands in Gaucher disease

Table 1. Clinical and demographic features of the study sample.....	72
--	----

Table 2. <i>KIR</i> gene, ligand frequencies (%) and their association in controls (n=250) and Gaucher disease (GD) patients (n=31).....	73
---	----

Table 3. Frequency of KIR2DL2 and KIR2DS2 in the presence of its ligand and onset of symptoms/age at diagnosis	73
---	----

Table 4. Frequencies (%) of C1 and C2 group in Gaucher disease relative to absence (17) and presence (14) of polyclonal/monoclonal bands.....	74
--	----

Artigo original: Human Leukocyte Antigens and Gaucher disease: is there any association?

Table 1. Clinical and demographic features of the study sample.....	88
--	----

Table 2. Comparison of HLA-A allele frequencies in patients and controls.....	88
--	----

Table 3. Comparison of HLA-B allele frequencies in patients and controls.....	89
--	----

Table 4. Comparison of HLA-DR allele frequencies in patients and controls.....	89
---	----

Table 5. Relationship of disease severity, HLA DR11 and HLA DR13.....	90
--	----

LISTA DE FIGURAS

Revisão da Literatura

Figura 1. Rota da degradação dos glicoesfingolipídios.....	16
Figura 2. Receptores KIR na membrana celular.....	32
Figura 3. Representação esquemática dos haplótipos A e B no locus <i>KIR</i>	34

ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

DG: Doença de Gaucher

EMA: *European Medicines Agency* – Agência Europeia de Medicamentos

EUA: Estados Unidos da América

FDA: *U.S. Food and Drug Administration* – Administração de Alimentos e Medicamentos dos EUA

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HLA: *Human leukocyte antigen* - Antígeno leucocitário humano

IL: Interleucina

KIR: *Killer immunoglobulin like receptor* - Receptor do tipo imunoglobulina da célula NK

LRC: *Leukocyte Ig-like receptor complex* - Complexo de receptores leucocitários

M-CSF: *Macrophage colony-stimulation factor* – Fator estimulado de colônia de macrófagos

MGUS: Gamopatia monoclonal de significância indeterminada

MHC: *Major Histocompatibility Complex* – Complexo Maior de Histocompatibilidade

MM: Mieloma múltiplo

NK: *Natural killer cells* - Células matadoras naturais

PCR: *Polimerase chain reaction* - Reação em cadeia da polimerase

SSP: *Sequence specific primers* - Sequência de oligonucleotídeos iniciadores específicos

SUS: Sistema Único de Saúde

TCR: Receptor de célula T

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

TRE: Terapia de reposição enzimática

Sumário

AGRADECIMENTOS.....	4
RESUMO	5
ABSTRACT.....	6
LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
ABREVIATURAS E SIGLAS.....	9
INTRODUÇÃO	13
REVISÃO DA LITERATURA.....	14
1. Doença de Gaucher.....	15
1.1 Genética.....	16
1.2 Fisiopatogênese	17
1.3 Manifestações clínicas e variabilidade fenotípica.....	18
1.4 Características de todos os tipos de DG ao diagnóstico ^{10, 26}	19
1.5 Diagnóstico	22
1.5.1 Bioquímica.....	22
1.5.2 Molecular	23
1.5.3 Exames auxiliares.....	24
1.6 Tratamento	24
1.7 Doença de Gaucher no Centro de Referência do Rio Grande do Sul.....	27
2. Sistema imune e Doença de Gaucher	29
3. Células NK (<i>Natural Killer</i>).....	30
4. Receptores KIR (<i>Killer cell immunoglobulin-like receptor</i>).....	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DA LITERATURA	35
JUSTIFICATIVA.....	51
OBJETIVOS	52

ARTIGO ORIGINAL 1	53
CONCLUSÕES.....	91
CONSIDERAÇÕES FINAIS / PERSPECTIVAS	93
APÊNDICES	95
Apêndice I - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	95
Apêndice II – Ficha de coleta de dados	98

INTRODUÇÃO

A medicina genômica refere-se à aplicação da informação genética de larga-escala e a consideração de todo o genoma, proteoma, transcriptoma, metaboloma e/ou epigenoma na prática da medicina e na tomada de decisão médica. Os seus potenciais benefícios incluem a prevenção, a detecção precoce e o tratamento mais efetivo da doença, com redução geral dos custos gerais de cuidado com a saúde. O termo “translacional” (“medicina translacional”, “genômica translacional”) tem sido bastante utilizado neste contexto, significando a busca de aproximação entre a ciência básica e a prática clínica.

O trabalho ora apresentado vale-se desta interação clínico-laboratorial, na tentativa de gerar informações inovadoras sobre a doença de Gaucher, uma doença relevante para o SUS devido ao alto valor despendido para aquisição de enzimas recombinantes e tratamento de comorbidades decorrentes da evolução da doença. A proposta reflete o conceito de que passos metabólicos e imunogenéticos podem ser responsáveis pela diferenciação fenotípica e, possivelmente, de resposta terapêutica individualizada apresentada pelos pacientes com doença de Gaucher.

Considerando esses comentários, propôs-se a seguinte hipótese de trabalho:

- 1) Existe associação entre variantes *KIR*, *HLA* e *KIR-HLA* e manifestações clínicas apresentadas por pacientes com doença de Gaucher.

Tal hipótese foi testada em uma amostra de 31 pacientes com doença de Gaucher. Estes pacientes foram caracterizados, em caráter original, por meio da tipagem

KIR-HLA (estudo transversal, observacional e controlado) e de desfechos clínicos e bioquímicos relevantes principalmente dos pontos de vista ósseo e imunológico (estudo transversal, retrospectivo e observacional).

REVISÃO DA LITERATURA

1. Doença de Gaucher

Até o momento, foram descritas mais de 45 doenças lisossômicas com uma incidência estimada de 1 em cada 5000 nascidos vivos¹.

A Doença de Gaucher (DG) é a mais frequente das doenças lisossômicas, com uma incidência estimada de 1 em cada 57.000 nascidos vivos no mundo², porém em judeus Ashkenazi a incidência chega a 1 em cada 400 nascidos vivos³. É causada por mutações em ambos os alelos do gene *GBA*, que codifica a enzima lisossomal beta-glicosidase ácida (glucocerebrosidase), responsável pela hidrólise de glicocerebrosídeo em glicose e ceramida⁴ (Figura 1). Como consequência, há acúmulo de glicocerebrosídeo nos macrófagos, principalmente no baço, fígado, medula óssea e pulmão, caracterizando a DG como uma doença multissistêmica, com heterogeneidade fenotípica.

Apesar da alteração genética e das rotas bioquímicas serem bem caracterizadas, os mecanismos pelos quais o acúmulo de substrato causa as manifestações clínicas ainda não são completamente determinados^{5,6}.

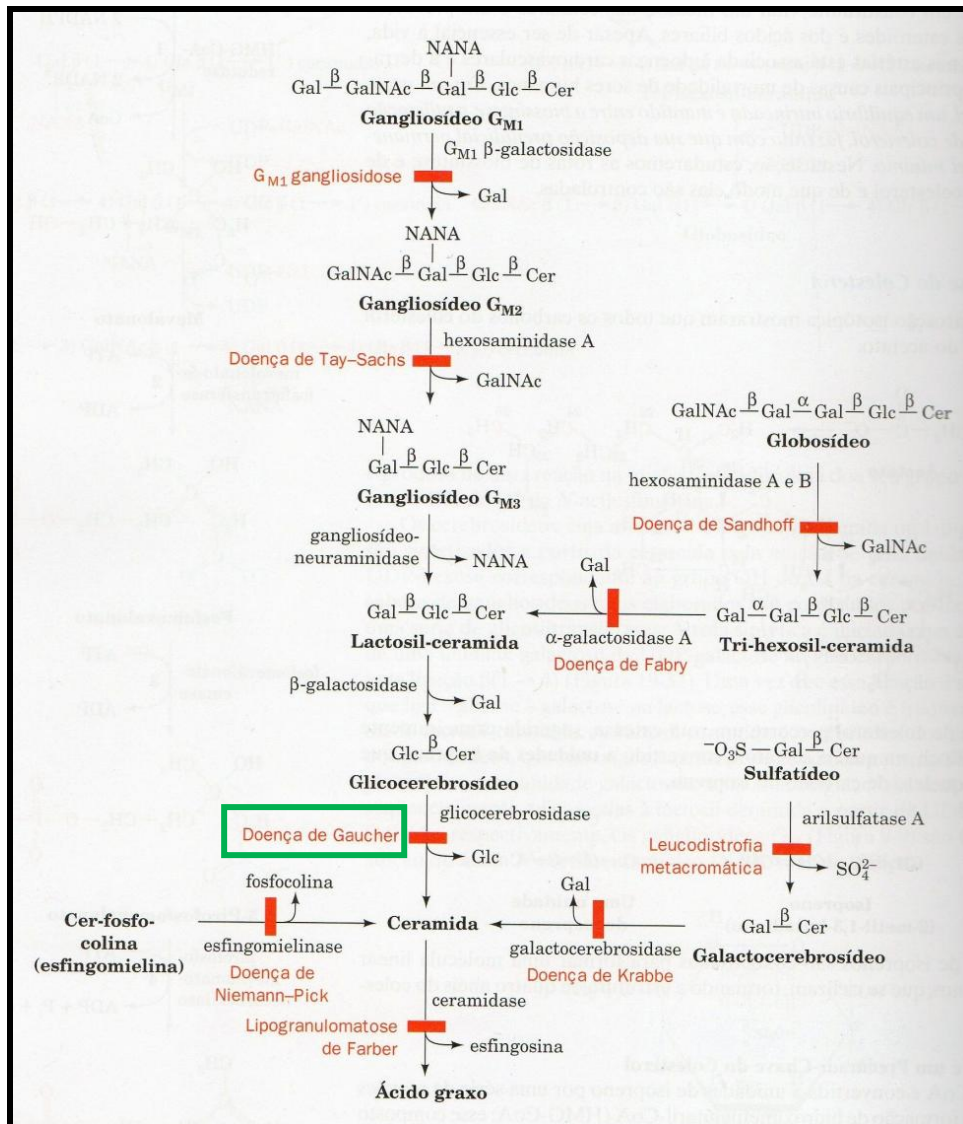


Figura 1: Rota da degradação dos glicosfingolipídios. Adaptado de Voet et al, 2002⁷.

1.1 Genética

A DG é uma doença autossômica recessiva devido a mutações no gene *GBA* localizado na região 1q21.31⁸. O gene compreende uma região de 7,6 kb e é composto por 11 éxons. Já foram descritas 357 mutações no gene *GBA* e dessas, 76% são

substituições de nucleotídeos únicos, enquanto inserções, deleções e outros alelos complexos completam os outros 24%⁹.

Existem três mutações mais frequentes nos pacientes com DG. A mutação c.1226A>G (p.N370S), que compreende 53% dos alelos mutados¹⁰ é uma mutação de sentido trocado que resulta em atividade enzimática residual. É encontrada mais comumente em europeus não-judeus e em judeus Ashkenazi^{11, 12}. A mutação c.1448T>C (p.L444P), compreende 18% dos alelos mutados¹⁰, é mais comum na Suécia e no norte da Europa e está geralmente associada a um fenótipo neuronopático quando presente em homozigose¹³. A mutação nula c.84dupG (p.84GG) representa 7% dos alelos mutados¹⁰ e até o momento não foram descritos pacientes homozigotos, possivelmente pela letalidade pré-natal.

1.2 Fisiopatogênese

O catabolismo do glicocerebrosídeo pela enzima beta-glicosidase requer uma interação com a proteína saposina C¹⁴. Indivíduos com deficiência desse cofator possuem atividade de beta-glicosidase normal, porém acumulam glicocerebrosídeo e apresentam manifestações clínicas de DG¹⁵. Cada vez mais estudam-se outros mecanismos relacionados a fisiopatologia desse acúmulo já que a quantidade de substrato nos tecidos de pacientes com DG responde por apenas uma mínima parte da organomegalia¹⁶.

As células de Gaucher (células derivadas de macrófagos com acúmulo lipídico), possuem de 20-100µm de diâmetro, apresentam o núcleo excêntrico e o citoplasma com estrias. A detecção de marcadores de superfície de macrófagos e a intensa atividade fagocítica confirmam a ontogenia de fagócitos mononucleares¹⁷. Todas as células

derivadas de macrófagos incluindo não somente as células de Kupffer e macrófagos do baço e da medula óssea, mas também osteoclastos, micróglia, macrófagos alveolares, linfonodos estão envolvidos na patogênese da DG¹⁸.

O acúmulo de glicocerebrosídeo nos macrófagos leva a uma mudança de fenótipo o que é conhecido como ativação alternativa devido a expressão de moléculas de superfície e citocinas distintas das encontradas na ativação dependente de interferon gama a qual é chamada de ativação clássica¹⁷.

Além do acúmulo de substrato lipídico, a fisiopatogênese da DG pode ser explicada por conformação enzimática defeituosa e estresse do retículo endoplasmático¹⁹, homeostase do cálcio defeituosa (um dos mecanismos responsáveis pela neuropatologia vista em pacientes com DG neuronopática aguda)²⁰, maior sensibilidade ao estresse oxidativo²¹ e alterações nos mecanismos de autofagia²².

1.3 Manifestações clínicas e variabilidade fenotípica

A DG envolve órgão viscerais, medula óssea e ossos em todos os pacientes afetados. A gravidade da doença pode ir desde a forma letal perinatal até a pacientes assintomáticos, com suas manifestações clínicas em idades variáveis. Classicamente a DG é dividida em três formas principais, definidas pelas características clínicas, curso da doença e prevalência étnica. No entanto, há uma gama de achados que se sobrepõem entre as formas clássicas, levando a avaliar a DG como um espectro contínuo e não como três subtipos distintos^{23, 24}.

A DG tipo I (MIM #230800) é a forma mais prevalente e ocorre com maior frequência na população de judeus Ashkenazi, embora a maioria dos pacientes com DG tipo I não sejam judeus. As DG tipo II e III são menos comuns e ocorrem em todas as

etnias. O tipo I se distingue do tipo II (MIM #230900) e do tipo III (MIM #231000) pelo não envolvimento do sistema nervoso central, embora alguns estudos documentem características neurológicas em pacientes do tipo I diferentes das vistas em pacientes com tipo II ou III²⁵. Pacientes com DG que apresentam envolvimento neurológico (DG neuronopática) são designados como tipo II ou tipo III de acordo com a natureza aguda ou crônica, respectivamente (Tabela 1).

1.4 Características de todos os tipos de DG ao diagnóstico^{10, 26}

- Esplenomegalia (moderada a grave – 85% dos pacientes)
- Hepatomegalia (moderada a grave – 63% dos pacientes)
- Anemia (34% dos pacientes)
- Trombocitopenia (moderada a grave – 68% dos pacientes)
- Sangramento
- Osteopenia e fraturas patológicas (osteopenia – 55%; fraturas – 7%; crises ósseas – 7%)
- Dor óssea (33% dos pacientes)
- Retardo de crescimento (36% dos pacientes)

O tipo 2 constitui 1% dos pacientes e o tipo III 7%. As manifestações mais comuns das formas neuronopáticas são: atraso do desenvolvimento, estrabismo, paralisia do olhar vertical (tipo II e III), hidropsia fetal não imune, ictiose congênita (tipo II) e demência progressiva, ataxia e mioclonias (tipo III).

DG tipo I

A DG tipo I (não neuronopática) é a forma mais frequente, em torno de 95% dos casos. Sua incidência varia de 1 em cada 20.000 a 1 em cada 200.000 nascidos vivos na população mundial²⁷, alcançando 1 em cada 400 nascidos vivos entre os judeus Ashkenazi²⁸. De acordo com a Associação Brasileira de Pacientes com Doença de Gaucher, existem mais de 600 pacientes diagnosticados no Brasil.

Essa forma de DG afeta crianças e adultos de qualquer idade e as manifestações clínicas típicas incluem hepatoesplenomegalia, anemia, trombocitopenia e doença óssea. As citopenias ocorrem devido ao sequestro esplênico, em muitos casos.

O acúmulo de células de Gaucher na medula óssea leva a dores crônicas, osteopenia, lesões líticas, fraturas e osteonecrose.

A DG pode estar associada a outras comorbidades como doença de Parkinson, já que mutações no gene *GBA* podem representar fator de risco para o desenvolvimento de parkinsonismo²⁹ e neoplasias como linfomas, leucemias e mieloma múltiplo^{30,31}.

A progressão da doença varia e a sobrevida pode ser normal, dependendo da gravidade das complicações³². As manifestações clínicas que se apresentam durante a primeira ou segunda décadas de vida, geralmente, são mais agressivas e progredem com gravidade maior do que as que aparecem em estágios mais avançados de vida.

DG tipo II

A forma neuronopática aguda ocorre em menos de 1 em cada 100.000 nascidos vivos e geralmente afeta crianças entre 4 e 5 meses de vida, com comprometimento do cérebro, baço, fígado e pulmões. A clínica neurológica é grave com envolvimento

bulbar (estridor, estrabismo, dificuldades para engolir) e piramidal (opistótono, espasticidade e trismo). A evolução é rápida e os pacientes falecem até o segundo ano de vida, principalmente devido a falência pulmonar³³.

DG tipo III

A incidência da forma neuronopática subaguda é em torno de 1 em cada 100.000 nascidos vivos. Distribui-se por todas as populações, mas predomina em regiões do nordeste da Suécia¹³. Os pacientes com DG tipo III podem apresentar manifestações sistêmicas semelhantes a pacientes com o tipo I e o comprometimento neurológico pode se manifestar em qualquer idade, geralmente com epilepsia, ataxia, paralisia do olhar vertical ou demência³⁴. Alguns pacientes podem apresentar opacificação de córnea, doença cardíaca valvular e calcificação progressiva. A expectativa de vida é de 20 a 30 anos³⁵.

Tabela 1: Comparação dos tipos de Doença de Gaucher³⁶⁻³⁸

	Tipo I	Tipo II	Tipo III
Início dos sintomas	Infância até adulto	Primeiro ano de vida	Infância
Hematológico	Anemia, trombocitopenia	Mínima trombocitopenia	Anemia
Ossos	Osteopenia, osteoesclerose	Mínimo comprometimento	Osteopenia, osteoesclerose
Neurológico	Não	Epilepsia, hipertonia, atraso neuropsicomotor grave, apnéia	Mioclonias, demência progressiva, ataxia
Outros sistemas	Fibrose hepática, hipertensão pulmonar, gamopatias	Ictiose congênita	Ocular, cardíaco e vascular
Progressão	Lenta	Rápida	Variável
Expectativa de vida	Diminuída, mas pode ser normal	Morrem antes dos 2 anos de vida	20-30 anos
Mutação mais associada	c.1226A>G (p.N370S)	Várias	c.1448T>C (p.L444P)
Prevalência étnica	100 vezes mais comum em judeus Ashkenazi	Não	Suecos

Diversos genes modificadores, genes contíguos, proteínas transportadoras e fatores ambientais podem influenciar o fenótipo dos pacientes com DG.

Dentre os fatores genéticos, está a expressão do gene *PSAP* (localizado no cromossomo 10q21), que codifica o cofator saposina C, uma proteína ativadora da beta-glicosidase. Indivíduos homozigotos para mutações no gene *PSAP* podem também desenvolver a DG¹⁵.

A eficiência do mecanismo de transporte da beta-glicosidase para os lisossomos é influenciada por mutações nos genes que codificam proteínas de membrana associadas aos lisossomos (*LAMP-1* e *LAMP-2*), e que participam do transporte intracelular da beta-glicosidase a partir do retículo endoplasmático, podendo influenciar o fenótipo de pacientes com DG³⁹.

Um fator possivelmente relacionado às manifestações ósseas é a presença de mutações no gene que codifica a interleucina-6 (*IL-6*), secretada por macrófagos, que estimula a reabsorção óssea⁴⁰.

Apenas os mecanismos acima não são suficientes para explicar a variabilidade clínica apresentada pelos pacientes com DG, já que há descrição de fenótipos diferentes em gêmeos monozigóticos, corroborando para a existência de genes modificadores e indicando uma possível importância da influência ambiental^{41, 42}.

1.5 Diagnóstico

1.5.1 Bioquímica

O diagnóstico definitivo de DG requer confirmação da deficiência da enzima beta-glicosidase em leucócitos ou fibroblastos. Indivíduos com suspeita clínica e níveis enzimáticos não característicos requerem confirmação com análise em fibroblastos ou análise molecular do gene *GBA*. Os valores de referência variam de acordo com o laboratório e a técnica utilizada. A atividade residual enzimática não se correlaciona com a gravidade da doença. A análise enzimática em leucócitos ou fibroblastos de indivíduos heterozigotos pode se sobrepor a valores de indivíduos saudáveis ou afetados⁴³.

Pacientes com DG apresentam níveis elevados da enzima quitotriosidase plasmática (sintetizada por macrófagos ativados). Embora possa auxiliar no diagnóstico, é importante lembrar que em torno de 6% da população apresentam deficiência dessa enzima⁴⁴.

1.5.2 Molecular

A análise de mutações comuns do gene *GBA* é um método eficaz para confirmar o diagnóstico de DG e a primeira escolha para identificar portadores entre os familiares de pacientes com genótipo conhecido. No entanto, ao não se encontrar ambas as mutações, há possibilidade de realização de sequenciamento completo do gene, método já disponível clinicamente.

A análise de DNA auxilia na classificação dos pacientes e na predição de achados clínicos. Por exemplo, até 75% dos indivíduos homozigotos para a mutação c.1226A>G (p.N370S) apresentam sintomas de DG⁴⁵, porém sem envolvimento neurológico⁴⁶. A mutação p.D409H está associada a envolvimento cardíaco e da córnea⁴⁷.

De acordo com um estudo de 221 pacientes, o genótipo mais comum em pacientes brasileiros é o p.N370S/L444P³.

1.5.3 Exames auxiliares

Avaliação hematológica frequentemente demonstra anemia, trombocitopenia e leucopenia e auxilia na diferenciação entre leucemias e linfomas. Em 40% dos pacientes com DG o tempo de protrombina e o tempo de tromboplastina parcial estão elevados. Baixos níveis de fibrinogênio e D-dímero aumentado indicam uma ativação do sistema fibrinolítico⁴⁸. Os sintomas hemorrágicos podem estar relacionados tanto a defeitos qualitativos quanto quantitativos das plaquetas e dos fatores de coagulação⁴⁹. A biópsia e o aspirado de medula óssea demonstram infiltração de células de Gaucher, permitindo a diferenciação entre infiltrações leucêmicas e doenças infecciosas além de distinguir os macrófagos de outras patologias lisossomais, como Niemann-Pick⁵⁰.

1.6 Tratamento

Durante muitos anos, a DG foi contornada com o tratamento sintomático e com medidas paliativas, tais como a esplenectomia, utilizada para atenuar o atraso no crescimento, as citopenias e a compressão abdominal. Atualmente, o tratamento de escolha é a terapia de reposição enzimática (TRE), disponível a partir da década de 90. Essa terapia tem permitido a melhora da qualidade de vida para os pacientes através da reversão de muitos sinais sintomas^{51, 52}. Entretanto, a quantidade de enzima necessária para manter a qualidade de vida e a reversão dos sintomas ainda é controversa.

A TRE utilizada nos pacientes com DG é um tratamento de alto custo (de 100 a 300 mil dólares/ano por paciente)^{53, 54}. O tratamento deve ser administrado mediante infusões do medicamento a cada 14 dias, sob a supervisão de um profissional da saúde treinado (médico, enfermeiro, etc.). No manejo da medicação, principalmente em locais que atendem a diversos pacientes, é importante a presença de um farmacêutico para o monitoramento da adequação e fracionamento das doses. A resposta à TRE é distinta e de acordo com os tipos da DG, sendo que os pacientes do tipo I são os melhores respondedores⁵².

Segundo o Ministério da Saúde, encontram-se atualmente em tratamento com TRE, no Brasil, em torno de 600 pacientes. A venda mundial da enzima recombinante, que em 2005 foi produzida ao restrito grupo de aproximadamente 4.000 pacientes no mundo inteiro, chega a um bilhão de dólares por ano⁵⁵. O Brasil é o terceiro país do mundo em número de pacientes em tratamento. É fácil perceber a importância econômica desse tratamento no país, onde a terapia é subsidiada pelo sistema público de saúde, demonstrando que a DG pode ser de baixa incidência, mas de significativo impacto econômico.

Até 2009, existia somente a imiglucerase (produzida pelo laboratório *Genzyme Corporation*, Allston, EUA) como enzima recombinante para TRE. Atualmente, novas opções surgiram no mercado brasileiro e internacional como a alfaveliglucerase produzida pela empresa *Shire HGT*, Dublin, Irlanda (já aprovada pela ANVISA) e a taliglucerase alfa, produzida pela *Protalix*, Carmiel, Israel (aguardando aprovação definitiva pela ANVISA). Apesar da histórica utilização de imiglucerase, estudos demonstram que as três enzimas recombinantes são similares tanto estruturalmente quanto na manutenção de parâmetros clínicos adequados pelos pacientes⁵⁶. Cerca de 1%

dos pacientes tem reações adversas à TRE com imiglucerase e produzem anticorpos contra a enzima sintética, fazendo com que a manutenção das infusões de tal enzima nesses pacientes seja feita com parcimônia.

Há um tratamento alternativo aprovado pela EMEA, FDA e ANVISA: a terapia de redução de substrato com miglustate (*Zavesca®*, *Actelion Pharmaceuticals*, Freiburg, Alemanha) indicada para pacientes adultos com DG que apresentam contraindicação ao uso de imiglucerase. Essa terapia é feita com a utilização de inibidores da síntese de substrato que atuam na via dos esfingolípídios^{55, 57, 58}. Em vez de substituir a enzima deficiente, a terapia de redução de substrato visa diminuir a síntese do glicocerebrosídeo que se acumula nos tecidos dos pacientes com DG. A vantagem do miglustate é que, por ser uma molécula pequena, de administração oral, não provoca resposta imunológica e pode cruzar a barreira hemato-encefálica. Além de atuar como inibidor da glicosiltransferase, envolvida na síntese do glicocerebrosídeo, esse mesmo composto pode funcionar como uma chaperona, aumentando a atividade enzimática da β -glicosidase quando usado em baixas concentrações⁵⁹. No entanto, os efeitos colaterais dessa terapia são mais significativos que os da TRE, incluindo diarreia, tremor e parestesia, entre outros⁶⁰.

Outros tratamentos para as doenças lisossômicas estão em desenvolvimento e representam uma perspectiva futura de tratamento para a DG, incluindo o uso de chaperonas⁶⁵ a terapia gênica^{67, 68} e o transplante de células-tronco⁶⁹. Ademais, o alto custo da TRE pode restringir seu potencial de uso, o que já ocorre em alguns países⁷⁰⁻⁷². Eventualmente esses novos tratamentos poderão ser utilizados de forma complementar à TRE⁵⁶.

1.7 Doença de Gaucher no Centro de Referência do Rio Grande do Sul

O Centro de Referência Estadual para DG foi implementado em 2003, no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), e segue todas as orientações previstas no respectivo protocolo do Ministério da Saúde. Todos os processos administrativos solicitando, ao Rio Grande do Sul, o fornecimento de enzima recombinante, são avaliados pelo médico do centro; caso tenha o seu processo deferido, o usuário é encaminhado para atendimento neste local. Dos 36 pacientes diagnosticados com DG no estado, 28 pacientes estão em tratamento com TRE (26 do tipo I e 2 do tipo III), 11 atualmente realizam as infusões no Centro e os demais realizam as infusões em outros locais. Entretanto, todos os pacientes, inclusive os que não realizam as infusões no Centro estão sendo acompanhados e monitorizados no HCPA, por meio de avaliações trimestrais, conforme previsto no protocolo.

As principais alterações ocorridas em relação à prestação da assistência farmacêutica (até então, não centralizada), após a criação do Centro de Referência Gaucher do Rio Grande do Sul, envolveram a otimização da dose prescrita (de acordo com o quadro clínico apresentado pelo usuário e com o respectivo Protocolo) e aplicada de enzima recombinante (por meio de compartilhamento dos frascos, visto que todos os pacientes que realizam as infusões no Centro assim o fazem no mesmo dia). Além disso, os pacientes que realizam infusão no Centro não necessitam mais retirar o medicamento na Farmácia do Estado (a enzima é encaminhada diretamente para o Centro, onde é armazenada e dispensada no dia de infusão, não sendo mais necessário, portanto, que o usuário tenha contato com o medicamento). Além da monitorização propriamente dita, outras atividades de orientação são realizadas pela farmacêutica, como incentivo à adesão ao tratamento. Como material de apoio no processo de

monitorização/orientação são utilizados o “Guia de Orientação ao Paciente” e a “Ficha Farmacoterapêutica” do protocolo Gaucher.

O consumo bimestral de enzima recombinante caiu de 400 para 250 frascos a partir da adoção destas medidas, sendo a otimização da dose prescrita de enzima recombinante o fator que mais influenciou (um frasco de imiglucerase com 200 UI custa para o Ministério da Saúde em torno de U\$ 650). A redução do consumo de tal medicação não mostrou associação com piora do quadro clínico dos pacientes, embora não tenham sido utilizados, no seguimento dos pacientes, métodos mais sensíveis para avaliação do comprometimento ósseo, como ressonância magnética (em fase de implantação). A melhoria do atendimento dos usuários pôde ser evidenciada pela grande satisfação dos usuários do serviço em pesquisa realizada ao final dos quatro anos de funcionamento do Centro⁷².

Até 2010, a medicação escolhida pelo Ministério da Saúde para fornecimento para todos os pacientes brasileiros era a imiglucerase. Devido à contaminação na fabricação da enzima, houve interrupção no fornecimento a partir da metade de 2010 até o início de 2011. Em caráter emergencial, a enzima taliglucerase alfa foi aprovada pela ANVISA por um período de quatro meses para suprir a falta da imiglucerase, sendo a medicação de escolha, protocolada pelo Ministério da Saúde, até o final de 2011, quando foi publicada uma nova portaria regularizando a utilização das três enzimas recombinantes (imiglucerase, taliglucerase alfa e alfaveliglucerase), além da terapia de redução de substrato (miglustate). No momento, há pacientes em tratamento com as três enzimas recombinantes.

2. Sistema imune e Doença de Gaucher

Alterações na função dos macrófagos (devido ao acúmulo de glicocerebrosídeo) dos pacientes com DG são especuladas como contribuintes para a doença, principalmente para a hepatoesplenomegalia e o comprometimento ósseo⁷³.

A DG é a doença lisossômica com maior envolvimento da imunidade, tanto que uma das hipóteses existentes para explicar a expressão fenotípica desta doença é a existência de um estímulo crônico do sistema imune⁷⁴.

Os pacientes com DG apresentam níveis elevados de IgA, IgG e IgM, auto anticorpos^{75, 76} e uma maior incidência de gamopatia policlonal, gamopatia monoclonal de significância indeterminada (MGUS) e mieloma múltiplo (MM)^{77, 78}. Esta resposta imune poderia gerar uma resposta inflamatória levando a dano celular, mediado por citocinas. Algumas das citocinas encontradas elevadas em pacientes com DG incluem IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α e M-CSF^{79, 80}. Como citocinas exercem um papel regulatório importante em células do sistema imune, alguns autores atribuem o seu desbalanço a um estado pró-inflamatório e ao aparecimento de malignidades hematológicas⁸¹⁻⁸⁴.

Outra evidência de uma resposta pró-inflamatória em pacientes com DG é a presença de níveis elevados de moléculas apresentadoras de antígenos, incluindo moléculas de MHC classe II, bem como o aumento da expressão de antígenos *HLA* DR^{85, 86}.

Apesar do comprometimento imune, os pacientes com DG não apresentam aumento da frequência de infecções.

3. Células NK (*Natural Killer*)

As células *natural killer* (NK) são um grupo de linfócitos que diferem das células T e B, por serem maiores e apresentar citoplasma granular, que fazem parte da imunidade inata do organismo contra patógenos infecciosos e malignidades, com atividade citotóxica e citolítica, mediado por citocinas inflamatórias⁸⁷.

Estão distribuídas em vários compartimentos, sendo os mais frequentes o sangue periférico e o baço⁸⁸ perfazendo um total de 10-15% das células mononucleares circulantes do sangue. Imunofenotipicamente são caracterizadas por marcadores de superfície CD16 e CD56 e ausência de receptor de célula T (TCR)⁸⁹.

As células NK expressam pelo menos um receptor inibitório cuja interação com moléculas de HLA classe I (HLA A, B e C) exerce um importante controle para evitar a resposta a células normais do organismo⁹⁰.

4. Receptores KIR (*Killer cell immunoglobulin-like receptor*)

Os receptores KIR são representantes da família das imunoglobulinas e estão presentes na superfície das células NK⁹¹ e em alguns linfócitos T (NKT)⁹².

Até o momento, foram descritos 15 genes *KIR* (*KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR2DL5A*, *KIR2DL5B*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3* e *KIR3DS1*) e 2 pseudogenes (*KIR2DP1* e *KIR3DP1*)⁹³ localizados na região 19q13.4⁹⁴ e, tipicamente, cada um deles possui 9 éxons⁹⁵ que codificam sequências-líder (éxons 1 e 2), domínios extracelulares (D0, D1, D2; que correspondem aos éxons 3, 4 e 5, respectivamente), a cauda (éxon 6,

entre o domínio extracelular e a membrana), a porção transmembrana (éxons 7) e a cauda intracitoplasmática (éxons 8 e 9)⁹⁶.

Os receptores KIR são resultado de um sistema polimórfico e estão divididos em grupos ativadores e inibitórios. Os receptores com sinal intracelular inibitório evitam a lise da célula alvo e os ativatórios auxiliam em sua execução^{97, 98}. Possuem uma cauda intracitoplasmática comprida, por isso receberam em sua denominação a letra “L” (do inglês *long*). Já os receptores ativadores possuem cauda curta e receberam a letra “S” (do inglês *short*) (Figura 1).

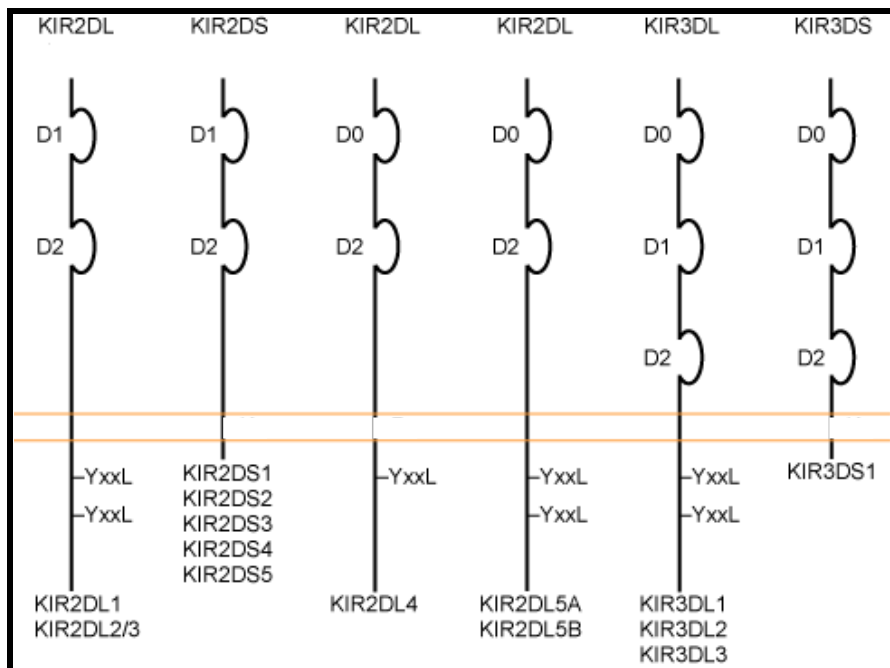


Figura 2: Receptores KIR na membrana celular. Adaptado de Jobim M., Jobim LFJ, 2008.⁹⁹

Os domínios extracelulares são responsáveis pelo reconhecimento da célula alvo. Alguns possuem dois domínios (denominados 2D, divididos em D1 e D2), com especificidade para HLA-C e outros possuem três domínios (denominados 3D,

divididos em D0, D1 e D2)¹⁰⁰, com especificidade para HLA-A ou HLA-B. Por exemplo, KIR2DL1 se liga a HLA-Cw2, HLA-Cw4, HLA-Cw5 e HLA-Cw6 (chamados de grupo C2), enquanto KIR2DL3 se liga a HLA-Cw1, HLA-Cw3, HLA-Cw7 e HLA-Cw8 (chamados grupo C1)^{101, 102}.(Tabela 2)

Tabela 2: Receptores KIR e seus ligantes HLA¹⁰³

Receptor	Ligante
KIR2DL1	HLA-C2: C*02, C*04, C*05, C*06
KIR2DL2	HLA-C1: C*01, C*03, C*07, C*08 Alguns HLA-C2: C*0501, C*0202, C*0401 Alguns HLA-B: B*4601, B*7301
KIR2DL3	HLA-C1: C*01, C*03, C*07, C*08 Alguns HLA-C2: C*0501, C*0202 Alguns HLA-B: B*4601, B*7301
KIR3DL1	Alguns HLA-A e HLA-B que expressam o epítopo Bw4 HLA B*08, B*27, B*57, B*58 HLA-A: A*24, A*23, A*32
KIR3DL2	Alguns HLA-A: A*03, A*11
KIR3DL3	Desconhecido
KIR2DL5A e B	Desconhecido
KIR2DL4	HLA-G
KIR2DS1	HLA-C2: C*02, C*04, C*05, C*06
KIR2DS2	HLA-C1: C*01, C*03, C*07, C*08 Alguns HLA-C2: C*0501, C*0202, C*0401 Alguns HLA-B: B*4601, B*7301

KIR2DS3	Desconhecido
KIR2DS4	HLA-C: C*0501, C*1601, C*0202 Alguns HLA-A: A*1102
KIR2DS5	Desconhecido
KIR3DS1	Desconhecido

Os genes *KIR* estão na região do complexo de receptores leucocitários (LRC) e entre eles há cerca de 2 kb de intervalo¹⁰⁴, formando haplótipos, classificados como A e B¹⁰⁵.

O haplótipo A possui 9 genes *KIR*, sendo apenas um ativador (KIR2DS4), cinco inibitórios e três estruturais. Já o haplótipo B possui alta diversidade de genes, tanto ativadores como inibitórios (Figura 3). Quatro genes estão presentes na maioria dos haplótipos (3DL3, 3DP1, 2DL4 e 3DL2), o que sugere conservação e estabilidade em relação à recombinação gênica¹⁰⁶. A frequência desses haplótipos varia significativamente em diferentes populações¹⁰⁷.

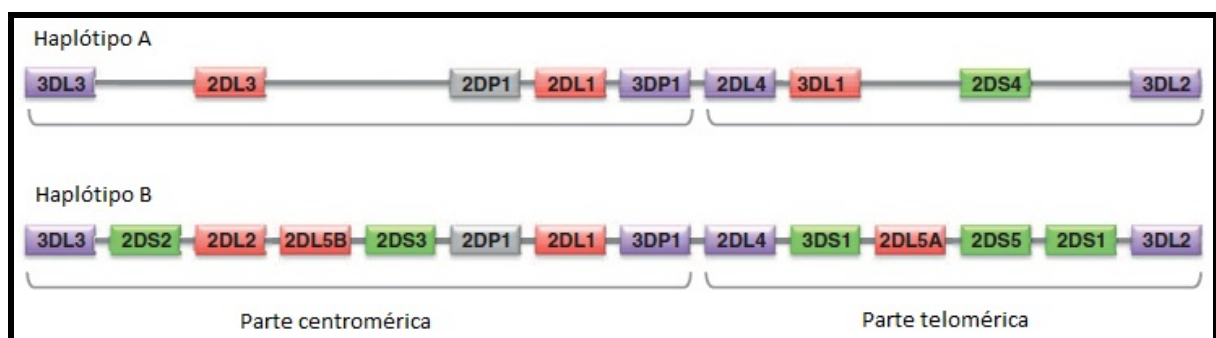


Figura 3: Representação esquemática dos haplótipos A e B no locus *KIR*. Exemplos de haplótipos A e B. Pseudogenes estão indicados em cinza, receptores ativadores em

verde e receptores inibidores em vermelho. Genes conservados, que podem codificar receptores ativadores ou inibitórios ou serem pseudogenes estão indicados em roxo. Cada fragmento centromérico pode se combinar com fragmentos teloméricos, o que aumenta a diversidade dos haplótipos KIR. Modificado de Thielens A. et al, 2012.¹⁰³

Cada vez mais os genes *KIR* estão sendo relacionados a variabilidade de resposta a patologias virais (HIV, CMV, hepatites)¹⁰⁸⁻¹¹⁰ e a doenças autoimunes como esclerose sistêmica, artrite reumatoide e psoríase, por exemplo^{106, 111, 112}.

Devido a sua diversidade haplotípica, há interesse em avaliar a associação com outras doenças. Por exemplo, foi encontrada associação de ligantes HLA e receptores KIR no desenvolvimento de pré-eclâmpsia¹¹³, neoplasia hematológicas, como linfomas e leucemias^{114, 115}, além de tumores sólidos¹¹⁶.

A DG está associada a uma diminuição do número e da atividade das células NK¹¹⁷. Entretanto, não foram localizados, na literatura, estudos que estabeleçam relação direta ou indireta entre tipagem dos genes *HLA* e *KIR* no desenvolvimento, variabilidade fenotípica ou prognóstico da DG.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DA LITERATURA

1. Meikle PJ, Grasby DJ, Dean CJ, Lang DL, Bockmann M, Whittle AM, et al. Newborn screening for lysosomal storage disorders. *Molecular genetics and metabolism*. 2006;88(4):307-14. Epub 2006/04/08.
2. Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 1999;281(3):249-54. Epub 1999/01/26.
3. Sobreira E, Pires RF, Cizmarik M, Grabowski GA. Phenotypic and genotypic heterogeneity in Gaucher disease type 1: a comparison between Brazil and the rest of the world. *Molecular genetics and metabolism*. 2007;90(1):81-6. Epub 2006/09/26.
4. Beutler E. Gaucher disease: multiple lessons from a single gene disorder. *Acta Paediatr Suppl*. 2006;95(451):103-9. Epub 2006/05/25.
5. Jmoudiak M, Futerman AH. Gaucher disease: pathological mechanisms and modern management. *British journal of haematology*. 2005;129(2):178-88. Epub 2005/04/09.
6. Hughes DA, Pastores GM. The pathophysiology of GD - current understanding and rationale for existing and emerging therapeutic approaches. *Wiener medizinische Wochenschrift*. 2010;160(23-24):594-9. Epub 2011/01/12.
7. Voet D, Voet JG, Pratt CW. *Fundamentals of biochemistry upgrade*. Rev. ed. New York: Wiley; 2002.
8. Cormand B, Montfort M, Chabas A, Vilageliu L, Grinberg D. Genetic fine localization of the beta-glucocerebrosidase (GBA) and prosaposin (PSAP) genes: implications for Gaucher disease. *Human genetics*. 1997;100(1):75-9. Epub 1997/07/01.
9. Database HGM. [updated February 2012]; Available from: www.hgmd.cf.ac.uk.

10. Charrow J, Andersson HC, Kaplan P, Kolodny EH, Mistry P, Pastores G, et al. The Gaucher registry: demographics and disease characteristics of 1698 patients with Gaucher disease. *Archives of internal medicine*. 2000;160(18):2835-43. Epub 2000/10/12.
11. Beutler E, Nguyen NJ, Henneberger MW, Smolec JM, McPherson RA, West C, et al. Gaucher disease: gene frequencies in the Ashkenazi Jewish population. *American journal of human genetics*. 1993;52(1):85-8. Epub 1993/01/01.
12. Beutler E, Gelbart T. Gaucher disease mutations in non-Jewish patients. *British journal of haematology*. 1993;85(2):401-5. Epub 1993/10/01.
13. Dahl N, Lagerstrom M, Erikson A, Pettersson U. Gaucher disease type III (Norrbottnian type) is caused by a single mutation in exon 10 of the glucocerebrosidase gene. *American journal of human genetics*. 1990;47(2):275-8. Epub 1990/08/01.
14. Grabowski GA, Gatt S, Horowitz M. Acid beta-glucosidase: enzymology and molecular biology of Gaucher disease. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. 1990;25(6):385-414. Epub 1990/01/01.
15. Pampols T, Pineda M, Giros ML, Ferrer I, Cusi V, Chabas A, et al. Neuronopathic juvenile glucosylceramidosis due to sap-C deficiency: clinical course, neuropathology and brain lipid composition in this Gaucher disease variant. *Acta neuropathologica*. 1999;97(1):91-7. Epub 1999/02/04.
16. Cox TM. Gaucher's disease--an exemplary monogenic disorder. *Qjm*. 2001;94(8):399-402. Epub 2001/08/09.
17. Boven LA, van Meurs M, Boot RG, Mehta A, Boon L, Aerts JM, et al. Gaucher cells demonstrate a distinct macrophage phenotype and resemble alternatively activated macrophages. *Am J Clin Pathol*. 2004;122(3):359-69. Epub 2004/09/15.

18. Pastores GM. Gaucher's Disease. Pathological features. *Bailliere's clinical haematology*. 1997;10(4):739-49. Epub 1998/03/14.
19. Ron I, Horowitz M. ER retention and degradation as the molecular basis underlying Gaucher disease heterogeneity. *Human molecular genetics*. 2005;14(16):2387-98. Epub 2005/07/08.
20. Pelled D, Trajkovic-Bodenec S, Lloyd-Evans E, Sidransky E, Schiffmann R, Futerman AH. Enhanced calcium release in the acute neuronopathic form of Gaucher disease. *Neurobiology of disease*. 2005;18(1):83-8. Epub 2005/01/15.
21. 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. *Journal of cellular physiology*. 2007;212(1):223-35. Epub 2007/04/20.
22. Sun Y, Grabowski GA. Impaired autophagosomes and lysosomes in neuronopathic Gaucher disease. *Autophagy*. 2010;6(5). Epub 2010/05/12.
23. E B, GA G. Gaucher disease. In: Scriver CR BA, Sly WS, Valle D, editor. *Metabolic and molecular bases of inherited disease* New York McGraw-Hill; 2001. p. 3635.
24. Sidransky E. Gaucher disease: complexity in a "simple" disorder. *Molecular genetics and metabolism*. 2004;83(1-2):6-15. Epub 2004/10/07.
25. Biegstraaten M, van Schaik IN, Aerts JM, Hollak CE. 'Non-neuronopathic' Gaucher disease reconsidered. Prevalence of neurological manifestations in a Dutch cohort of type I Gaucher disease patients and a systematic review of the literature. *Journal of inherited metabolic disease*. 2008;31(3):337-49. Epub 2008/04/12.

26. Kaplan P, Andersson HC, Kacena KA, Yee JD. The clinical and demographic characteristics of nonneuronopathic Gaucher disease in 887 children at diagnosis. *Archives of pediatrics & adolescent medicine*. 2006;160(6):603-8. Epub 2006/06/07.
27. Altarescu G, Schiffmann R, Parker CC, Moore DF, Kreps C, Brady RO, et al. Comparative efficacy of dose regimens in enzyme replacement therapy of type I Gaucher disease. *Blood cells, molecules & diseases*. 2000;26(4):285-90. Epub 2000/10/24.
28. Zimran A, Gelbart T, Westwood B, Grabowski GA, Beutler E. High frequency of the Gaucher disease mutation at nucleotide 1226 among Ashkenazi Jews. *American journal of human genetics*. 1991;49(4):855-9. Epub 1991/10/01.
29. Lwin A, Orvisky E, Goker-Alpan O, LaMarca ME, Sidransky E. Glucocerebrosidase mutations in subjects with parkinsonism. *Molecular genetics and metabolism*. 2004;81(1):70-3. Epub 2004/01/20.
30. Landgren O, Turesson I, Gridley G, Caporaso NE. Risk of malignant disease among 1525 adult male US Veterans with Gaucher disease. *Archives of internal medicine*. 2007;167(11):1189-94. Epub 2007/06/15.
31. Cheung WY, Greenberg CR, Bernstein K, Schacter B, Fourie T, Seftel MD. Type I Gaucher Disease Following Chemotherapy for Light Chain Multiple Myeloma. *Internal Medicine*. 2007;46(15):1255-8.
32. Barranger JA, O'Rourke E. Lessons learned from the development of enzyme therapy for Gaucher disease. *Journal of inherited metabolic disease*. 2001;24 Suppl 2:89-96; discussion 87-8. Epub 2002/01/05.
33. Mignot C, Doummar D, Maire I, De Villemeur TB, French Type 2 Gaucher Disease Study G. Type 2 Gaucher disease: 15 new cases and review of the literature. *Brain & development*. 2006;28(1):39-48. Epub 2006/02/18.

34. Davies EH, Erikson A, Collin-Histed T, Mengel E, Tylki-Szymanska A, Vellodi A. Outcome of type III Gaucher disease on enzyme replacement therapy: review of 55 cases. *Journal of inherited metabolic disease*. 2007;30(6):935-42. Epub 2007/11/13.
35. Tylki-Szymanska A, Czartoryska B. Enzyme replacement therapy in type III Gaucher disease. *Journal of inherited metabolic disease*. 1999;22(2):203-4. Epub 1999/05/11.
36. Balwani M, Fuerstman L, Kornreich R, Edelmann L, Desnick RJ. Type 1 Gaucher disease: significant disease manifestations in "asymptomatic" homozygotes. *Archives of internal medicine*. 2010;170(16):1463-9. Epub 2010/09/15.
37. Gupta N, Oppenheim IM, Kauvar EF, Tayebi N, Sidransky E. Type 2 Gaucher disease: phenotypic variation and genotypic heterogeneity. *Blood cells, molecules & diseases*. 2011;46(1):75-84. Epub 2010/10/01.
38. Cox TM, Schofield JP. Gaucher's disease: clinical features and natural history. *Bailliere's clinical haematology*. 1997;10(4):657-89. Epub 1998/03/14.
39. Whitfield PD, Nelson P, Sharp PC, Bindloss CA, Dean C, Ravenscroft EM, et al. Correlation among genotype, phenotype, and biochemical markers in Gaucher disease: implications for the prediction of disease severity. *Molecular genetics and metabolism*. 2002;75(1):46-55. Epub 2002/02/05.
40. Altarescu G. The interleukin-6 promoter polymorphism in Gaucher disease: a new modifier gene? *Qjm*. 2003;96(8):575-8.
41. Biegstraaten M, van Schaik IN, Aerts JM, Langeveld M, Mannens MM, Bour LJ, et al. A monozygotic twin pair with highly discordant Gaucher phenotypes. *Blood cells, molecules & diseases*. 2011;46(1):39-41. Epub 2010/11/09.
42. Lachmann RH, Grant IR, Halsall D, Cox TM. Twin pairs showing discordance of phenotype in adult Gaucher's disease. *Qjm*. 2004;97(4):199-204. Epub 2004/03/19.

43. Michelin K, Wajner A, Goulart Lda S, Fachel AA, Pereira ML, de Mello AS, et al. Biochemical study on beta-glucosidase in individuals with Gaucher's disease and normal subjects. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2004;343(1-2):145-53. Epub 2004/04/30.
44. Hollak CE, van Weely S, van Oers MH, Aerts JM. Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease. *The Journal of clinical investigation*. 1994;93(3):1288-92. Epub 1994/03/01.
45. Strasberg PM, Triggs-Raine BL, Warren IB, Skomorowski MA, McInnes B, Becker LE, et al. Genotype-phenotype pitfalls in Gaucher disease. *Journal of clinical laboratory analysis*. 1994;8(4):228-36. Epub 1994/01/01.
46. Sidransky E, Bottler A, Stubblefield B, Ginns EI. DNA mutational analysis of type 1 and type 3 Gaucher patients: how well do mutations predict phenotype? *Human mutation*. 1994;3(1):25-8. Epub 1994/01/01.
47. Chabas A, Cormand B, Balcells S, Gonzalez-Duarte R, Casanova C, Colomer J, et al. Neuronopathic and non-neuronopathic presentation of Gaucher disease in patients with the third most common mutation (D409H) in Spain. *Journal of inherited metabolic disease*. 1996;19(6):798-800. Epub 1996/01/01.
48. Hollak CE, Levi M, Berends F, Aerts JM, van Oers MH. Coagulation abnormalities in type 1 Gaucher disease are due to low-grade activation and can be partly restored by enzyme supplementation therapy. *British journal of haematology*. 1997;96(3):470-6. Epub 1997/03/01.
49. Giona F, Palumbo G, Amendola A, Santoro C, Mazzuconi MG. Platelet function and coagulation abnormalities in type 1 Gaucher disease patients: effects of enzyme replacement therapy (ERT). *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2006;4(8):1831-3. Epub 2006/08/02.

50. Rodrigues AF, Gray RG, Preece MA, Brown R, Hill FG, Baumann U, et al. The usefulness of bone marrow aspiration in the diagnosis of Niemann-Pick disease type C in infantile liver disease. *Archives of disease in childhood*. 2006;91(10):841-4. Epub 2006/06/02.
51. Mistry PK, Sadan S, Yang R, Yee J, Yang M. Consequences of diagnostic delays in type 1 Gaucher disease: the need for greater awareness among hematologists-oncologists and an opportunity for early diagnosis and intervention. *American journal of hematology*. 2007;82(8):697-701. Epub 2007/05/12.
52. Hollak CE, de Fost M, van Dussen L, Vom Dahl S, Aerts JM. Enzyme therapy for the treatment of type 1 Gaucher disease: clinical outcomes and dose - response relationships. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2009;10(16):2641-52. Epub 2009/09/12.
53. Hollak CE, Aerts JM, Ayme S, Manuel J. Limitations of drug registries to evaluate orphan medicinal products for the treatment of lysosomal storage disorders. *Orphanet journal of rare diseases*. 2011;6:16. Epub 2011/04/19.
54. de Souza MV, Krug BC, Picon PD, Schwartz IV. [High cost drugs for rare diseases in Brazil: the case of lysosomal storage disorders]. *Ciencia & saude coletiva*. 2010;15 Suppl 3:3443-54. Epub 2010/12/09. Medicamentos de alto custo para doencas raras no Brasil: o exemplo das doencas lisossomicas.
55. Pastores GM, Barnett NL, Kolodny EH. An open-label, noncomparative study of miglustat in type I Gaucher disease: efficacy and tolerability over 24 months of treatment. *Clinical therapeutics*. 2005;27(8):1215-27. Epub 2005/10/04.
56. Elstein D. Recent advances in treatment approaches to Gaucher disease. *Current pharmaceutical biotechnology*. 2011;12(6):854-60. Epub 2011/01/18.

57. Platt FM, Neises GR, Reinkensmeier G, Townsend MJ, Perry VH, Proia RL, et al. Prevention of lysosomal storage in Tay-Sachs mice treated with N-butyldeoxynojirimycin. *Science*. 1997;276(5311):428-31. Epub 1997/04/18.
58. Cox T, Lachmann R, Hollak C, Aerts J, van Weely S, Hrebicek M, et al. Novel oral treatment of Gaucher's disease with N-butyldeoxynojirimycin (OGT 918) to decrease substrate biosynthesis. *Lancet*. 2000;355(9214):1481-5. Epub 2000/05/09.
59. Alfonso P, Pampin S, Estrada J, Rodriguez-Rey JC, Giraldo P, Sancho J, et al. Miglustat (NB-DNJ) works as a chaperone for mutated acid beta-glucosidase in cells transfected with several Gaucher disease mutations. *Blood cells, molecules & diseases*. 2005;35(2):268-76. Epub 2005/07/26.
60. McCormack PL, Goa KL. Miglustat. *Drugs*. 2003;63(22):2427-34; discussion 35-6. Epub 2003/11/12.
61. Tropak MB, Reid SP, Guiral M, Withers SG, Mahuran D. Pharmacological enhancement of beta-hexosaminidase activity in fibroblasts from adult Tay-Sachs and Sandhoff Patients. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(14):13478-87. Epub 2004/01/16.
62. Abian O, Alfonso P, Velazquez-Campoy A, Giraldo P, Pocovi M, Sancho J. Therapeutic strategies for Gaucher disease: miglustat (NB-DNJ) as a pharmacological chaperone for glucocerebrosidase and the different thermostability of velaglucerase alfa and imiglucerase. *Molecular pharmaceutics*. 2011;8(6):2390-7. Epub 2011/10/13.
63. Orwig SD, Tan YL, Grimster NP, Yu Z, Powers ET, Kelly JW, et al. Binding of 3,4,5,6-tetrahydroxyazepanes to the acid-beta-glucosidase active site: implications for pharmacological chaperone design for Gaucher disease. *Biochemistry*. 2011;50(49):10647-57. Epub 2011/11/04.

64. Sun Y, Liou B, Xu YH, Quinn B, Zhang W, Hamler R, et al. Ex Vivo and in Vivo Effects of Isofagomine on Acid beta-Glucosidase Variants and Substrate Levels in Gaucher Disease. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(6):4275-87. Epub 2011/12/15.
65. Motabar O, Huang W, Marugan JJ, Southall N, DeBernardi M, Zheng W, et al. Identification of Modulators of the N370S Mutant Form of Glucocerebrosidase as a Potential Therapy for Gaucher Disease - Chemotype 1. *Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program*. Bethesda (MD)2010.
66. Muchowski PJ, Wacker JL. Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones. *Nature reviews Neuroscience*. 2005;6(1):11-22. Epub 2004/12/22.
67. Jin GS, Zhu GD, Zhao ZG, Liu FS. VP22 enhances the expression of glucocerebrosidase in human Gaucher II fibroblast cells mediated by lentiviral vectors. *Clinical and experimental medicine*. 2011. Epub 2011/08/30.
68. Giraldo P, Latre P. [Current treatment for Gaucher's disease and new prospects]. *Medicina clinica*. 2011;137 Suppl 1:50-4. Epub 2012/01/18. Tratamiento actual de la enfermedad de Gaucher y nuevas perspectivas.
69. Ringden O, Remberger M, Svahn BM, Barkholt L, Mattsson J, Aschan J, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for inherited disorders: experience in a single center. *Transplantation*. 2006;81(5):718-25. Epub 2006/03/15.
70. Connock M, Burls A, Frew E, Fry-Smith A, Juarez-Garcia A, McCabe C, et al. The clinical effectiveness and cost-effectiveness of enzyme replacement therapy for Gaucher's disease: a systematic review. *Health technology assessment*. 2006;10(24):iii-iv, ix-136. Epub 2006/06/27.

71. Mrsic M. [Diagnosis and treatment of Gaucher disease in Croatia]. *Lijecnicki vjesnik*. 2007;129 Suppl 3:38-42. Epub 2008/10/31. Dijagnoza i liječenje Morbus Gaucher u hrvatskoj.
72. Correa Krug B, Doederlein Schwartz IV, Lopes de Oliveira F, Alegria T, Campos Martins NL, Todeschini LA, et al. The Management of Gaucher Disease in Developing Countries: A Successful Experience in Southern Brazil. *Public health genomics*. 2009. Epub 2009/05/02.
73. Mizukami H, Mi Y, Wada R, Kono M, Yamashita T, Liu Y, et al. Systemic inflammation in glucocerebrosidase-deficient mice with minimal glucosylceramide storage. *The Journal of clinical investigation*. 2002;109(9):1215-21. Epub 2002/05/08.
74. Shoenfeld Y, Gallant LA, Shaklai M, Livni E, Djaldetti M, Pinkhas J. Gaucher's disease: a disease with chronic stimulation of the immune system. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 1982;106(8):388-91. Epub 1982/08/01.
75. Jurecka A, Gregorek H, Kleinotiene G, Czartoryska B, Tyłki-Szymanska A. Gaucher disease and dysgammaglobulinemia: a report of 61 patients, including 18 with GD type III. *Blood cells, molecules & diseases*. 2011;46(1):85-7. Epub 2010/08/24.
76. Shoenfeld Y, Beresovski A, Zharhary D, Tomer Y, Swissa M, Sela E, et al. Natural autoantibodies in sera of patients with Gaucher's disease. *Journal of clinical immunology*. 1995;15(6):363-72. Epub 1995/11/01.
77. de Fost M, Out TA, de Wilde FA, Tjin EP, Pals ST, van Oers MH, et al. Immunoglobulin and free light chain abnormalities in Gaucher disease type I: data from an adult cohort of 63 patients and review of the literature. *Annals of hematology*. 2008;87(6):439-49. Epub 2008/02/16.
78. Hughes DA. Enzyme, substrate, and myeloma in Gaucher disease. *American journal of hematology*. 2009;84(4):199-201. Epub 2009/03/18.

79. Hollak CE, Evers L, Aerts JM, van Oers MH. Elevated levels of M-CSF, sCD14 and IL8 in type 1 Gaucher disease. *Blood cells, molecules & diseases*. 1997;23(2):201-12. Epub 1997/08/01.
80. Barak V, Acker M, Nisman B, Kalickman I, Abrahamov A, Zimran A, et al. Cytokines in Gaucher's disease. *European cytokine network*. 1999;10(2):205-10. Epub 1999/07/10.
81. Brody JD, Advani R, Shin LK, Bingham DB, Rosenberg SA. Splenic diffuse large B-cell lymphoma in a patient with type 1 Gaucher disease: Diagnostic and therapeutic challenges. *Annals of hematology*. 2006;85(11):817-20. Epub 2006/08/29.
82. Costello R, O'Callaghan T, Sebahoun G. Gaucher disease and multiple myeloma. *Leukemia & lymphoma*. 2006;47(7):1365-8. Epub 2006/08/23.
83. Hawkesford MP, Bowey AJ, Rao J, Meara NJ. Synchronous presentation of Gaucher disease and solitary plasmacytoma with progression to multiple myeloma. *Scottish medical journal*. 2011;56(4):236. Epub 2011/11/18.
84. Rosenbloom BE, Weinreb NJ, Zimran A, Kacena KA, Charrow J, Ward E. Gaucher disease and cancer incidence: a study from the Gaucher Registry. *Blood*. 2005;105(12):4569-72. Epub 2005/02/19.
85. Balreira A, Lacerda L, Miranda CS, Arosa FA. Evidence for a link between sphingolipid metabolism and expression of CD1d and MHC-class II: monocytes from Gaucher disease patients as a model. *British journal of haematology*. 2005;129(5):667-76. Epub 2005/05/27.
86. Florena AM, Franco V, Campesi G. Immunophenotypical comparison of Gaucher's and pseudo-Gaucher cells. *Pathology international*. 1996;46(2):155-60. Epub 1996/02/01.

87. Leavy O. Natural killer cells: Maturation and function of NK cells. *Nature reviews Immunology*. 2012. Epub 2012/02/11.
88. Shi FD, Ljunggren HG, La Cava A, Van Kaer L. Organ-specific features of natural killer cells. *Nature reviews Immunology*. 2011;11(10):658-71. Epub 2011/09/24.
89. Vojvodic S, Popovic S. [Natural killer cells--biology, functions and clinical relevance]. *Medicinski preglod*. 2010;63(1-2):91-7. Epub 2010/09/29.
90. Moretta L, Bottino C, Pende D, Vitale M, Mingari MC, Moretta A. Different checkpoints in human NK-cell activation. *Trends in immunology*. 2004;25(12):670-6. Epub 2004/11/09.
91. Moretta A, Tambussi G, Bottino C, Tripodi G, Merli A, Ciccone E, et al. A novel surface antigen expressed by a subset of human CD3- CD16+ natural killer cells. Role in cell activation and regulation of cytolytic function. *The Journal of experimental medicine*. 1990;171(3):695-714. Epub 1990/03/01.
92. Van Kaer L. NKT cells: T lymphocytes with innate effector functions. *Current opinion in immunology*. 2007;19(3):354-64. Epub 2007/04/13.
93. Marsh SG, Parham P, Dupont B, Geraghty DE, Trowsdale J, Middleton D, et al. Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002. *Tissue antigens*. 2003;62(1):79-86. Epub 2003/07/16.
94. Suto Y, Maenaka K, Yabe T, Hirai M, Tokunaga K, Tadok K, et al. Chromosomal localization of the human natural killer cell class I receptor family genes to 19q13.4 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics*. 1996;35(1):270-2. Epub 1996/07/01.

95. Martin AM, Freitas EM, Witt CS, Christiansen FT. The genomic organization and evolution of the natural killer immunoglobulin-like receptor (KIR) gene cluster. *Immunogenetics*. 2000;51(4-5):268-80. Epub 2000/05/10.
96. Wilson MJ, Torkar M, Haude A, Milne S, Jones T, Sheer D, et al. Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(9):4778-83. Epub 2000/04/26.
97. Fan QR, Mosyak L, Winter CC, Wagtmann N, Long EO, Wiley DC. Structure of the inhibitory receptor for human natural killer cells resembles haematopoietic receptors. *Nature*. 1997;389(6646):96-100. Epub 1997/09/04.
98. Biassoni R, Cantoni C, Falco M, Verdiani S, Bottino C, Vitale M, et al. The human leukocyte antigen (HLA)-C-specific "activatory" or "inhibitory" natural killer cell receptors display highly homologous extracellular domains but differ in their transmembrane and intracytoplasmic portions. *The Journal of experimental medicine*. 1996;183(2):645-50. Epub 1996/02/01.
99. Jobim M, Jobim LFJ. Natural killer cells and immune surveillance. *Jornal de Pediatria*. 2008;84(7):58-67.
100. Wagtmann N, Biassoni R, Cantoni C, Verdiani S, Malnati MS, Vitale M, et al. Molecular clones of the p58 NK cell receptor reveal immunoglobulin-related molecules with diversity in both the extra- and intracellular domains. *Immunity*. 1995;2(5):439-49. Epub 1995/05/01.
101. Campbell KS, Purdy AK. Structure/function of human killer cell immunoglobulin-like receptors: lessons from polymorphisms, evolution, crystal structures and mutations. *Immunology*. 2011;132(3):315-25. Epub 2011/01/11.

102. Ugolotti E, Vanni I, Raso A, Benzi F, Malnati M, Biassoni R. Human leukocyte antigen-B (-Bw6/-Bw4 I80, T80) and human leukocyte antigen-C (-C1/-C2) subgrouping using pyrosequence analysis. *Human immunology*. 2011;72(10):859-68. Epub 2011/06/15.
103. Thielens A, Vivier E, Romagne F. NK cell MHC class I specific receptors (KIR): from biology to clinical intervention. *Current opinion in immunology*. 2012. Epub 2012/01/24.
104. Parham P. Immunogenetics of killer cell immunoglobulin-like receptors. *Molecular immunology*. 2005;42(4):459-62. Epub 2004/12/21.
105. Wende H, Colonna M, Ziegler A, Volz A. Organization of the leukocyte receptor cluster (LRC) on human chromosome 19q13.4. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society*. 1999;10(2):154-60. Epub 1999/01/29.
106. Martin MP, Bashirova A, Traherne J, Trowsdale J, Carrington M. Cutting edge: expansion of the KIR locus by unequal crossing over. *Journal of immunology*. 2003;171(5):2192-5. Epub 2003/08/21.
107. Middleton D, Meenagh A, Moscoso J, Arnaiz-Villena A. Killer immunoglobulin receptor gene and allele frequencies in Caucasoid, Oriental and Black populations from different continents. *Tissue antigens*. 2008;71(2):105-13. Epub 2007/12/12.
108. Tiemessen CT, Paximadis M, Minevich G, Winchester R, Shalekoff S, Gray GE, et al. Natural killer cell responses to HIV-1 peptides are associated with more activating KIR genes and HLA-C genes of the C1 allotype. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*. 2011;57(3):181-9. Epub 2011/03/17.
109. Stern M, Elsasser H, Honger G, Steiger J, Schaub S, Hess C. The number of activating KIR genes inversely correlates with the rate of CMV infection/reactivation in

kidney transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2008;8(6):1312-7. Epub 2008/05/01.

110. Marangon AV, Silva GF, de Moraes CF, Grotto RM, Pardini MI, de Pauli DS, et al. KIR genes and their human leukocyte antigen ligands in the progression to cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Human immunology*. 2011;72(11):1074-8. Epub 2011/09/17.

111. Salim PH, Jobim M, Bredemeier M, Chies JA, Schlottfeldt J, Brenol JC, et al. Killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genes in systemic sclerosis. *Clinical and experimental immunology*. 2010;160(3):325-30. Epub 2010/01/20.

112. Jobim M, Jobim LF, Salim PH, Cestari TF, Toresan R, Gil BC, et al. A study of the killer cell immunoglobulin-like receptor gene KIR2DS1 in a Caucasoid Brazilian population with psoriasis vulgaris. *Tissue antigens*. 2008;72(4):392-6. Epub 2008/07/23.

113. Hiby SE, Walker JJ, O'Shaughnessy K M, Redman CW, Carrington M, Trowsdale J, et al. Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *The Journal of experimental medicine*. 2004;200(8):957-65. Epub 2004/10/13.

114. Leung W, Handgretinger R, Iyengar R, Turner V, Holladay MS, Hale GA. Inhibitory KIR-HLA receptor-ligand mismatch in autologous haematopoietic stem cell transplantation for solid tumour and lymphoma. *British journal of cancer*. 2007;97(4):539-42. Epub 2007/08/02.

115. Karabon L, Jedynak A, Giebel S, Wolowiec D, Kielbinski M, Woszczyk D, et al. KIR/HLA gene combinations influence susceptibility to B-cell chronic lymphocytic

leukemia and the clinical course of disease. *Tissue antigens*. 2011;78(2):129-38. Epub 2011/07/06.

116. Romagne F, Andre P, Spee P, Zahn S, Anfossi N, Gauthier L, et al. Preclinical characterization of 1-7F9, a novel human anti-KIR receptor therapeutic antibody that augments natural killer-mediated killing of tumor cells. *Blood*. 2009;114(13):2667-77. Epub 2009/06/26.

117. Burstein Y, Zakuth V, Rechavi G, Spierer Z. Abnormalities of cellular immunity and natural killer cells in Gaucher's disease. *Journal of clinical & laboratory immunology*. 1987;23(3):149-51. Epub 1987/07/01.

JUSTIFICATIVA

A Doença de Gaucher é uma doença relevante para o SUS devido ao alto valor despendido para aquisição de enzimas recombinantes e tratamento de comorbidades, diversas delas relacionadas ao envolvimento do sistema imune. Algumas hipóteses já foram levantadas, porém, até o momento, os mecanismos imunogenéticos desse comprometimento permanecem indeterminados.

O Centro de Referência Estadual para Doença de Gaucher é responsável pelo atendimento e acompanhamento regular de todos os pacientes do RS, bem como pela dispensação da medicação fornecida pelo Ministério da Saúde. É composto por um grupo multidisciplinar que conta com médicos, nutricionistas, farmacêuticos, assistente social e estudantes de graduação e pós graduação com grande interesse em pesquisa. Em caráter inovador, propusemos que variantes dos genes *KIR*, *HLA* e suas associações possam ser responsáveis pela variabilidade fenotípica apresentada pelos pacientes com Doença de Gaucher.

OBJETIVOS

Objetivos primários

1 - Verificar a existência de variantes de genes *KIR* e de combinações de variantes *KIR-HLA* associadas à gravidade do fenótipo clínico dos pacientes com doença de Gaucher do Centro de Referência Estadual do Rio Grande do Sul.

2- Avaliar a relação da tipagem do MHC de classe I (*HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C*) e de classe II (*HLA-DR*) com características apresentadas pelos pacientes com doença de Gaucher do Centro de Referência Estadual do Rio Grande do Sul.

Objetivo secundário

Avaliar a frequência das variantes dos genes *HLA* e *KIR* de pacientes com Doença de Gaucher acompanhados no Centro de Referência Estadual do Rio Grande do Sul e compará-los com controles.

ARTIGO ORIGINAL 1

Manuscrito submetido à revista *Molecular Genetics and Metabolism*

KIR genes and HLA class I ligands in Gaucher disease

Filippo Vairo^{1,2,3}, Pâmela Portela⁴, Patrícia H. Salim⁴, Mariana Jobim⁴, Cristina Netto¹,
Alicia Dorneles¹, Suzana Mittlestadt¹, Luiz Fernando Jobim⁴, Ida Vanessa D.
Schwartz^{1,2,3,5}

¹Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

²Post Graduation Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

³Genetics Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

⁴Immunology Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

⁵BRAIN Experimental Research Group Laboratory, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

Abstract:

Gaucher disease (GD) is caused by reduced activity of a lysosomal enzyme, glucocerebrosidase, which leads to a buildup of glucocerebroside within the cells and chronic stimulation of the immune system. Natural killer (NK) cells play an important role in the immune response, and their activity is impaired in GD. Killer-cell immunoglobulin-like receptors (KIR) regulate the activity of NK cells through an interaction with specific human leukocyte antigen (HLA) class I molecules on target cells. Objectives: To analyze the variability of KIR genes in a sample of GD patients from Southern Brazil, compare it with that of controls, and look for associations between variants and clinical manifestations. Methodology: Thirty-one GD patients (24 mild, 4 moderate, and 3 severe) were analyzed and compared to 250 healthy controls. Results/Discussion: There was no between-group significant difference in the frequencies of KIR/HLA variants. Age at symptom onset was associated with KIR2DL2 and KIR2DS2 in combination with the ligand HLA-C1 ($p=0.038$). Patients who have the HLA-C2 variant appear to have more mono- and polyclonal bands on protein electrophoresis ($p=0.007$, OR 21.3). Conclusion: Although exploratory our data suggest a possible association of KIR/HLA variants and GD. Further study of KIR/HLA variants is required, as they seem to be a phenotype-modifying factor in this disease.

Take-home message: Further study of KIR/HLA variants is required, as they seem to be phenotype modifiers in GD.

Introduction

Gaucher disease (GD, OMIM 230800) is the most common lysosomal storage disorder, with an estimated worldwide incidence of 1 case per 57,000 live births [1], although this rate can reach 1 in 400 among Ashkenazi Jews [2].

GD is caused by mutations in both alleles of the *GBA* gene, which codes for lysosomal glucocerebrosidase (EC 3.2.1.45), an enzyme responsible for catalyzing the hydrolysis of glucocerebroside into glucose and ceramide [3]. Consequently, there is intracellular accumulation of glucocerebroside in macrophages, particularly in the spleen, liver, bone marrow, and lungs. GD is therefore a multisystem disorder, and exhibits phenotypic heterogeneity. Although the genetic changes and biochemical pathways that underlie Gaucher disease have been well characterized, the mechanisms whereby accumulation of glucocerebroside leads to clinical manifestations have yet to be fully determined [4, 5].

Gaucher cells (GCs, lipid-laden macrophage derivatives) have eccentric nuclei and cytoplasmic striations. Their expression of macrophage surface markers and marked phagocytic activity confirm the ontogeny of GCs as mononuclear phagocytes [6]. In addition to lipid substrate buildup, the pathogenesis of GD can be explained by defects in enzyme conformation and endoplasmic reticulum stress [7], defects in calcium homeostasis (one of the mechanisms responsible for the neuropathology seen in patients with acute neuronopathic GD) [8], increased sensitivity to oxidative stress [9], and changes in autophagy mechanisms [10]. It has also been speculated that changes in

macrophage function may contribute to some components of GD, particularly hepatosplenomegaly and bone involvement [11].

One of the most widespread hypotheses to explain phenotypic variation in GD is the presence of a chronic immune stimulus [12]. Patients with GD exhibit elevated levels of IgA, IgG, and IgM, autoantibodies [13, 14], and increased incidence of polyclonal gammopathy, monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), and multiple myeloma (MM) [15, 16]. This immune response might generate an inflammatory response, leading to cytokine-mediated cell damage. Some of the cytokines found at elevated levels in GD patients include IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α , and M-CSF [17, 18]. As cytokines play an important role in the regulation of immune system cells, some authors ascribe their imbalance to a pro-inflammatory state and to the onset of hematological malignancies [19-22]. Another evidence of a pro-inflammatory response in GD patients is the presence of elevated levels of antigen-presenting molecules, including MHC class II antigens (HLA-DR) [23, 24].

Natural killer (NK) cells are lymphocytes that can be distinguished from T and B cells by their larger size and granular cytoplasm. NK cells are a component of the innate immune system and play a role in the defense against infectious pathogens and malignancy, exhibiting inflammatory cytokine-mediated cytotoxic and cytolytic effects [25]. NK cells express at least one inhibitory receptor that interacts with HLA class I (HLA A, B, and C) to exert an important controlling effect and prevent immune response from targeting healthy cells [26].

Killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) are members of the immunoglobulin family found on the surface of NK cells [27] and some T lymphocytes (NKT) [28]. Thus far, 15 *KIR* genes (*KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*,

KIR2DL5A, *KIR2DL5B*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3* e *KIR3DS1*) and two pseudogenes (*KIR2DP1* and *KIR3DP1*) have been described [29], located on the 19q13.4 region [30]. KIR receptors are the result of a polymorphic system and are divided into activating and inhibitory isoforms. Receptors that mediate an inhibitory signal possess a long cytoplasmic tail (and are thus denoted by the letter “L”) and prevent target cell lysis, whereas activating KIRs possess a short tail (denoted by the letter “S”) and aid cell lysis [31, 32].

KIR genes have increasingly been associated with variability in response to viral diseases (HIV, CMV, viral hepatitis) [33-35] and autoimmune diseases such as scleroderma, rheumatoid arthritis, and psoriasis [36-38]. Due to the haplotype diversity of *KIR* genes, there is interest in analyzing their potential association with other disease states. For instance, an association between HLA ligands and KIR receptors has been implicated in the development of preeclampsia [39], hematologic neoplasms such as lymphomas and leukemias [40, 41], and solid tumors [42].

GD is associated with a reduction in NK cells [43]. However, a review of the literature did not locate any studies establishing a direct or indirect relationship between *HLA* and *KIR* genotyping and the development, phenotypic variability or prognosis of GD.

This is an exploratory study which aimed to ascertain whether correlations exist between *KIR* genes, their HLA ligands and clinical features in a cohort of GD patients from Southern Brazil.

Methods

Patients and controls

The study sample comprised 31 patients (from 28 unrelated families) with a biochemical and molecular diagnosis of GD followed at the State Reference Center for Gaucher disease of Rio Grande do Sul, Brazil, from 2003 to 2011. Of these 31 patients, 28 were receiving enzyme replacement therapy (ERT) with imiglucerase (n=23) or taliglucerase alfa (n=5) with a mean time of treatment of 97.21 months (range 4-215). During the shortage of imiglucerase in 2010, some patients stayed out of ERT and other migrated to taliglucerase alfa. All patients returned to imiglucerase in 2011 and nowadays some patients chose to stay on full dose of taliglucerase alfa rather than a minor dose of imiglucerase. All patients were European descendants, had been born in the South region of Brazil, and denied Ashkenazi Jewish ancestry. Patients (or the legal guardians of patients under the age of 18) provided written informed consent for participation in the study, and clinical, biochemical, and radiological data were collected by means of a chart review. The study was approved by the Hospital de Clínicas de Porto Alegre Research Ethics Committee.

The following clinical parameters were assessed: age at onset of symptoms (when available) or age at diagnosis; increased GD severity score index (SSI) [44] during follow-up (use of this score was implemented at our service in 2007; therefore, patients diagnosed in previous years have no record of pretreatment SSI scores); presence of osteopenia or osteoporosis (as assessed by bone density scanning) or osteonecrosis (as diagnosed on plain radiographs) on at least one occasion; hyperimmunoglobulinemia; and presence of polyclonal or monoclonal bands on serum protein electrophoresis.

The control sample was obtained from 250 healthy European descendants, bone marrow donors from Rio Grande do Sul, drawn from the National Bone Marrow Donors Registry (REDOME) [45].

KIR and HLA typing

Fifteen *KIR* genes (*2DS1*, *2DS2*, *2DS3*, *2DS4*, *2DS5*, *3DS1*, *2DL1*, *2DL2*, *2DL3*, *2DL4*, *2DL5*, *3DL1*, *3DL2*, *3DL3* e *2DPI*) were analyzed in patients and controls, using the PCR amplification with sequence-specific primers (SSP-PCR) technique [46]. HLA-C and HLA-Bw4 analysis were performed using SSP-PCR as previously described [47]. The results of HLA-C typing were separated into two groups: HLA-C group 1 (C1), consisting of HLA-C 01, 03, 07 (01–06), 08, 12 (02, 03, 06), 14, 16 (01, 03, 04), and HLA-C group 2 (C2), consisting of HLA-C 02, 04, 05, 06, 0707, 12 (04, 05), 15, 1602, 17, 18 [38]. HLA-C group 1 (C1) molecules bind to *KIR2DS2*, *KIR2DL2* and *KIR2DL3*, whereas group 2 (C2) molecules bind to *KIR2DS1* and *KIR2DL1*. Bw4 molecules bind to *KIR3DL1* and *KIR3DL1* [48].

Statistical analysis

Pearson's chi-square test with continuity correction was used to compare *KIR* gene and HLA-C frequencies between the GD and control groups. In a few cases where the expected difference between the two groups was small, Fisher's exact test was employed. Odds ratios (OR), confidence intervals (95%CI), and significance values ($p < 0.05$) were calculated using SPSS for Windows 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Bonferroni correction was performed to adjust for the number of genes used.

Results

The clinical and demographic profile of the study sample is shown in Table 1. There were no significant differences between the GD and control groups in frequency

of *KIR* gene, HLA-C, and HLA-Bw4 variants (Table 2). Frequencies were similar to those reported in previous studies of the Brazilian population [49, 50]. The frequency of *KIR* gene variants in combination with their respective ligands was also determined and compared between the GD and control groups; again, there were no significant differences (Table 2).

Comparison of the frequencies of specific *KIR* gene variants in the GD group and analysis of the potential association of these variants with age at diagnosis or symptom onset, presence of hyperimmunoglobulinemia, presence of mono- or polyclonal bands on protein electrophoresis, and osteoporosis or osteonecrosis revealed a significant association ($p=0.038$) between absence of the KIR2DS2 and KIR2DL2/HLA-C1 combination and symptom onset after childhood (16 out of 19 did not have this combination, whereas 7 of the 12 patients in whom symptom onset occurred at age >18 years did) (Table 3).

A significant association was also found between HLA-C typing and changes on serum protein electrophoresis. Patients who were homozygous for group HLA-C2 had an OR of 21.3 (95%CI 2.18–208.7, $p=0.007$) for the presence of monoclonal or polyclonal bands, whereas patients with one C1 allele had an OR of 0.016 (CI: 0.002–0.179, $p<0.001$) for abnormal protein electrophoresis findings (Table 4).

No significant associations were found between other clinical and demographic parameters and *KIR* gene frequencies.

Discussion

Gaucher disease is the most prevalent lysosomal storage disorder, and that in which immune system involvement plays the greatest role [51]. The main hypothesis is that a buildup of glucocerebroside within macrophage lysosomes leads to persistent

inflammatory stimulation, but the exact mechanism is still unclear. Some of the features of the characteristic immune involvement of GD include a blunted antigen response to bacterial pathogens, which can improve with ERT [52]; increased incidence of B cell-related malignancies, such as lymphomas, leukemias, monoclonal gammopathies, and multiple myeloma [21, 53-55]; and presence of autoantibodies [14]. As lysosomal accumulation of substrate occurs in immune system cells, antigen presentation by HLA class I and class II molecules is also compromised [23], and, as mentioned before, there is a decrease in the number of NK cells and impairment in their activity [43]. NK cells are important components of the innate immune system, as they are able to eliminate tumor cells and virus-infected cells [25]. The role of NK cells in the pathophysiology of and susceptibility to autoimmune disease has increasingly been the object of research [37, 38, 56], due to the high allelic variability of NK cell receptors.

We chose to analyze *KIR* gene variants in our patient cohort because of past descriptions of phenotypic variability in monozygotic twins with GD [57], which led us to believe that immune-related genes may be phenotype modifiers in GD. Comparison of the frequencies of the 15 known *KIR* genes between the GD and control groups revealed no significant differences. This was expected, in view of the ethnic homogeneity of both groups. However, analysis of the potential associations between *KIR* variants and clinical, demographic, and laboratory parameters revealed some interesting data.

The KIR2DS2 or KIR2DL2/HLA-C1 combination appears to be associated with delayed symptom onset, as it was present in only 15.8% of patients whose symptoms first arose before the age of 18, whereas 58.3% of patients with adult-onset symptoms have these combinations. It bears stressing that the KIR2DS2 and KIR2DL2/HLA-C1 combination has been described as a protective factor against development of chronic

myeloid leukemia (CML) [58]. Patients with GD are at increased odds of developing CML (OR 3.4) [59]. Furthermore, the KIR2DS2/DL2 genotype was recently associated with adult persistent immune thrombocytopenia [60]. Two of the three patients in our sample who exhibit persistent thrombocytopenia despite ERT have the KIR2DS2/DL2 genotype; therefore, this variant may mask therapeutic failure.

The main finding of this study was the association between HLA-C and the presence of serum protein electrophoresis changes. Patients with the C2/C2 genotype had an OR of 21.3 for development of monoclonal or polyclonal bands. Ninety-four percent of patients who did not develop gammopathy had at least one C1 allele, whereas eight out of nine patients with the C2/C2 genotype had abnormal protein electrophoresis findings. On the basis of these data, the presence of C1 is a protective factor against the development of gammopathies. There is substantial interest in explaining why GD patients have a greater frequency of MM. The hypothesis that mutations in the *GBA* gene may be a risk factor was not confirmed in a study of 95 patients with MM [55]. The only patient with suspected MM (male, 64 yo) presenting osteolytic lesion in his forearm (we couldn't confirm if it was a plasmacytoma) and renal function impairment we couldn't confirm if it was due to the diabetes) in our sample was homozygous for the C2 allele, which leads us to believe that the C2/C2 genotype may be considered a risk factor for development of this gammopathy.

This was the first study to analyze and demonstrate an association between KIR/HLA variants and GD. Although limited in size, our sample exhibited broad variability of this gene system, with a variety of genotype profiles, and our findings suggest a potential association between *KIR* and *HLA* genes and GD, thus corroborating the importance of immune system involvement in this disorder. Further study of

KIR/HLA variants in other patient cohorts is warranted, as they seem to be a phenotype-modifying factor in GD.

Acknowledgements:

The authors would like to thank all patients for their participation in the study.

Conflicts of interest:

The authors have no conflict of interest to declare.

Details of funding:

This study was supported by grants from FIPE-HCPA, the Brazilian Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX) of the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

References:

- [1] P.J. Meikle, J.J. Hopwood, Lysosomal storage disorders: emerging therapeutic options require early diagnosis *European journal of pediatrics* 162 Suppl 1 (2003) S34-37.

- [2] E. Sobreira, R.F. Pires, M. Cizmarik, G.A. Grabowski, Phenotypic and genotypic heterogeneity in Gaucher disease type 1: a comparison between Brazil and the rest of the world *Molecular genetics and metabolism* 90 (2007) 81-86.
- [3] E. Beutler, Gaucher disease: multiple lessons from a single gene disorder *Acta Paediatr Suppl* 95 (2006) 103-109.
- [4] M. Jmoudiak, A.H. Futerman, Gaucher disease: pathological mechanisms and modern management *British journal of haematology* 129 (2005) 178-188.
- [5] D.A. Hughes, G.M. Pastores, The pathophysiology of GD - current understanding and rationale for existing and emerging therapeutic approaches *Wiener medizinische Wochenschrift* 160 (2010) 594-599.
- [6] L.A. Boven, M. van Meurs, R.G. Boot, A. Mehta, L. Boon, J.M. Aerts, J.D. Laman, Gaucher cells demonstrate a distinct macrophage phenotype and resemble alternatively activated macrophages *Am J Clin Pathol* 122 (2004) 359-369.
- [7] I. Ron, M. Horowitz, ER retention and degradation as the molecular basis underlying Gaucher disease heterogeneity *Human molecular genetics* 14 (2005) 2387-2398.
- [8] D. Pelled, S. Trajkovic-Bodennec, E. Lloyd-Evans, E. Sidransky, R. Schiffmann, A.H. Futerman, Enhanced calcium release in the acute neuronopathic form of Gaucher disease *Neurobiology of disease* 18 (2005) 83-88.
- [9] M. Deganuto, M.G. Pittis, A. Pines, S. Dominissini, M.R. Kelley, R. Garcia, F. Quadrifoglio, B. Bembi, G. Tell, Altered intracellular redox status in Gaucher disease fibroblasts and impairment of adaptive response against oxidative stress *Journal of cellular physiology* 212 (2007) 223-235.
- [10] Y. Sun, G.A. Grabowski, Impaired autophagosomes and lysosomes in neuronopathic Gaucher disease *Autophagy* 6 (2010).

- [11] H. Mizukami, Y. Mi, R. Wada, M. Kono, T. Yamashita, Y. Liu, N. Werth, R. Sandhoff, K. Sandhoff, R.L. Proia, Systemic inflammation in glucocerebrosidase-deficient mice with minimal glucosylceramide storage *The Journal of clinical investigation* 109 (2002) 1215-1221.
- [12] Y. Shoenfeld, L.A. Gallant, M. Shaklai, E. Livni, M. Djaldetti, J. Pinkhas, Gaucher's disease: a disease with chronic stimulation of the immune system *Archives of pathology & laboratory medicine* 106 (1982) 388-391.
- [13] A. Jurecka, H. Gregorek, G. Kleinotiene, B. Czartoryska, A. Tylki-Szymanska, Gaucher disease and dysgammaglobulinemia: a report of 61 patients, including 18 with GD type III *Blood cells, molecules & diseases* 46 (2011) 85-87.
- [14] Y. Shoenfeld, A. Beresovski, D. Zharhary, Y. Tomer, M. Swissa, E. Sela, A. Zimran, S. Zevin, B. Gilburd, M. Blank, Natural autoantibodies in sera of patients with Gaucher's disease *Journal of clinical immunology* 15 (1995) 363-372.
- [15] M. de Fost, T.A. Out, F.A. de Wilde, E.P. Tjin, S.T. Pals, M.H. van Oers, R.G. Boot, J.F. Aerts, M. Maas, S. Vom Dahl, C.E. Hollak, Immunoglobulin and free light chain abnormalities in Gaucher disease type I: data from an adult cohort of 63 patients and review of the literature *Annals of hematology* 87 (2008) 439-449.
- [16] D.A. Hughes, Enzyme, substrate, and myeloma in Gaucher disease *American journal of hematology* 84 (2009) 199-201.
- [17] C.E. Hollak, L. Evers, J.M. Aerts, M.H. van Oers, Elevated levels of M-CSF, sCD14 and IL8 in type 1 Gaucher disease *Blood cells, molecules & diseases* 23 (1997) 201-212.
- [18] V. Barak, M. Acker, B. Nisman, I. Kalickman, A. Abrahamov, A. Zimran, S. Yatziv, Cytokines in Gaucher's disease *European cytokine network* 10 (1999) 205-210.

- [19] J.D. Brody, R. Advani, L.K. Shin, D.B. Bingham, S.A. Rosenberg, Splenic diffuse large B-cell lymphoma in a patient with type 1 Gaucher disease: Diagnostic and therapeutic challenges *Annals of hematology* 85 (2006) 817-820.
- [20] R. Costello, T. O'Callaghan, G. Sebahoun, Gaucher disease and multiple myeloma *Leukemia & lymphoma* 47 (2006) 1365-1368.
- [21] M.P. Hawkesford, A.J. Bowey, J. Rao, N.J. Meara, Synchronous presentation of Gaucher disease and solitary plasmacytoma with progression to multiple myeloma *Scottish medical journal* 56 (2011) 236.
- [22] B.E. Rosenbloom, N.J. Weinreb, A. Zimran, K.A. Kacena, J. Charrow, E. Ward, Gaucher disease and cancer incidence: a study from the Gaucher Registry *Blood* 105 (2005) 4569-4572.
- [23] A. Balreira, L. Lacerda, C.S. Miranda, F.A. Arosa, Evidence for a link between sphingolipid metabolism and expression of CD1d and MHC-class II: monocytes from Gaucher disease patients as a model *British journal of haematology* 129 (2005) 667-676.
- [24] A.M. Florena, V. Franco, G. Campesi, Immunophenotypical comparison of Gaucher's and pseudo-Gaucher cells *Pathology international* 46 (1996) 155-160.
- [25] O. Leavy, Natural killer cells: Maturation and function of NK cells *Nature reviews. Immunology* (2012).
- [26] L. Moretta, C. Bottino, D. Pende, M. Vitale, M.C. Mingari, A. Moretta, Different checkpoints in human NK-cell activation *Trends in immunology* 25 (2004) 670-676.
- [27] A. Moretta, G. Tambussi, C. Bottino, G. Tripodi, A. Merli, E. Ciccone, G. Pantaleo, L. Moretta, A novel surface antigen expressed by a subset of human CD3-

CD16+ natural killer cells. Role in cell activation and regulation of cytolytic function
The Journal of experimental medicine 171 (1990) 695-714.

[28] L. Van Kaer, NKT cells: T lymphocytes with innate effector functions Current
opinion in immunology 19 (2007) 354-364.

[29] S.G. Marsh, P. Parham, B. Dupont, D.E. Geraghty, J. Trowsdale, D. Middleton,
C. Vilches, M. Carrington, C. Witt, L.A. Guethlein, H. Shilling, C.A. Garcia, K.C. Hsu,
H. Wain, Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002
Tissue antigens 62 (2003) 79-86.

[30] Y. Suto, K. Maenaka, T. Yabe, M. Hirai, K. Tokunaga, K. Tadok, T. Juji,
Chromosomal localization of the human natural killer cell class I receptor family genes
to 19q13.4 by fluorescence in situ hybridization Genomics 35 (1996) 270-272.

[31] Q.R. Fan, L. Mosyak, C.C. Winter, N. Wagtmann, E.O. Long, D.C. Wiley,
Structure of the inhibitory receptor for human natural killer cells resembles
haematopoietic receptors Nature 389 (1997) 96-100.

[32] R. Biassoni, C. Cantoni, M. Falco, S. Verdiani, C. Bottino, M. Vitale, R. Conte,
A. Poggi, A. Moretta, L. Moretta, The human leukocyte antigen (HLA)-C-specific
"activatory" or "inhibitory" natural killer cell receptors display highly homologous
extracellular domains but differ in their transmembrane and intracytoplasmic portions
The Journal of experimental medicine 183 (1996) 645-650.

[33] C.T. Tiemessen, M. Paximadis, G. Minevich, R. Winchester, S. Shalekoff, G.E.
Gray, G.G. Sherman, A.H. Coovadia, L. Kuhn, Natural killer cell responses to HIV-1
peptides are associated with more activating KIR genes and HLA-C genes of the C1
allotype Journal of acquired immune deficiency syndromes 57 (2011) 181-189.

[34] M. Stern, H. Elsasser, G. Honger, J. Steiger, S. Schaub, C. Hess, The number of
activating KIR genes inversely correlates with the rate of CMV infection/reactivation in

kidney transplant recipients *American journal of transplantation* : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons 8 (2008) 1312-1317.

[35] A.V. Marangon, G.F. Silva, C.F. de Moraes, R.M. Grotto, M.I. Pardini, D.S. de Pauli, A.M. Sell, J.E. Visentainer, R.A. Moliterno, KIR genes and their human leukocyte antigen ligands in the progression to cirrhosis in patients with chronic hepatitis C *Human immunology* 72 (2011) 1074-1078.

[36] M.P. Martin, A. Bashirova, J. Traherne, J. Trowsdale, M. Carrington, Cutting edge: expansion of the KIR locus by unequal crossing over *Journal of immunology* 171 (2003) 2192-2195.

[37] P.H. Salim, M. Jobim, M. Bredemeier, J.A. Chies, J. Schlottfeldt, J.C. Brenol, L.F. Jobim, R.M. Xavier, Killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genes in systemic sclerosis *Clinical and experimental immunology* 160 (2010) 325-330.

[38] M. Jobim, L.F. Jobim, P.H. Salim, T.F. Cestari, R. Toresan, B.C. Gil, M.R. Jobim, T.J. Wilson, M. Kruger, J. Schlottfeldt, G. Schwartzmann, A study of the killer cell immunoglobulin-like receptor gene KIR2DS1 in a Caucasoid Brazilian population with psoriasis vulgaris *Tissue antigens* 72 (2008) 392-396.

[39] S.E. Hiby, J.J. Walker, M. O'Shaughnessy K, C.W. Redman, M. Carrington, J. Trowsdale, A. Moffett, Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success *The Journal of experimental medicine* 200 (2004) 957-965.

[40] W. Leung, R. Handgretinger, R. Iyengar, V. Turner, M.S. Holladay, G.A. Hale, Inhibitory KIR-HLA receptor-ligand mismatch in autologous haematopoietic stem cell transplantation for solid tumour and lymphoma *British journal of cancer* 97 (2007) 539-542.

- [41] L. Karabon, A. Jedynek, S. Giebel, D. Wolowiec, M. Kielbinski, D. Woszczyk, K. Kapelko-Slowik, K. Kuliczkowski, I. Frydecka, KIR/HLA gene combinations influence susceptibility to B-cell chronic lymphocytic leukemia and the clinical course of disease *Tissue antigens* 78 (2011) 129-138.
- [42] F. Romagne, P. Andre, P. Spee, S. Zahn, N. Anfossi, L. Gauthier, M. Capanni, L. Ruggeri, D.M. Benson, Jr., B.W. Blaser, M. Della Chiesa, A. Moretta, E. Vivier, M.A. Caligiuri, A. Velardi, N. Wagtmann, Preclinical characterization of 1-7F9, a novel human anti-KIR receptor therapeutic antibody that augments natural killer-mediated killing of tumor cells *Blood* 114 (2009) 2667-2677.
- [43] Y. Burstein, V. Zakuth, G. Rechavi, Z. Spierer, Abnormalities of cellular immunity and natural killer cells in Gaucher's disease *Journal of clinical & laboratory immunology* 23 (1987) 149-151.
- [44] A. Zimran, A. Kay, T. Gelbart, P. Garver, D. Thurston, A. Saven, E. Beutler, Gaucher disease. Clinical, laboratory, radiologic, and genetic features of 53 patients *Medicine (Baltimore)* 71 (1992) 337-353.
- [45] M. Jobim, P.H. Salim, P. Portela, T.J. Wilson, J. Fraportti, D. Baronio, B. Gil, L.S. Penna, R. Roesler, L.F. Jobim, G. Schwartzmann, Killer cell immunoglobulin-like receptor gene diversity in a Caucasian population of southern Brazil *International journal of immunogenetics* 37 (2010) 83-89.
- [46] N. Gomez-Lozano, C. Vilches, Genotyping of human killer-cell immunoglobulin-like receptor genes by polymerase chain reaction with sequence-specific primers: an update *Tissue antigens* 59 (2002) 184-193.
- [47] M. Bunce, C.M. O'Neill, M.C. Barnardo, P. Krausa, M.J. Browning, P.J. Morris, K.I. Welsh, Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3,

DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP) *Tissue antigens* 46 (1995) 355-367.

[48] R. Biassoni, M. Falco, A. Cambiaggi, P. Costa, S. Verdiani, D. Pende, R. Conte, C. Di Donato, P. Parham, L. Moretta, Amino acid substitutions can influence the natural killer (NK)-mediated recognition of HLA-C molecules. Role of serine-77 and lysine-80 in the target cell protection from lysis mediated by "group 2" or "group 1" NK clones *The Journal of experimental medicine* 182 (1995) 605-609.

[49] D. Middleton, A. Meenagh, J. Moscoso, A. Arnaiz-Villena, Killer immunoglobulin receptor gene and allele frequencies in Caucasoid, Oriental and Black populations from different continents *Tissue antigens* 71 (2008) 105-113.

[50] C.C. Rudnick, D.S. Franceschi, A.V. Marangon, G.A. Guelsin, A.M. Sell, J.E. Visentainer, Killer cell immunoglobulin-like receptor gene diversity in a Southern Brazilian population from the state of Parana *Human immunology* 69 (2008) 872-876.

[51] J.A. Castaneda, M.J. Lim, J.D. Cooper, D.A. Pearce, Immune system irregularities in lysosomal storage disorders *Acta neuropathologica* 115 (2008) 159-174.

[52] L. Marodi, R. Kaposzta, J. Toth, A. Laszlo, Impaired microbicidal capacity of mononuclear phagocytes from patients with type I Gaucher disease: partial correction by enzyme replacement therapy *Blood* 86 (1995) 4645-4649.

[53] F. Camou, J.F. Viallard, Extended remission of B-cell lymphoma with monoclonal gammopathy in a patient with type 1 Gaucher disease treated with enzyme replacement therapy *Blood cells, molecules & diseases* 48 (2012) 51-52.

[54] A. Ranade, S. Selegan, G. Sandhu, V. Ghali, V.P. Shah, Acute lymphoblastic leukemia in a patient with type 1 Gaucher disease developing 1 year after discontinuation of enzyme replacement therapy *American journal of hematology* 85 (2010) 908-909.

- [55] B.E. Rosenbloom, P. Becker, N. Weinreb, Multiple myeloma and Gaucher genes *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 11 (2009) 134.
- [56] H. Qin, Z. Wang, W. Du, W.H. Lee, X. Wu, A.D. Riggs, C.P. Liu, Killer cell Ig-like receptor (KIR) 3DL1 down-regulation enhances inhibition of type 1 diabetes by autoantigen-specific regulatory T cells *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (2011) 2016-2021.
- [57] M. Biegstraaten, I.N. van Schaik, J.M. Aerts, M. Langeveld, M.M. Mannens, L.J. Bour, E. Sidransky, N. Tayebi, E. Fitzgibbon, C.E. Hollak, A monozygotic twin pair with highly discordant Gaucher phenotypes *Blood cells, molecules & diseases* 46 (2011) 39-41.
- [58] D. Middleton, A.S. Diler, A. Meenagh, C. Sleator, P.A. Gourraud, Killer immunoglobulin-like receptors (KIR2DL2 and/or KIR2DS2) in presence of their ligand (HLA-C1 group) protect against chronic myeloid leukaemia *Tissue antigens* 73 (2009) 553-560.
- [59] O. Landgren, I. Turesson, G. Gridley, N.E. Caporaso, Risk of malignant disease among 1525 adult male US Veterans with Gaucher disease *Archives of internal medicine* 167 (2007) 1189-1194.
- [60] J.P. Nourse, R. Lea, P. Crooks, G. Wright, H. Tran, J. Catalano, T. Brighton, A. Grigg, P. Marlton, M.K. Gandhi, The KIR2DS2/DL2 genotype is associated with adult persistent/chronic and relapsed immune thrombocytopenia independently of FCGR3a-158 polymorphisms *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis* 23 (2012) 45-50.

Tables:

Table 1. Clinical and demographic features of the study sample

	Patients (n=31)
Gender (female:male ratio)	13:18
Mean age \pm SD (years)	29.48 \pm 15.19
Mean time of treatment \pm SD (years)	9.0 \pm 6.4
Mean age at onset of symptoms \pm SD (years) [#]	37.5 \pm 16.7
Disease severity (SSI) [¥]	Mild (0-10) ¹ 24
	Moderate (11-25) ² 4
	Severe (>25) ³ 3
Hyperimmunoglobulinemia	24
Monoclonal / Polyclonal bands on protein electrophoresis	14
Osteopenia / Osteoporosis	18
Osteonecrosis	9

[¥] According to Zimran et al 1992. SD: standard deviation

[#] When unavailable, age at diagnosis was used instead.

¹ Mean age \pm SD (years): 31 \pm 16.31

² Mean age \pm SD (years): 30.25 \pm 8.01

³ Mean age \pm SD (years): 16.33 \pm 4.04

Table 2. *KIR* gene, ligand frequencies (%) and their association in controls (n=250) and Gaucher disease (GD) patients (n=31)

<i>KIR</i> gene, ligands and association	Controls		GD	
	N	%	N	%
2DL1	244	97.6	31	100.0
2DL2	136	54.4	15	48.4
2DL3	216	86.4	28	90.3
2DL4	250	100.0	31	100.0
2DL5	124	49.6	18	58.1
3DL1	244	97.6	31	100.0
3DL2	200	100.0	31	100.0
3DL3	200	100.0	31	100.0
2DS1	91	36.4	13	41.9
2DS2	134	53.6	14	45.2
2DS3	83	33.2	9	29.0
2DS4	238	95.2	31	100.0
2DP1	200	100.0	31	100.0
2DS5	85	34.0	16	51.6
3DS1	106	42.4	9	29.0
Bw4	179	71.6	22	71.0
C1	180	72.0	22	71.0
C2	179	71.6	24	77.4
2DL2/ C1	102	40.8	10	32.3
2DS2/ C1	100	40.0	10	32.3
2DL3/ C1	153	61.2	20	64.5
2DL1/ C2	176	70.4	24	77.4
2DS1/ C2	63	25.2	10	32.3
3DL1/Bw4	174	69.6	22	71.0
3DS1/Bw4	77	30.8	4	12.9

p values were not significant for any of the analyses.

C1 group: HLA-Cw 01, 03, 07 (01-06), 08, 12 (02, 03, 06), 14, 16 (01, 03, 04)

C2 group: HLA-Cw 02, 04, 05, 06, 0707, 12 (04, 05), 15, 1602, 17, 18

Table 3. *Frequency of KIR2DL2 and KIR2DS2 in the presence of its ligand HLA C1 and onset of symptoms / age at diagnosis*

	Onset of symptoms / Age at diagnosis		p-value*	OR	95%CI
	< 18 years (n=19)	≥18 years (n=12)			
HLA Group C1					
KIR 2DL2	3	7	0.038	7.46	1.38-40.2
KIR 2DS2	3	7	0.038	7.46	1.38-40.2

Table 4. Frequencies (%) of C1 and C2 group in Gaucher disease relative to absence (17) and presence (14) of polyclonal/monoclonal bands.

Ligands groups	<i>Polyclonal/Monoclonal bands</i>				P-value	OR	95% CI
	Absent		Present				
	N	%	N	%			
C1C1	2	11.8	5	35.7	NS	-	-
C2C2	1	5.9	8	57.1	0.007	21.3	2.18 - 208.7
C1C2	14	82.4	1	7.1	<0.001	0.016	0.002 - 0.179

NS: not significant; C1C2: C1 and C2 group heterozygous;

C1 group: HLA-Cw 01, 03, 07 (01-06), 08, 12 (02, 03, 06), 14, 16 (01, 03, 04); C1C1: homozygous for C1 group;

C2 group: HLA-Cw 02, 04, 05, 06, 0707, 12 (04, 05), 15, 1602, 17, 18; C2C2: homozygous for C2 group.

ARTIGO ORIGINAL 2

Manuscrito submetido à revista *Blood Cells, Molecules and Diseases*

Human Leukocyte Antigens and Gaucher Disease: Is There An Association?

Filippo Vairo^{1,2,3}, Pâmela Portela⁴, Patrícia H. Salim⁴, Mariana Jobim⁴, Cristina Netto¹,
Alicia Dorneles¹, Suzana Mittlestadt¹, Luiz Fernando Jobim⁴, Ida Schwartz^{1,2,3,5}

¹Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

²Post Graduation Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

³Genetics Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

⁴Immunology Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

⁵BRAIN Experimental Research Group Laboratory, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

Abstract:

Background: Gaucher disease (GD) is caused by the reduced activity of lysosomal enzyme glucocerebrosidase, which leads to the accumulation of glucocerebroside in cells and a chronic stimulation of the immune system. GD is divided into 3 main types according to the presence or absence of neurological involvement and to its presentation (acute or chronic). Gaucher cells show an increase in their expression of HLA-DR antigens on their surface, and there is an increase in levels of antigen-presenting molecules. Over 100 diseases have already been associated to HLA antigens; however, this association has never been studied in GD. **Objectives:** To analyze the variability of HLA genes in a Southern Brazilian sample of GD patients, to compare it with controls, and to look for associations with clinical manifestations. **Methodology:** Thirty-one GD patients (24 mild, 4 moderate, and 3 severe) were included in the study. They were typed for HLA A, B, and DR and compared to 250 healthy controls. The clinical data were obtained from the review of medical records. **Results/Discussion:** There was a significant difference in the frequency of B37 allele among patients when compared to controls ($p=0.011$, OR 13.28). An association was found between DR11 ($p=0.008$) and DR13 ($p=0.011$) alleles and the severity of the disease. DR11 allele seems to be associated to neurologic compromise, while DR13 seems to be associated to osteonecrosis. **Conclusion:** Our data suggest a possible association of HLA variants and GD. The HLA variants must be further studied, for they seem to be a phenotype-modifier factor for GD.

Keywords: Gaucher disease; immune system; HLA genes.

Introduction:

Gaucher disease (GD) is the most frequent of the lysosomal disorders with an estimated incidence of 1 in 57,000 live births worldwide (1); however, in Ashkenazi Jews, its incidence reaches 1 in 400 live births (2).

GD is caused by mutations in both alleles of the *GBA* gene, which codifies the lysosomal enzyme glucocerebrosidase (EC 3.2.1.45); this enzyme is responsible for the hydrolysis of glucocerebroside into glucose and ceramide (3). Consequently, there is an accumulation of glucocerebroside in macrophages, mainly in the spleen, liver, bone marrow, and lungs, thus characterizing GD as a multisystemic disorder with phenotypic heterogeneity.

GD type I (MIM #230800) is the most prevalent form and is more frequent in the Ashkenazi Jewish population, although most patients with GD type I are not Jewish. GD affects children and adults of any age, and its typical clinical manifestations include hepatosplenomegaly, anemia, thrombocytopenia, and bone disease. GD type II and III are less frequent and occur in all ethnic groups. Type I differs from type II (MIM #230900) and type III (MIM #231000) for its lack of involvement of the central nervous system, although some studies report neurological characteristics in type I patients that are different from those seen in type II or type III patients (4). Patients with GD who present neurological involvement (neuronopathic GD) are classified as being type II or type III, according, respectively, to the acute or chronic nature of their disease. According to the Brazilian Association of Patients with Gaucher Disease, there are over 600 patients diagnosed with GD in Brazil.

Despite the already well-characterized genetic alteration and biochemical pathways, the mechanisms by which the accumulation of substrate causes the clinical manifestations of GD have not yet been completely determined (5, 6). Several modifying genes, adjacent genes, transporting proteins, and environmental factors may influence the phenotype of patients with GD (7-9), and since different phenotypes have been described for monozygotic twins (10, 11), the search for modifying factors is necessary.

Gaucher cells (cells that derivate from macrophages with lipid accumulation) are 20-100µm in diameter, present an eccentric nucleus, and a cytoplasm with striations. The detection of macrophage surface markers and an intense phagocytic activity confirm the ontogeny of mononuclear phagocytes. The accumulation of glucocerebroside in macrophages leads to a change in cellular phenotype (12); macrophages show an increase in the expression of HLA-DR antigens on their surface (13). It is speculated that alterations in the function of macrophages (due to the accumulation of glucocerebroside) in GD patients contribute to the disorder, especially to hepatosplenomegaly and bone compromise (14).

GD is the lysosomal disease that has the greatest involvement of the immune system, so much so that one of the existing hypothesis to explain the phenotypic expression of this disorder is the existence of a chronic stimulus of the immune system (15). A piece of evidence is the presence of elevated levels of antigen-presenting molecules, including class II MHC molecules (16), which comprises the HLA class II.

The HLA (Human Leukocyte Antigen) system is divided in class I, II, and III, located in region 6p21.3, comprising more than 200 genes (17). Class I antigens

(HLA A, B, and C) are expressed in almost all cells except erythrocytes and trophoblasts. Class II antigens (HLA DR, DQ, DP) are expressed in antigen-presenting cells, such as monocytes and dendritic cells. The region of class III does not contain *HLA* genes, but several genes of immunological importance are located in this region as components of the complement system and cytokines (18, 19).

The first associations of the HLA system with autoimmune diseases, such as HLA-B27 with ankylosing spondylitis (20) and HLA-DR4 with rheumatoid arthritis (21), date from over 30 years ago. Since then, more than 100 diseases have already been associated to *HLA* genes. Their polymorphisms are relevant to the auto and hetero recognition by T cells, besides the processing and presentation of infectious agents, infected cells, or cells with somatic mutations (22).

Methodology:

The study sample comprised 31 patients (from 28 unrelated families) with a biochemical and molecular diagnosis of GD followed at the State Reference Center for Gaucher disease of Rio Grande do Sul, Brazil, since 2003. Of these 31 patients, 28 were receiving enzyme replacement therapy (ERT) with imiglucerase (n=23) or taliglucerase alfa (n=5). All patients were European descendants, had been born in the South region of Brazil, and denied Ashkenazi Jewish descent. Patients (or the legal guardians of patients under the age of 18) provided written informed consent for participation in the study, and clinical, biochemical, and radiological data were collected by means of a chart review. The study was approved by the Hospital de Clínicas de Porto Alegre Research Ethics Committee.

The following clinical parameters were assessed: age at onset of symptoms (when available) or age at diagnosis; increased GD severity score index (SSI) (23) during follow-up (use of this score was implemented at our service in 2007; therefore, patients diagnosed in previous years have no record of pretreatment SSI scores); presence of osteopenia or osteoporosis (as assessed by bone density scanning) or osteonecrosis (as diagnosed on plain radiographs) on at least one occasion; hyperimmunoglobulinemia; and presence of polyclonal or monoclonal bands on serum protein electrophoresis.

The control sample was obtained from 250 healthy bone marrow donors registered in the National Registry of Bone Marrow Donors (REDOME in the Portuguese abbreviation); controls were European descendants and from the state of Rio Grande do Sul, Brazil.

HLA Typing

Leukocytes were isolated by centrifuging from the peripheral blood collected in a tube with EDTA. The DNA of the sample was extracted using the salting-out method (23). DNA amplification was done using the polymerase chain reaction technique (PCR). For the HLA A, B, and DR typing, the PCR-SSO technique (Sequence Specific Oligonucleotides, *One Lambda Inc.*) and the automatized system with Luminex[®] technology (24) were used. Ambiguities were solved using the PCR-SSP technique (Sequence Specific Primers) (25).

Statistical Analysis

Comparison of the *HLA A*, *B* and *DR* genes frequencies between the patient group and the control group was done by Pearson χ^2 with continuity correction, and Fisher's exact test was employed in a few where the expected difference between the two groups was small. Odds ratios (OR), confidence intervals (95% CI), and significance values ($p < 0.05$) were calculated using SPSS for Windows version 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). The number of genes used was adjusted with the Bonferroni correction.

Results:

The clinical and demographic characteristics of patients are presented in Table 1. The comparison of frequencies of the *HLA A* (Table 2), *HLA B* (Table 3), and *HLA DR* (Table 4) genes between patients and controls showed a single significant difference in the frequency of allele HLA B37.

An association between HLA DR11 and HLA DR13 alleles and disease severity (Table 5) was found when the frequency of specific alleles of *HLA* genes in the group of patients with GD was compared with the clinical and demographic data.

The comparison of the remaining clinical and demographic variables with the frequencies of the *HLA* genes did not show any statistical significance.

Discussion:

Gaucher disease is the most prevalent of the lysosomal disorders and the one that presents the greatest involvement of the immune system (26). The main hypothesis is that the accumulation of glucocerebroside in the lysosomes of macrophages leads to a

persistent inflammatory stimulation; however, the exact mechanism through which this happens remains unclear. One of the factors possibly related to this is the compromise of the antigenic presentation of class I and class II HLA molecules that happens due to this accumulation (16).

We decided to analyze variants of *HLA* genes in our cohort of patients, given that there are descriptions of phenotypic variability in monozygotic twins with GD (10). This led us to believe that genes related to the immune system may be phenotype modifiers in GD.

The frequency of allele HLA B37 found in our patients was 12 times higher when compared to controls. It should be pointed out that the HLA system is highly polymorphic and that many alleles present linkage disequilibrium; therefore, it cannot be inferred that this allele alone is associated to GD. This allele has already been associated to the development of psoriasis in young age patients in other populations (27). So far, none of our patients have presented this disease.

One of our patients presented allele HLA B27, which is known to be related to ankylosing spondylitis. Studies show that up to 95% of the patients with this disorder carry this allele and they are diagnosed earlier (28). Consequently, this patient will be regularly evaluated due to the possible ocular and vertebral complications caused by ankylosing spondylitis. So far, this patient has not presented any related symptoms.

An interesting finding of our study was the association of alleles DR11 and DR13 with the severity of GD. All our patients with GD type III (from 2 unrelated families – DR11 was the only allele shared by them), 1 patient with mild GD type I and possible cognitive delay, as well as 1 patient with moderate GD type I who presented cerebellar symptoms and tremors as a side effect in an attempt to use substrate reduction therapy (an effect that has already been described in other patients) presented allele

DR11. Therefore, one hypothesis is that this allele is associated to neurological compromise in patients with GD or to a predisposition to the development of neurological side effects with the use of substrate reduction therapy. This allele has already been related to a predisposition for the development of thyroid neoplasia (29), systemic sclerosis (30), and low production of antibodies against the hepatitis C virus (31), which none of these characteristics were found in our patients.

Three of 4 patients with moderate GD type I presented allele DR13. All patients presented osteonecrosis; 2 of them had already undergone arthroplasty, and one other presented significant functional limitations; therefore, this allele may be associated to the bone compromise seen in these patients. The other 3 patients who presented this allele had mild disease, presented symptoms before the age of 10 years, and started treatment early; as a result, this may have prevented the evolution of bone disease in these patients. DR13 allele has already been associated both to a better viral clearance for hepatitis B and C (32) and to the susceptibility to the development of uveitis in patients with juvenile rheumatoid arthritis (34). This was important because one of the patients that had this allele did not serum convert for hepatitis B, even after 6 vaccination doses; this patient may be somehow protected against the virus.

This is the first study relating variants of *HLA* genes to GD. Despite the present limited patient sample and considering the great variability, with several genotypic profiles of this genic system, our data suggest the existence of a possible association between the *HLA* genes and the phenotypic variability of GD, thus corroborating to the significant immune involvement seen in this disorder. Therefore, they should be further studied in other patient cohorts, since they can be considered modifying factors of GD.

Acknowledgements:

The authors thank all patients for their participation in the study.

Conflicts of Interest:

The authors state no conflicts of interest.

Details of Funding:

This study was supported by grants from FINE-HCPA, the Brazilian Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX) of the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

References:

1. Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 1999;**281**:249-54.
2. Sobreira E, Pires RF, Cizmarik M, Grabowski GA. Phenotypic and genotypic heterogeneity in Gaucher disease type 1: a comparison between Brazil and the rest of the world. *Molecular genetics and metabolism*. 2007;**90**:81-6.
3. Beutler E. Gaucher disease: multiple lessons from a single gene disorder. *Acta Paediatr Suppl*. 2006;**95**:103-9.
4. Biegstraaten M, van Schaik IN, Aerts JM, Hollak CE. 'Non-neuronopathic' Gaucher disease reconsidered. Prevalence of neurological manifestations in a Dutch cohort of type I Gaucher disease patients and a systematic review of the literature. *Journal of inherited metabolic disease*. 2008;**31**:337-49.

5. Jmoudiak M, Futerman AH. Gaucher disease: pathological mechanisms and modern management. *British journal of haematology*. 2005;**129**:178-88.
6. Hughes DA, Pastores GM. The pathophysiology of GD - current understanding and rationale for existing and emerging therapeutic approaches. *Wiener medizinische Wochenschrift*. 2010;**160**:594-9.
7. Pampols T, Pineda M, Giros ML, et al. Neuronopathic juvenile glucosylceramidosis due to sap-C deficiency: clinical course, neuropathology and brain lipid composition in this Gaucher disease variant. *Acta neuropathologica*. 1999;**97**:91-7.
8. Whitfield PD, Nelson P, Sharp PC, et al. Correlation among genotype, phenotype, and biochemical markers in Gaucher disease: implications for the prediction of disease severity. *Molecular genetics and metabolism*. 2002;**75**:46-55.
9. Altarescu G. The interleukin-6 promoter polymorphism in Gaucher disease: a new modifier gene? *Qjm*. 2003;**96**:575-8.
10. Biegstraaten M, van Schaik IN, Aerts JM, et al. A monozygotic twin pair with highly discordant Gaucher phenotypes. *Blood cells, molecules & diseases*. 2011;**46**:39-41.
11. Lachmann RH, Grant IR, Halsall D, Cox TM. Twin pairs showing discordance of phenotype in adult Gaucher's disease. *Qjm*. 2004;**97**:199-204.
12. Boven LA, van Meurs M, Boot RG, et al. Gaucher cells demonstrate a distinct macrophage phenotype and resemble alternatively activated macrophages. *Am J Clin Pathol*. 2004;**122**:359-69.
13. Florena AM, Franco V, Campesi G. Immunophenotypical comparison of Gaucher's and pseudo-Gaucher cells. *Pathology international*. 1996;**46**:155-60.
14. Mizukami H, Mi Y, Wada R, et al. Systemic inflammation in glucocerebrosidase-deficient mice with minimal glucosylceramide storage. *The Journal of clinical investigation*. 2002;**109**:1215-21.
15. Shoenfeld Y, Gallant LA, Shaklai M, Livni E, Djaldetti M, Pinkhas J. Gaucher's disease: a disease with chronic stimulation of the immune system. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 1982;**106**:388-91.
16. Balreira A, Lacerda L, Miranda CS, Arosa FA. Evidence for a link between sphingolipid metabolism and expression of CD1d and MHC-class II: monocytes from Gaucher disease patients as a model. *British journal of haematology*. 2005;**129**:667-76.

17. Horton R, Wilming L, Rand V, et al. Gene map of the extended human MHC. *Nature reviews Genetics*. 2004;**5**:889-99.
18. Klein J, Sato A. The HLA system. First of two parts. *The New England journal of medicine*. 2000;**343**:702-9.
19. Klein J, Sato A. The HLA system. Second of two parts. *The New England journal of medicine*. 2000;**343**:782-6.
20. Good AE, Kawanishi H, Schultz JS. Letter: HLA B27 in blacks with ankylosing spondylitis or Reiter's disease. *The New England journal of medicine*. 1976;**294**:166-7.
21. Maeda H, Juji T, Mitsui H, Sonozaki H, Okitsu K. HLA DR4 and rheumatoid arthritis in Japanese people. *Annals of the rheumatic diseases*. 1981;**40**:299-302.
22. Shiina T, Inoko H, Kulski JK. An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004. *Tissue antigens*. 2004;**64**:631-49.
23. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research*. 1988;**16**:1215.
24. Cesbron-Gautier A, Simon P, Achard L, Cury S, Follea G, Bignon JD. [Luminex technology for HLA typing by PCR-SSO and identification of HLA antibody specificities]. *Annales de biologie clinique*. 2004;**62**:93-8.
25. Bunce M, O'Neill CM, Barnardo MC, et al. Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP). *Tissue antigens*. 1995;**46**:355-67.
26. Castaneda JA, Lim MJ, Cooper JD, Pearce DA. Immune system irregularities in lysosomal storage disorders. *Acta neuropathologica*. 2008;**115**:159-74.
27. Kim TG, Lee HJ, Youn JI, Kim TY, Han H. The association of psoriasis with human leukocyte antigens in Korean population and the influence of age of onset and sex. *The Journal of investigative dermatology*. 2000;**114**:309-13.
28. Chung HY, Machado P, van der Heijde D, D'Agostino MA, Dougados M. HLA-B27 positive patients differ from HLA-B27 negative patients in clinical presentation and imaging: results from the DESIR cohort of patients with recent onset axial spondyloarthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2011;**70**:1930-6.
29. Juhasz F, Kozma L, Stenszky V, Gyory F, Luckas G, Farid NR. Well differentiated thyroid carcinoma is associated with human lymphocyte antigen D-related 11 in Eastern Hungarians: a case of changing circumstances. *Cancer*. 2005;**104**:1603-8.

30. Loubiere LS, Lambert NC, Madeleine MM, et al. HLA allelic variants encoding DR11 in diffuse and limited systemic sclerosis in Caucasian women. *Rheumatology*. 2005;**44**:318-22.
31. Hu CY, Wu CS, Lee CS, et al. HLA-DR11 and HLA-DR2 are negatively associated with autoantibody production in chronic hepatitis C. *Annals of the rheumatic diseases*. 2006;**65**:138-9.
32. Singh R, Kaul R, Kaul A, Khan K. A comparative review of HLA associations with hepatitis B and C viral infections across global populations. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2007;**13**:1770-87.

Tables:

Table 1. Clinical and demographic features of Gaucher disease patients included in the present study

	Patients (n=31)	
Gender (female:male)	13:18	
Mean age \pm SD (years)	30.87 \pm 15.3	
Mean time of treatment \pm SD (years)	9.0 \pm 6.4	
Mean age of onset of symptoms \pm SD (years) [#]	37.5 \pm 16.7	
Disease severity (SSI) [‡]	Mild (0-10)	24
	Moderate (11-25)	4
	Severe (>25)	3
Hyperimmunoglobulinemia	24	
Monoclonal / Policlonal bands on protein electrophoresis	14	
Osteopenia / Osteoporosis	18	
Osteonecrosis	9	

[‡] According to Zimran et al 1992; SD: standard deviation

[#] When not available, age at diagnosis was considered.

Table 2. Comparison of HLA-A allele frequencies in patients and controls

	Controls (n=250)		Gaucher Disease (n=31)	
	n	%	N	%
A*01	49	19.6	6	19.4
A*02	120	48.0	19	61.3
A*03	55	22.0	9	29.0
A*11	32	12.8	6	19.4
A*23	12	4.8	1	3.2
A*24	44	17.6	4	12.9
A*25	12	4.8	3	9.7
A*26	16	6.4	2	6.5
A*30	16	6.4	1	3.2
A*31	23	9.2	2	6.5
A*32	16	6.4	1	3.2
A*33	10	4.0	1	3.2

*p values were not significant.

Table 3. Comparison of HLA-B allele frequencies in patients and controls

	Controls (n=250)		Gaucher Disease (n=31)	
	n	%	N	%
B*07	21	8.4	5	16.1
B*08	44	17.6	2	6.5
B*13	14	5.6	2	6.5
B*15	32	12.8	5	16.1
B*18	26	10.4	4	12.9
B*27	16	6.4	1	3.2
B*35	55	22.0	10	32.3
B*37 [#]	2	0.8	3	9.7
B*38	17	6.8	1	3.2
B*39	8	3.2	3	9.7
B*40	17	6.8	1	3.2
B*44	47	18.8	7	22.6
B*45	14	5.6	1	3.2
B*48	2	0.8	1	3.2
B*49	21	8.4	1	3.2
B*50	9	3.6	2	6.5
B*51	55	22.0	4	12.9
B*52	2	0.8	1	3.2
B*55	10	4.0	1	3.2
B*57	20	8.0	1	3.2
B*58	7	2.8	2	6.5

[#]**p=0.011; OR=13,28; 95%CI 2,12-82,9**

*the other p values were not significant.

Table 4. Comparison of HLA-DR allele frequencies in patients and controls

	Controls (n=250)		Gaucher Disease (n=31)	
	n	%	N	%
DRB1*01	35	14.0	5	16.1
DRB1*03	74	29.6	6	19.4
DRB1*04	77	30.8	6	19.4
DRB1*07	73	29.2	4	12.9
DRB1*08	22	8.8	3	9.7
DRB1*10	12	4.8	1	3.2
DRB1*11	52	20.8	8	25.8
DRB1*12	6	2.4	3	9.7
DRB1*13	66	26.4	6	20.0
DRB1*14	13	5.2	5	16.1
DRB1*15	27	10.8	7	22.6

*p values were not significant.

Table 5. Relation of disease severity, HLA DR11 and HLA DR13

	Disease severity			P-value*
	Mild (n=24)	Moderate (n=4)	Severe (n=3)	
HLA DR*11	16.7%	25.0%	100%	0.008
HLA DR*13	12.5%	75.0%	0%	0.011

CONCLUSÕES

Objetivos primários

1 - Verificar a existência de variantes de genes KIR e de combinações de variantes KIR-HLA associadas à gravidade do fenótipo clínico dos pacientes com doença de Gaucher do Centro de Referência Estadual do Rio Grande do Sul.

Quanto à caracterização do envolvimento imune a partir da análise de variantes dos genes *KIR* e *HLA*, foi possível determinar que há variantes dos genes *KIR* relacionadas ao desenvolvimento tardio da doença (*KIR2DS2* e *KIR2DL2* associadas ao seu ligante *HLA-C1*).

2- Avaliar a relação da tipagem do MHC de classe I (HLA-A, HLA-B e HLA-C) e de classe II (HLA-DR) com características clínicas apresentadas pelos pacientes com Doença de Gaucher do Centro de Referência Estadual do Rio Grande do Sul.

Foi possível determinar que há variantes dos genes *HLA* relacionadas ao desenvolvimento de alteração em eletroforese de proteínas (*HLA-C2*), o que pode ser fator de risco para o desenvolvimento de mieloma múltiplo, uma doença com frequência elevada em pacientes com DG.

A variante *HLA DR11* foi associada ao comprometimento neurológico tanto em pacientes com DG tipo III, quanto em pacientes com DG tipo I leve com déficit

cognitivo e paciente que apresentou efeitos colaterais neurológicos na tentativa de utilização de terapia de redução de substrato.

Pacientes com DG tipo I moderado e que apresentaram osteonecrose, com início tardio de terapia de reposição enzimática, apresentaram a variante HLA DR13, enquanto pacientes com DG tipo I leve, com início precoce de tratamento, não desenvolveram osteonecrose.

***Objetivo secundário:** Avaliar a frequência das variantes dos genes HLA e KIR de pacientes com Doença de Gaucher acompanhados no Centro de Referência Estadual do Rio Grande do Sul e compará-los com controles.*

Não encontramos diferenças entre as frequências de variantes dos genes *KIR* entre pacientes com DG e controles, porém a variante HLA B37 é mais frequente em nossa amostra de pacientes do que em controles saudáveis.

CONSIDERAÇÕES FINAIS / PERSPECTIVAS

A DG é a mais frequente das doenças lisossômicas, com aproximadamente 600 pacientes diagnosticados em nosso país. Apesar do número limitado, há um grande interesse na avaliação e otimização do tratamento desses pacientes devido às comorbidades associadas à doença e ao alto custo para o SUS da medicação específica.

Encontramos associação de variantes dos genes *KIR* e seus ligantes com idade de aparecimento dos sintomas em pacientes com DG, além de associação com comorbidades como alteração na eletroforese de proteínas o que pode ser fator de risco para desenvolvimento de mieloma múltiplo. Além disso, alguns genótipos *KIR* já foram associados a doenças frequentes em pacientes com DG e outras que podem mascarar insucessos terapêuticos, como a trombocitopenia auto imune.

Com a publicação de casos de gêmeos monozigóticos com fenótipo variável, cada vez mais há interesse no estudo dos mecanismos imunogenéticos das doenças lisossômicas, em especial a DG. Cabe ressaltar que o estudo da associação entre variantes dos genes *KIR* e *HLA* e Doença de Gaucher é inovador e pode estimular a busca de novos genes modificadores de fenótipo relacionados ao sistema imune.

Nosso grupo espera ampliar a amostra de pacientes com DG, possivelmente com pacientes de outros centros no país e/ou exterior para corroborar nossos achados. O grupo liderado pelas Profa. Maria Clara Sá Miranda e Profa. Fátima Macedo do Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC) no Porto, Portugal, já demonstram interesse na análise de seus pacientes.

Em virtude da hipótese de que variantes dos genes *HLA* possam estar envolvidas na patogênese do mieloma múltiplo, esperamos estudar pacientes com essa doença em busca de sua associação com o grupo C2 do complexo HLA-C. Além disso, esperamos

estimular outros grupos a estudar tais genes em suas coortes de pacientes de pacientes com DG ou outras doenças lisossômicas e colaborar para a elucidação dos mecanismos imunes e genéticos envolvidos na DG contribuindo para o delineamento de estratégias baseadas em evidência para monitorização, acompanhamento e tratamento das alterações apresentadas pelos pacientes.

APÊNDICES

Apêndice I - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

- Projeto: **Estudo abrangente sobre o envolvimento do sistema imune na doença de Gaucher: análise de citocinas, de variantes dos genes *HLA* e *KIR* e de sua associação com o Mieloma Múltiplo**
- Pesquisador Responsável: Ida Vanessa D. Schwartz, Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre-RS. Tel: 51-33598011.

Paciente: _____

Prezado paciente ou responsável,

Esta pesquisa tem por objetivo a obtenção de informações relativas ao sistema imunológico de pessoas com Doença de Gaucher e às alterações presentes nesse sistema. Nossa intenção é ajudar a entender porque acontecem certas complicações nessa doença.

Para que estas informações sejam obtidas será necessário que você (paciente) seja submetido à coleta de:

- 5 mL de sangue para a análise de dosagem de citocinas
- 5 mL de sangue para a análise de genes envolvidos na regulação do sistema imunológico;

Os riscos e desconfortos causados pela coleta de sangue são semelhantes aos riscos envolvidos na coleta de sangue para exames laboratoriais de rotina (manchas roxas e dor no local da coleta). O desconforto e os riscos associados a estas avaliações serão minimizados pela realização da coleta por profissional treinado.

Em relação ao armazenamento e utilização de algum material que tenha restado após a realização dos exames previstos neste estudo, você declara que autorizou (marcar com X):

() que este material poderá ser armazenado e poderá vir a ser utilizado em estudos futuros (desde que você revise e assine o termo de consentimento de tais estudos futuros).

() que este material não poderá ser armazenado e não poderá vir a ser utilizado em estudos futuros. O material coletado deverá ser utilizado somente neste estudo, e o material que sobrar não deverá ser armazenado.

Cabe salientar que esta pesquisa não tem como finalidade imediata uma melhora para os pacientes. Pode, entretanto, contribuir para um melhor entendimento desta doença, o qual, no futuro, pode levar ao desenvolvimento de uma terapia mais efetiva. Não existe um prazo exato ou estipulado para que você receba os resultados dos exames realizados nesta pesquisa, mas estes lhes serão informados assim que estiverem disponíveis. Você pode optar por não saber o resultado dos testes quando estes estiverem disponíveis.

DÚVIDAS

Se você tiver alguma dúvida em relação à pesquisa, pode contatar o pesquisador responsável por esta pesquisa, no endereço e telefone que constam no início deste Termo de Consentimento.

AUTORIZAÇÃO PARA PERMITIR PESQUISA DOS REGISTROS MÉDICOS

Você tem direito à privacidade. Os resultados deste estudo poderão ser publicados, mas o seu nome não será revelado e todo esforço será feito que a sua identidade não seja revelada. Por meio deste termo, você autoriza que os pesquisadores envolvidos neste estudo pesquisem os seus registros médicos a fim de obter as informações necessárias para a realização desta pesquisa.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO NA PARTICIPAÇÃO DO ESTUDO

Sua participação no estudo é voluntária. Se você decidir não participar do estudo, isto não afetará em nada o seu tratamento no seu hospital. A sua participação pode também ser interrompida a qualquer momento por você mesmo (a). Em qualquer caso, você não será penalizado (a).

Pelo presente termo, você declara que foi informado(a), de forma clara e detalhada, sobre a presente pesquisa, e que teve suas dúvidas esclarecidas por _____ . Declara ter sido esclarecido que não receberá nenhuma remuneração financeira pela participação no estudo. Declara que foi informado da garantia de receber resposta ou esclarecimento sobre a pesquisa a ser realizada, bem como da liberdade de não participar do estudo e da possibilidade de desistir, em qualquer momento, da participação. Além disso, declara que recebeu cópia deste termo de consentimento.

Data: ____/____/____

Paciente/assinatura: _____

Responsável legal/assinatura: _____

Eu expliquei a _____ os objetivos, riscos, benefícios e procedimentos necessários para esta pesquisa, e entreguei cópia deste termo de consentimento para o mesmo.

Data: ____/____/____

Nome/assinatura: _____

Apêndice II – Ficha de coleta de dados

Data de preenchimento: _____

Responsável: _____

Família: _____

Genótipo GBA: _____

Genótipo quitotriosidase: _____

Tipo de DG: _____

Paciente: _____

Data de nascimento : ____/____/____

Sexo: () masculino

() feminino

Naturalidade: _____

Ascendência: _____

História familiar (construir heredograma no verso, incluindo informações sobre história de D. Parkinson, mieloma múltiplo e outras neoplasias na família):

-Consangüinidade parental: ()sim () não () não informada

-Outros afetados na família?

() Sim. Número e grau parentesco:

() Não

() Não informado

Idade de início da sintomatologia: _____

Manifestações clínicas iniciais:

Desenvolvimento neuropsicomotor:

	Idade de aquisição	Idade de perda

sustento cefálico		
sentar sem apoio		
caminhar sem apoio		
palavras com no mínimo duas sílabas		
formar frases		

Escolaridade/ profissão:

Internações hospitalares (data, motivo):

Procedimentos cirúrgicos (data, procedimento, intercorrências):

Doenças crônicas? Sim () Quais?_____

Não ()

Faz uso de alguma medicação? Qual? Data de início e motivo

Data de diagnóstico: _____

Atividade da glicocerebrosidase: em leucócitos _____ VR: _____

Em fibroblastos _____ VR: _____

Tratamento específico

Terapia de reposição enzimática com imiglucerase

Idade de início: _____

Dose inicial: _____

Dose atual: _____

Intercorrências: Não

Sim

Terapia de inibição de síntese de substrato. Nome: _____

Idade de início: _____

Dose inicial: _____

Dose atual: _____

Intercorrências: Não

Sim

Outro

Idade de início: _____

Dose inicial: _____

Dose atual: _____

Intercorrências: () Não

() Sim

Último exame físico:

-data: _____

-idade: _____

-peso: _____

-comprimento/altura: _____

-dor? _____

-epistaxe, equimoses? _____

-hepatomegalia? _____

-esplenomegalia? _____

-alterações neurológicas? _____

-tremor? _____

-estrabismo? _____

-cifose? _____

-marcha: _____

-outros:

Preencher planilhas das avaliações laboratoriais

Planilha 1 – Avaliação hematológica/bioquímica

Data	Leuc	Neutr	Lfct	Plaq	Ht	Hb	Ferritina	AST	ALT	GGT	FA	LDH	Bil Direta	Bil Ind.	TP atividade	Vit B12	Quito	Tanner	Dose U/kg	Escore de gravidade		

Planilha 2 – Avaliação imunoglobulinas/eletrofores proteínas

					Eletroforese de proteínas						Alteração	
Data Exame	IgA	IgE	IgG	IgM	Data El. Prot	Proteína total	Albumina	Alfa1	Alfa 2	Beta	Gama	

Planilha 3 – Densitometria óssea

Data	Região	Valor (g/cm²)	Escore T *

Planilha 4 – Imagem do abdômen

Data	Eco ou Tomo?	Fígado (cm3)	Volume Fígado	Laudos Exame	%peso	Baço(cm3)	Volume baço	Laudos exame	%peso	Peso (Kg)

Planilha 5 – RX de ossos

Data / n° RX	Local RX	Regiões Anatômicas	Densidade Óssea	Osteólise medular e ou cortical endosteal	Fratura atual	Fratura passada	Necrose Asséptica da cabeça do Fêmur atual	Necrose Asséptica da cabeça do Fêmur passada	Outras Osteonecrose epifiária	Infarto Medular	Osteomielite	Expansão metafisiária femoral	Expansão metafisiária outros ossos	Prótese articular	Vértebra biconcava	Vértebra cuneiforme