

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

**DOENÇA DE NIEMANN-PICK TIPO C: CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DO  
FENÓTIPO CLÁSSICO E SUA COMPARAÇÃO COM O FENÓTIPO VARIANTE**

**CARLA VIEIRA ANDRADE**

Orientadora  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Janice Carneiro Coelho

Porto Alegre  
2012

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

**DOENÇA DE NIEMANN-PICK TIPO C: CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DO  
FENÓTIPO CLÁSSICO E SUA COMPARAÇÃO COM O FENÓTIPO VARIANTE**

**CARLA VIEIRA ANDRADE**

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

Orientadora  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Janice Carneiro Coelho

Porto Alegre  
2012

## **Agradecimentos**

À minha orientadora Dr<sup>a</sup> Janice Carneiro Coelho, pela disponibilidade e dedicação na condução deste trabalho; pela amizade, estímulo e ensinamentos transmitidos.

À minha bolsista Nicole Sartori, pela amizade, paciência e dedicação, que foram fundamentais para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos colegas Alexandre Mello e Cristina Garcia, pela valiosa ajuda ao cuidar de minhas primeiras amostras, quando precisei me ausentar por motivo de saúde.

Ao doutorando Fernando Kreut, pela ajuda e paciência nas dosagens de colesterol, etapa fundamental para que um dos objetivos principais desse trabalho fosse atingido.

Às meninas do laboratório 25, em especial a Mari Goldim e Cris Garcia pela colaboração nas dosagens de GBA e GLB e às demais colegas, pela amizade e valiosos momentos de convivência.

Aos doutores Ricardo Pires, Lionel Leitzke e Charles M. Lourenço, pelo precioso auxílio na obtenção de amostras de pele junto aos seus pacientes.

À minha família e amigos, por compreenderem a minha ausência em finais de semana e comemorações.

Ao luri, pelo amor, compreensão, estímulo e valiosa ajuda em todas as dificuldades que encontrei durante esta trajetória chamada Mestrado.

À minha mãe pelo apoio incondicional em todas as horas; pelo amor, amizade e todo conhecimento de vida. Minha eterna gratidão aos meus pais.

À Fundação médica do Rio Grande do Sul, pelo auxílio financeiro.

## Resumo

A doença de Niemann-Pick tipo C (NPC) é uma esfingolipidose autossômica recessiva que se caracteriza pelo acúmulo lisossômico de colesterol não-esterificado em vários tecidos, resultando em neurodegeneração progressiva, hepatoesplenomegalia e paralisia ocular vertical, entre outros sintomas. Sua manifestação ocorre geralmente entre a metade da infância e a adolescência. A morte ocorre geralmente até a terceira década de vida. Associado à sintomatologia clínica, o diagnóstico de NPC é realizado através do teste de Filipin em fibroblastos cultivados, que demonstra um intenso padrão de fluorescência perinuclear, consistente com o acúmulo de colesterol não-esterificado. Alguns pacientes, referidos como NPC variantes, apresentam quadro clínico compatível com NPC, mas resultados inconclusivos nos testes bioquímicos, com fluorescência não característica no teste de Filipin, tornando problemático o diagnóstico. O objetivo deste trabalho foi desenvolver técnicas objetivas capazes de auxiliar na confirmação do diagnóstico de NPC, quando um fenótipo apresentar característica indefinida/variante ao teste de Filipin, tais como: quantificação do padrão de fluorescência perinuclear quanto ao número de pixels em pacientes com fenótipo clássico (NPC cl) e variante (NPC var) de NPC, comparando-os entre si e com controles saudáveis (CS); medida da quantidade de colesterol citoplasmático em fibroblastos dos dois grupos de pacientes; medida da atividade das enzimas esfingomielinase ácida (ASM), quitotriosidase (QT), beta-glicosidase ácida (GBA) e beta-galactosidase (GLB). Todos estes parâmetros foram comparados com aqueles de CS. Os resultados mostraram que a quantificação da fluorescência do colesterol no teste de Filipin nos três grupos estudados através do número de pixels da imagem, é um método prático e não subjetivo que demonstrou uma diferença significativa entre o acúmulo de colesterol intracelular em CS, NPC cl e NPC var, confirmando a eficácia do método para o esclarecimento de padrões duvidosos. A dosagem de colesterol intracelular em fibroblastos de NPC apresentou-se sete vezes maior no padrão clássico e quatro vezes maior no variante, do que aquela encontrada nos CS. Com esses dados, a dosagem intracelular de colesterol mostra-se um bom parâmetro quantitativo para auxiliar no teste de Filipin quando este apresentar padrão de fluorescência apenas moderado. A medida da atividade da ASM tanto em leucócitos quanto em SPF não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudados, embora seja aparente a diminuição na atividade desta enzima no fenótipo NPC cl. Com os valores obtidos para a medida da atividade da QT em plasma e SPF, verificamos que não houve diferença significativa entre os dois grupos NPC mas sim entre estes e os CS, demonstrando que tanto os indivíduos com o fenótipo clássico quanto com o variante possuem uma atividade aumentada desta enzima. A análise da atividade da GBA em leucócitos não apresentou diferenças significativas entre os três grupos, embora sua atividade em NPC cl pareça maior do que em CS. Já na análise em SPF, esta diferença foi estatisticamente confirmada. A atividade da GLB em leucócitos não apresentou diferenças entre os grupos estudados, embora esta pareça maior nos grupos NPC do que em CS.

Palavras-chave: Doença de Niemann-Pick tipo C, fibroblastos, colesterol intracelular, teste de filipin, esfingomielinase ácida.

## Abstract

Niemann-Pick disease Type C (NPC) is an autosomal recessive sphingolipidosis which is characterized by a lysosomal accumulation of unesterified cholesterol in various tissues, resulting in progressive neurodegeneration, hepatosplenomegaly and vertical eye paralysis, among other symptoms. Its onset occurs commonly between middle childhood and adolescence. Death occurs usually until the third decade of life. Along with the clinical symptoms, the diagnosis of NPC is accomplished by Filipin test in cultured fibroblasts, showing an intense perinuclear staining pattern, which is consistent with the accumulation of unesterified cholesterol. Some patients, referred to as NPC variants, present a clinical picture of NPC, but inconclusive results in biochemical tests, with no characteristic fluorescence in Filipin test, which makes the diagnosis problematic. The objective of this study was to develop objective techniques that can assist in confirming the diagnosis of NPC, when the phenotype shows undefined/variant characteristics to Filipin test, such as: quantification of perinuclear fluorescence pattern based on pixels' luminosity pattern in patients with classical (NPC cl) and variant (NPC var) NPC phenotype, comparing them among themselves and with healthy controls (CS); the amount of cytoplasmic cholesterol in fibroblasts of both groups of patients; measurement of the activity of the enzymes acid sphingomyelinase (ASM), chitotriosidase (CT), beta-glucosidase acid (GBA), and beta-galactosidase (GLB). All of these parameters were compared with those of CS. The results showed that the fluorescence quantitation of cholesterol in the Filipin test, for the three studied groups, by counting the number of image pixels, is a practical and non-subjective method, which showed a significant difference between the accumulation of intracellular cholesterol in CS, NPC cl and NPC var, confirming its effectiveness to clarify dubious patterns. Measures of intracellular cholesterol in NPC fibroblasts showed seven times higher in classic and four times higher in variant pattern, than that found in CS. With these data, the dosage of intracellular cholesterol appears to be a good parameter to aid in the quantitative Filipin test when it presents only a moderate fluorescence pattern. The measurement of ASM activity in both leukocytes and in SPF did not show statistically significant differences between the groups, despite the remarkable decrease in the enzyme's activity in NPC cl phenotype. With the data obtained for QT's activity in plasma and SPF, we found that there was no significant difference between the two NPC groups, but a significant one between the NPC and the CS, demonstrating that both individuals with the classical phenotype and with the variant one have an increased activity of this enzyme. The analysis of GBA activity in leukocytes showed no significant differences among the three groups, although its activity in NPC cl seemed to be greater than in CS. In the SPF analysis, this difference was statistically confirmed. The activity of GLB in leukocytes did not differ between the groups, although it seems greater in the NPC group than in CS.

Key-words: Niemann-Pick disease Type C, fibroblasts, intracellular cholesterol, Filipin test, acid sphingomyelinase.

**Lista de abreviaturas**

ASM – Esfingomielinase ácida

CS – Controles saudáveis

DLD – Doenças lisossômicas de depósito

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNP – Doença de Niemann-Pick

DNPA – Doença de Niemann-Pick tipo A

DNPB – Doença de Niemann-Pick tipo B

DNPC – Doença de Niemann-Pick tipo C

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

EIM – Erros inatos do metabolismo

FDA – Food and drug administration

GBA –  $\beta$ - glicosidase ácida

GLB –  $\beta$ -galactosidase

GM2 - Monosialogangliosídeo 2

GM3 - Monosialogangliosídeo 3

HGM-CoA – Hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA

HPBCD – 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina

HPLC – Cromatografia líquida de alta performance

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

LPDS – Soro deficiente em lipoproteína

NPA – Niemann-Pick tipo A

NPB – Niemann-Pick tipo B

NPC - Niemann-Pick tipo C

NPC cl - Niemann-Pick tipo C com fenótipo clássico

NPC var - Niemann-Pick tipo C com fenótipo variante

NPC1 – Proteína NPC1

NPC2 – Proteína NPC2

PBS – Tampão salina-fosfato

QT- Quitortriosidase

RE – Retículo endoplasmático

SBF – Soro bovino fetal

SPF – Sangue impregnado em papel filtro

TCA – Ácido tricloroacético

TRS – Terapia de redução de substrato

UV – Ultravioleta

## Sumário

### Parte I

INTRODUÇÃO.....	1
1. Erros Inatos do Metabolismo.....	1
2. Doenças Lisossômicas de depósito.....	2
3. Doença de Niemann-Pick.....	4
4. Doença de Niemann-Pick tipo C.....	5
5. Dificuldades no diagnóstico da DNPC.....	10
6. Tratamento.....	12
OBJETIVOS DO TRABALHO.....	14
1. Objetivo Geral.....	14
2. Objetivos Específicos.....	14

### Parte II

CAPÍTULO I - MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
1. Local de execução.....	15
2. Amostras.....	15
3. Grupo Controle.....	16
4. Grupo Experimental.....	16
5. Processamento e armazenamento das amostras.....	17
5.1. Amostras de sangue colhido em papel filtro (SPF).....	17
5.2. Separação do plasma.....	17
5.3. Separação dos leucócitos do sangue periférico.....	18
5.4. Cultivo de fibroblastos.....	19
5.5. Coleta de fibroblastos.....	20
5.6. Técnica de Filipin adaptada de Kruth e colaboradores (1986).....	20
5.7. Quantificação da fluorescência do teste de Filipin.....	22
5.8. Dosagem de colesterol.....	22
5.9. Dosagem de proteínas.....	23
5.10. Medida da atividade enzimática da ASM.....	24
5.10.1. Leucócitos.....	25
5.10.2. SPF.....	26
5.11. Medida da atividade da enzima GBA.....	27
5.11.1. Leucócitos.....	28



5.11.2. SPF.....	28
5.12. Medida da atividade da enzima GLB.....	29
5.12.1. Leucócitos.....	29
5.13. Medida da atividade da enzima QT.....	29
5.13.1. Plasma.....	29
5.13.2. SPF.....	30
5.14. Descarte de materiais.....	30
5.15. Análise estatística.....	31
5.16. Considerações éticas.....	31
<b>CAPÍTULO II – RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
1. Visualização do colesterol nos fibroblastos de NPC, NPC variante e CS.....	32
2. Quantificação do colesterol observado ao microscópio – quantidade de pixels.....	33
3. Quantidade de colesterol intracelular observada pela dosagem de colesterol nos fibroblastos.....	34
4. Razão entre a quantidade de colesterol acumulada nos fibroblastos e a quantidade de pixels observada ao microscópio.....	34
5. Comparação da atividade enzimática de ASM nos grupos estudados....	35
6. Comparação da atividade enzimática de QT nos grupos estudados.....	36
7. Comparação da atividade enzimática de GBA nos grupos estudados.....	38
8. Comparação da atividade enzimática de GLB nos grupos estudados.....	39
9. Ponto de corte e valores de referência para ASM em leucócitos e SPF	40
<b>Parte III</b>	
DISCUSSÃO .....	42
CONCLUSÕES .....	49
PERSPECTIVAS .....	51
REFERÊNCIAS .....	52
ANEXOS .....	58

## **Parte I - Introdução**

### **1. Erros Inatos do Metabolismo**

Os Erros Inatos do Metabolismo (EIM) são doenças metabólicas hereditárias as quais resultam da falta ou deficiência na atividade de uma ou mais enzimas específicas ou do defeito em uma proteína de transporte. Essa condição pode levar ao acúmulo de substrato, normalmente presente em concentrações mínimas, à deficiência de produtos intermediários críticos, à deficiência de produtos finais específicos ou ainda ao excesso tóxico de produtos de vias metabólicas acessórias (Scriver et al., 2001; Ballabio, 2009).

O termo EIM foi proposto por Sir Archibald Garrod em 1902, através de seus estudos sobre a alcaptonúria, pentosúria, albinismo e cistinúria, ao observar que os indivíduos afetados apresentavam concentração anormal de substâncias endógenas, sugerindo a presença de defeitos pontuais no metabolismo dessas moléculas. Na década de 40, foi demonstrado por Beadle e Tatum (Beadler e Tatum, 1941) que um gene exercia influência sobre a síntese de uma determinada enzima, a qual catalisava este passo da rota metabólica desenvolvendo a idéia de que o processo metabólico se desdobra em etapas, cada uma delas controlada por uma enzima específica. Essa teoria fortaleceu a hipótese de Garrod acerca da existência dos EIM (Scriver, 2008).

A maioria dos EIM é herdada de forma autossômica recessiva, com risco de 25% a cada gestação de pais heterozigotos. Alguns são ligados ao cromossoma X, sendo o risco de recorrência de 50% a cada gestação para o sexo masculino e de 50% das filhas serem portadoras. Existem ainda as

heranças mitocondriais, onde o risco de recorrência é de praticamente 100% para filhos de ambos os sexos.

São descritas mais de 500 doenças classificadas como EIM, sendo que essas são raras isoladamente, porém, se analisadas em conjunto apresentam uma incidência de 1:5000 nascidos vivos (Sanderson et al., 2006), sendo assim, o diagnóstico precoce e tratamento adequado, podem reverter sintomas agudos e prevenir danos crônicos.

Os EIM são classificados de várias maneiras, devido a sua heterogeneidade metabólica, porém, a mais didática e de maior aplicação clínica é aquela proposta por Saudubray e Charpentier (1995). Nesta classificação, os EIM dividem-se em três grandes grupos de acordo com o fenótipo clínico da doença: o grupo 1 engloba os distúrbios na síntese ou catabolismo de moléculas complexas ou macromoléculas. Fazem parte deste grupo as doenças lisossômicas de depósito (DLDs) e as peroxissomiais; no grupo 2 estão os erros inatos do metabolismo intermediário, que levam à intoxicação aguda e recorrente ou crônica e progressiva. Fazem parte deste grupo as aminoacidopatias, os defeitos dos ácidos orgânicos e do ciclo da uréia e as intolerâncias aos açúcares e no grupo 3 encontramos a deficiência na produção ou utilização de energia resultante de erros inatos do metabolismo intermediário no fígado, miocárdio, músculo ou cérebro.

## **2. Doenças Lisossômicas de Depósito**

As doenças lisossômicas de depósito (DLDs) são um subgrupo dos EIM, classificadas, segundo Saudubray e Charpentier (1995) como pertencentes ao grupo 1. Constituem-se de um grupo heterogêneo de cerca de 50 distúrbios

que são causados devido a vários fatores, entre eles a deficiência de enzimas lisossômicas, transporte deficiente dos substratos a serem hidrolisados ou dos produtos de hidrólise através da membrana lisossômica, a ausência de cofatores essenciais ou o defeito de proteínas ativadoras das esfingolipidases (Wang, 2011).

As estimativas de ocorrência de uma DLD variam de 1:1500 à 1:7000 nascidos vivos. Certas populações têm uma maior incidência de uma DLD em comparação com a população em geral. Descendentes judeus Ashkenazi tem de 50 a 60 vezes mais chances de herdar mutações que causam as doenças de Gaucher, Tay-Sachs, Niemann-Pick tipo A, e mucopolidose IV. A doença de Salla e aspartilglicosaminúria são mais prevalentes entre indivíduos de ascendência finlandesa, e a doença de Gaucher tipo 3 é mais frequente entre as pessoas com ascendência sueca (Marsden, 2010).

Os lisossomos são organelas intracelulares que contém hidrolases ácidas que degradam macromoléculas (proteínas, carboidratos complexos, ácidos nucleicos, lipídios, sulfatos e fosfatos). Os produtos finais são reutilizados pela célula ou eliminados do corpo. A ausência ou perda de função de uma enzima ao longo da via metabólica resulta no acúmulo de um intermediário ou produto metabólico (Marsden, 2010).

A deficiência parcial ou completa da atividade de uma enzima lisossômica prejudica a degradação de compostos macromoleculares, que então se acumulam dentro dos lisossomos. Esse acúmulo pode começar antes mesmo do nascimento, causando danos progressivos nas células, disfunções orgânicas e morte prematura (Reuser, 2011).

### 3. Doença de Niemann-Pick

A doença de Niemann-Pick (DNP) pertence às DLDs. São um grupo de esfingolipidoses caracterizadas pelo acúmulo de lipídeos no baço, fígado, pulmões, medula óssea e cérebro (Figura 1). Os pacientes com tipos A (DNPA) e B (DNPB) da doença de Niemann-Pick têm uma deficiência hereditária, autossômica recessiva, na atividade da enzima esfingomielinase ácida (ASM). O espectro clínico desta desordem é variável, sendo a DNPA uma forma neurológica infantil que resulta em morte em torno dos 3 anos de idade e a DNPB uma forma não-neurológica compatível com a sobrevivência até a idade adulta.

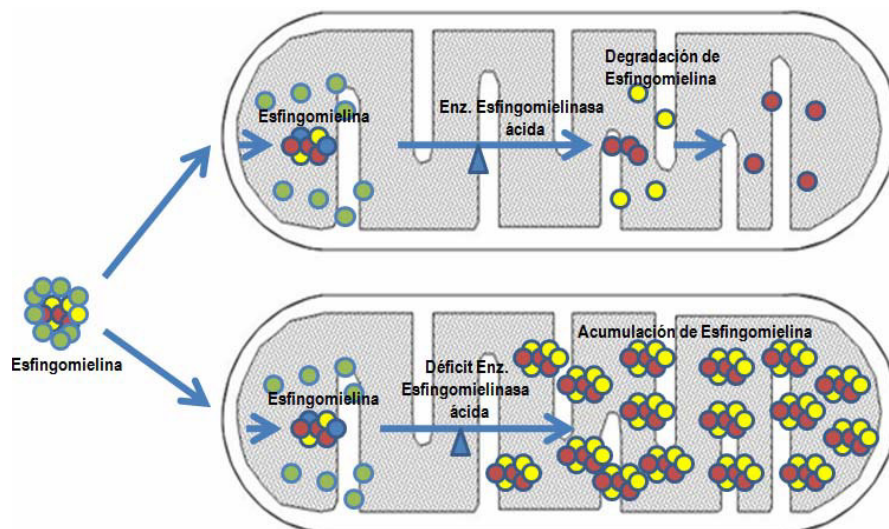


Figura 1: Modelo esquemático representando o acúmulo lisossômico em NPA/NPB devido a deficiência na atividade de ASM. Rev. Ped. Elec. [en línea] 2009, Vol 6, N° 2

A deficiência da ASM é pan-étnica, mas parece ser mais frequente em indivíduos de ascendência do Oriente Médio e Norte Africano. As estimativas atuais da incidência da doença são de aproximadamente 0,5 a 1 para cada 100.000 nascidos vivos. No entanto, é provável que a incidência seja maior, uma vez que os dados de frequência da doença estão baseados unicamente

em casos referidos de ensaios bioquímicos para confirmação laboratorial da deficiência na atividade enzimática. O gene que codifica para a ASM (SMPD1) tem sido extensivamente estudado. Sabe-se que ele está inserido em uma região do cromossomo 11, e é preferencialmente expresso a partir do cromossoma materno (Schuchman, 2007).

Os tratamentos para DNP são limitados, sendo a maioria deles constituídos por cuidados de apoio. Os transplantes de órgãos têm sido tentados com relativo sucesso. As perspectivas futuras incluem terapia de reposição enzimática e terapia gênica. Transplante de medula óssea tem sido realizado como tratamento de suporte para DNPB, além de cuidados nutricionais, medicação, fisioterapia e acompanhamento por especialistas, medidas estas que podem ajudar na qualidade de vida do paciente (McGovern e Schuchman, 2009).

#### **4. Doença de Niemann-Pick tipo C**

A doença de Niemann-Pick tipo C (DNPC) é uma esfingolipidose autossômica recessiva que se caracteriza pelo acúmulo lisossômico de colesterol não-esterificado em vários tecidos, resultando em um quadro de neurodegeneração progressiva. As manifestações clínicas são heterogêneas. A maioria dos pacientes apresenta, além de degeneração neurológica, danos hepáticos em certos casos fatais. Ataxia progressiva, hepatoesplenomegalia variável, paralisia ocular vertical, caracterizam o fenótipo clássico (Patterson et al., 2007; Imrie et al., 2007). Sua manifestação ocorre geralmente entre a metade da infância e a adolescência. A morte ocorre geralmente até a terceira década de vida.

Em cultura de fibroblastos de pacientes com DNPC, é observada uma falha no transporte intracelular de colesterol endocitado. Em células normais, este colesterol é rapidamente transportado para fora dos endossomos para a membrana plasmática do retículo endoplasmático (RE). Em células de pacientes com DNPC, o colesterol não sai da via endocítica e se acumula dentro dos lisossomos (Vance et al., 2005).

A patogenia da disfunção neuronal na DNPC parece muito mais complexa, uma vez que o colesterol do cérebro é sintetizado localmente, na maior parte por células oligodendrogliais e, em menor quantidade, por astrócitos e neurônios. Em um estudo de Imrie et al. (2007), foi observado que fibroblastos de pacientes com início de sintomas neurológicos na idade adulta podem apresentar tanto um defeito grave no tráfego do colesterol citoplasmático (DNPC clássico) ou apenas alterações mínimas neste transporte (DNPC variante). Por outro lado, em análise visceral de dois irmãos falecidos portadores de DNPC variante de uma forma juvenil, não foi observado acúmulo de lipídios no fígado e pouco acúmulo no baço, mas o cérebro mostrou acúmulo de gangliosídeos GM2 e GM3.

Dois genes estão associados à DNPC: NPC1 (18q11-12) e NPC2 (14q24.3). Em mais de 90% dos casos há um defeito na proteína NPC1, uma proteína integral da membrana, que atua no transporte e homeostase do colesterol (Sun et al., 2001). Este defeito leva ao acúmulo de colesterol não-esterificado, esfingomielina, fosfolipídios e glicolipídios no baço e fígado. Conforme Liscum e Sturley (2004), os glicolipídios encontram-se muito elevados no cérebro e observa-se deficiência parcial da esfingomielinase em fibroblastos como consequência secundária ao seqüestro lisossômico do

colesterol. Fibroblastos em cultura apresentam uma deficiência na síntese de ésteres de colesterol na presença de colesterol LDL o que gera acúmulo excessivo de colesterol não-esterificado nos compartimentos intra-vesiculares. Como consequência celular do dano molecular do seqüestro lisossômico de colesterol endocitado, ocorre um atraso na regulação homeostática e consequente acúmulo de colesterol nas células (Mukherjee e Maxfield, 2004).

A proteína NPC1 nativa é uma glicoproteína bastante grande, com 1252 aminoácidos e com 13 domínios transmembrana, que reside principalmente em endossomos tardios e interage transitoriamente com lisossomos e com a rede trans-Golgi. Ela possui um domínio de esterol e mostra homologia com os domínios da HMG-CoA redutase, SCAP e NPC1L, sendo que seu papel exato ainda é incerto, embora seja necessário para a função da proteína. Dois domínios luminais podem desempenhar um papel de interações proteína-proteína: um *loop* rico em cisteína com um motivo dedo-anel onde estão aproximadamente 1/3 das mutações descritas e um domínio altamente conservado com um motivo *zíper* de leucina, localizado na cauda N-terminal onde há um local de ligação de colesterol (Vanier, 2010; Storch e Xu, 2009).

Ao contrário da proteína NPC1, a proteína NPC2 é pequena, com apenas 132 aminoácidos, solúvel, secretada e recapturada. Ela é transportada para os lisossomos através de um receptor de manose-6-fosfato que se liga ao colesterol (Storch e Xu, 2009). A mutação p.S120P é observada em pacientes com início juvenil e forma neurológica progressiva e tem sido fundamental para elucidar o significado funcional do sítio de colesterol na ligação da proteína NPC2 (Infante et al., 2008) (Figura 2).



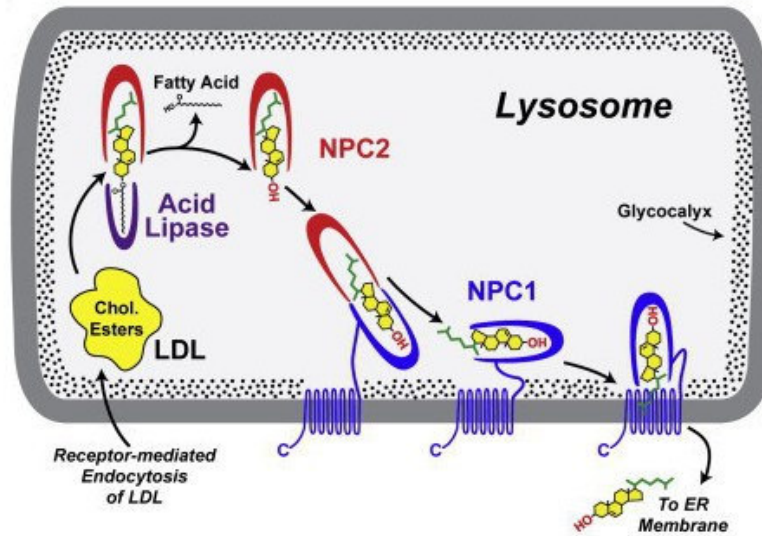


Figura 2: Modelo esquemático da via de transporte de colesterol lisossômico utilizando as proteínas NPC1 e NPC2 (Miller et al., 2011)

Estudos têm mostrado que tanto a proteína NPC2 quanto a NPC1 são necessárias para o egresso do colesterol a partir dos lisossomos. Com base no conhecimento atual, um modelo foi recentemente proposto por Kwon et al. (2009), para o papel coordenado das duas proteínas. Neste modelo, o colesterol lançado no lisossomo se liga a NPC2 com o seu grupo hidroxila exposto; com a transferência para o domínio N-terminal de NPC1 ocorre inversão da sua orientação, de modo que a cadeia lateral hidrofóbica poderá levá-lo para a membrana e/ou o glicocalix. Estudos recentes indicam que o papel das proteínas NPC2 e NPC1 no transporte de colesterol é restrita a exportação lisossomal. Os dados atuais sugerem que o movimento retrógrado do colesterol a partir da membrana plasmática para o RE não requer NPC1 e que a implicação destas proteínas no processamento celular de colesterol endógeno ainda é tema de discussão (Vanier, 2010)

Na DNPC, o armazenamento de gangliosídeos GM2 e GM3 no cérebro não é específico. No entanto, o aumento de GM2 ocorre muito mais cedo e é mais proeminente na DNPC do que em outras DLDs. Atualmente tem sido postulado que o armazenamento de esfingosina poderia ser o gatilho primário de uma cascata bioquímica, levando a patogenicidade da DNPC, uma vez que este lípidio interfere na homeostase do cálcio na NPC1 (Lloyd-Evans e Platt, 2010). De acordo com outro modelo estabelecido recentemente, acredita-se agora que dentro da matriz lisossômica, o colesterol é primeiramente ligado pela NPC2 antes de ser entregue à NPC1, que confere a sua exportação de dentro dos lisossomos (Tängemo et al., 2011).

Considerando que nas células normais, o LDL-colesterol é rapidamente exportado a partir de compartimentos endo-/lisossomais para a membrana de outras organelas, a ausência de qualquer uma das proteínas, seja NPC1 ou NPC2, leva a um acúmulo massivo de colesterol, glicoesfingolípido e outros lípidos nos lisossomos. Porém, até 20% dos pacientes são diagnosticados com um fenótipo bioquímico variante de DNPC que é caracterizado por uma insuficiência menos grave de tráfico intracelular de colesterol. Para estes, a coloração de Filipin em cultura de fibroblastos é muitas vezes apenas levemente fluorescente, quando comparada com as células de indivíduos saudáveis, o que reflete um acúmulo menor de colesterol dentro dos lisossomos (Tängemo et al., 2011). O fenótipo variante de DNPC é mais representativo em pacientes com sinais neurológicos não antes da idade adulta, no entanto, mesmo os pacientes mais severamente afetados podem apresentar um acúmulo de colesterol moderado, indicando que o transporte

ineficiente de colesterol observado em fibroblastos não corresponde necessariamente a gravidade clínica da doença (Macías-Vidal et al., 2010)

## **5. Dificuldades no diagnóstico da DNPC**

Associado à sintomatologia clínica, o diagnóstico bioquímico da DNPC é realizado através do teste de Filipin em fibroblastos cultivados em meio enriquecido com LDL (Kruth et al., 1986). Este demonstra um intenso padrão de fluorescência concentrada ao redor do núcleo, consistente com o acúmulo de colesterol não-esterificado. Embora Roff et al. (1992) afirmem que o teste de Filipin é bem específico, há uma pequena porcentagem dos pacientes, referida como DNPC variantes com maior ou menor habilidade em esterificar este colesterol. Esses indivíduos apresentam quadro clínico compatível com DNPC, mas resultados inconclusivos nos testes bioquímicos, com fluorescência não característica no teste de Filipin, tornando problemática a confirmação da doença.

O teste de Filipin é considerado padrão-ouro para o diagnóstico da DNPC, mas trata-se de uma análise subjetiva. Fenótipos variantes para DNPC possuem maior ou menor habilidade em esterificar o colesterol, e com isso, um padrão de fluorescência não compatível com o padrão clássico de DNPC, o que pode induzir a resultados falso-negativos ou inconclusivos. Nestes casos, outros ensaios bioquímicos e moleculares são necessários para auxiliar na confirmação do diagnóstico.

Testes genéticos moleculares também são usados para confirmar o diagnóstico em indivíduos com características bioquímicas variantes. A análise por DHPLC (*Denaturing high - performance liquid chromatography*) tem

sensibilidade e especificidade estimada entre 96% e 100% e tem sido empregada com sucesso na detecção de mutações em diferentes genes de interesse médico, mostrando-se mais eficiente do que outras técnicas utilizadas para este fim (Spiegelman et al., 2000). A desvantagem dos métodos moleculares é que como são muitas as mutações envolvidas, muitas vezes o seqüenciamento do gene se faz necessário, aumentando em muito o custo do diagnóstico.

Segundo Beheregaray et al. (2003), pacientes com DNPC apresentam 50% do colesterol esterificado de indivíduos normais. A dosagem do colesterol em fibroblastos é um teste quantitativo, que, associado ao teste de Filipin, pode permitir que se chegue com mais segurança ao resultado final. A aplicação de microscopia automatizada e análise quantitativa de imagem para avaliar objetivamente a intensidade da fluorescência do teste de Filipin em pacientes com DNPC bem como a intensidade e distribuição da mesma em controles não afetados, indica que, com essa estratégia, é possível de forma confiável quantificar o fenótipo bioquímico da DNPC com alta precisão e que a intensidade da fluorescência do Filipin se correlaciona bem com os níveis celulares de colesterol livre (Gilbert et al., 2009).

A quitotriosidase (QT) é uma enzima que, sob condições fisiopatológicas específicas, é secretada em grandes quantidades por macrófagos ativados, razão pela qual é utilizada como biomarcador para algumas DLDs. A medida da atividade da QT em pacientes com a forma clássica de DNPC costuma ser até 40 vezes maior do que em indivíduos normais, não tendo sido encontrada na literatura a medida de sua atividade em indivíduos com a forma variante (Lo et al., 2010). Dessa maneira, a medida da atividade da QT pode ser uma

ferramenta auxiliar para o diagnóstico de indivíduos com padrão inconclusivo no teste de Filipin.

Embora na DNPC não haja uma deficiência na atividade da enzima ASM, alguns autores afirmam que ela possa estar com sua atividade um pouco abaixo do normal (Nakashima et al., 1986). Sendo assim, a comparação da atividade desta enzima entre indivíduos com DNPC clássica e variante também poderia auxiliar no diagnóstico.

Neste trabalho, também abordamos outras duas enzimas do metabolismo dos esfingolipídios, visto que a atividade destas pode estar alterada na DNPC, são elas a  $\beta$ -glicosidase (GBA) e a  $\beta$ -galactosidase (GLB) e comparamos suas atividades entre os dois grupos da DNPC.

## **6. Tratamento**

Atualmente não há cura para NPC, e até recentemente, os tratamentos atuais consistiam somente no controle dos sintomas. O tratamento com células-tronco neurais foi investigado em modelo animal, mas não houve evidência clara de algum benefício, assim como dietas com colesterol reduzido, que são freqüentemente utilizadas, mas sem evidência de sua eficácia (Ahmad et al., 2007). Entretanto, a terapia de redução de substrato (TRS), é uma nova opção de tratamento que pode estabilizar ou desacelerar a progressão da doença. O miglustat é um inibidor da glicosilceramida-sintase, que inibe a síntese de glicoesfingolipídeos, quebrando o engarrafamento do tráfego de lipídios que causa o seu acúmulo nas células (Santos et al., 2008). A TRS foi aprovada para o tratamento das manifestações neurológicas progressivas em adultos e crianças, baseada em resultados que mostraram a melhora ou estabilização de vários marcadores clínicos significativos de NPC, tais como

movimentos oculares sacádicos, cognição, acuidade auditiva e ambulação (Actelion Pharmaceuticals do Brasil LTD).

Recentemente, a 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina (HPBCD) foi aprovada pela FDA para tratar gêmeas idênticas com NPC, com via de administração implantada cirurgicamente, permitindo que os médicos aplicassem HPBCD diretamente em sua corrente sanguínea. Foi demonstrado que o tratamento com ciclodextrina retarda os sintomas da doença, reduz o acúmulo intraneuronal de lipídios e indicadores secundários de neurodegeneração, além de aumentar a longevidade em camundongos NPC.

Outras estratégias de tratamento estão sendo pesquisadas *in vitro* e *in vivo*. Elas incluem a mobilização de colesterol, o uso de curcumina como um agente antiinflamatório e modulador de cálcio (Lloyd-Evans et al., 2008) e substituição de neuroesteróides (Ahmad et al., 2005). Os neuroesteroides afetam o crescimento de células nervosas durante o desenvolvimento embrionário. Camundongos com a mutação NPC1 conseguem produzir neuroesteroides durante o período embrionário/fetal, mas perdem essa habilidade após o parto, antes do início dos sintomas neurológicos. Estudos em fase inicial com reposição de neuroesteroides com Alopregnanolona em camundongos com NPC indicaram retardo no início dos sintomas, redução no acúmulo de lipídios e melhoras na sobrevivência, contanto que o tratamento seja iniciado logo após o parto. Os mecanismos através dos quais estes efeitos ocorrem não são completamente conhecidos (Actelion Pharmaceuticals do Brasil LTDA).

## **Objetivos do trabalho**

### **1. Objetivo geral**

Através de ensaios bioquímicos qualitativos e quantitativos, desenvolver ferramentas confiáveis capazes de auxiliar na confirmação do diagnóstico da doença de NPC, quando um fenótipo apresentar característica indefinida/variante no teste de Filipin.

### **2. Objetivos específicos**

1. Quantificar o padrão de fluorescência perinuclear quanto ao número de pixels em pacientes com DNPC clássico, DNPC variante e CS, comparando-os entre si.

2. Medir a quantidade de colesterol citoplasmático em fibroblastos dos dois grupos de pacientes comparando-os entre si e com aquele de indivíduos normais.

3. Medir a atividade das enzimas esfingomielinase, quitotriosidase,  $\beta$ -glicosidase e  $\beta$ -galactosidase em cada um dos grupos comparando-os.

4. Estabelecer novos valores de referência e ponto de corte para técnica miniaturizada da medida da atividade da esfingomielinase para leucócitos e SPF.

## **Parte II**

### **Capítulo I - Materiais e Métodos**

#### **1. Local de execução**

Todos os ensaios necessários para o desenvolvimento desse projeto foram realizados no Laboratório 25 (Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo – DLD), do Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Este trabalho foi aprovado pelo comitê de pesquisa e ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob número 18508.

#### **2. Amostras**

Para este trabalho, foram utilizados 9 mL de sangue em heparina e biópsia de pele de três grupos de indivíduos: DNPC clássico, DNPC variante e controles saudáveis. Os pacientes já tinham sido previamente diagnosticados clínica e laboratorialmente. Os participantes deste projeto assinaram termo de consentimento livre e esclarecido.

Foi feito o cálculo de tamanho da amostra para comparação entre médias com variâncias diferentes, estabelecendo o nível de significância em 5% e o poder em 90%. A estimativa de tamanho de amostra para cada grupo foi de 10 amostras (Armitage, 1987).



### **3. Grupo controle**

Para o teste de filipin e dosagem de colesterol não-esterificado, foram testadas 10 culturas de fibroblastos de indivíduos saudáveis, isto é, não portadores de DNPC ou outra DLD. Fragmentos de pele foram obtidos a partir de procedimentos cirúrgicos, e foram cedidos gentilmente pelo Centro Cirúrgico do Hospital da Universidade Luterana do Brasil - ULBRA.

Para a dosagem das enzimas QT,  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glicosidase e ASM, foram utilizadas 20 amostras de 9 mL de sangue heparinizado coletadas de doadores voluntários do Banco de Sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). As amostras foram identificadas com números, preservando a identidade dos doadores, que não foram informados dos resultados e não tiveram sua identidade revelada em nenhuma etapa de execução do trabalho. O sangue foi processado a fim de obtermos amostras de leucócitos, plasma e papel filtro.

### **4. Grupo experimental**

Foram utilizados fibroblastos provenientes de biópsias de pele de 10 indivíduos DNPC com fenótipo clássico e dois DNPC com fenótipo variante, previamente diagnosticados. Essas biópsias foram obtidas através de médicos colaboradores deste projeto. Os mesmos médicos nos enviaram 9 mL de sangue heparinizado de cada paciente, porém, no grupo variante, não foi possível separar os leucócitos em uma das amostras, somente o plasma. O material não possuía informações que possibilitassem a identificação dos pacientes.

Tanto as biópsias do grupo controle, como aquelas do grupo experimental, assim que chegavam ao laboratório, eram imediatamente processadas em capela de fluxo laminar Labconco (*Purifier Class II Total Exhaust Safety Cabinet*) previamente higienizada com álcool 70% esterilizada com UV, para serem depois, cultivadas em calor úmido à 37°C. Todos os procedimentos relativos à cultura de células foram realizados em ambiente estéril de acordo com Coelho e Giugliani (2001).

## **5. Processamento e armazenamento das amostras**

### **5.1. Amostras de sangue colhido em papel filtro (SPF)**

Cada amostra de sangue foi homogenizada manualmente através de oito suaves inversões do tubo para que em seguida, fosse pingada uma gota em cada círculo do cartão de papel filtro (Whatman 903<sup>®</sup>; Whatman Inc., EUA). As amostras de SPF foram secas em temperatura ambiente (~25°C) por no mínimo três horas em posição horizontal. Depois de seco, o material foi armazenado à 4°C por, no máximo, 60 dias.

### **5.2. Separação do plasma**

Do restante do sangue, 2 mL foram centrifugados a 2000 rpm durante 10 minutos para a separação de plasma, (Baby I Centrifuge Mod. 206, Fanem, Brasil), que foi armazenado à -20°C até o momento do uso.

### 5.3. Separação dos leucócitos do sangue periférico

O restante do sangue total foi utilizado para a separação de leucócitos de acordo com Skoog e Beck (1956). Sendo assim, o sangue foi misturado ao mesmo volume de uma solução de separação de leucócitos (glicose 5% + dextran 6% + ácido cítrico dextrose). Esta mistura ficou em temperatura ambiente de 45 a 60 minutos, tempo necessário para a sedimentação dos eritrócitos. Transcorrido esse tempo, o sobrenadante foi transferido para um tubo cônico plástico gelado (TPP, Techno Plastic Products, Suíça) e centrifugado (Himac CR22GII, Hitachi Ltd, Japão) a 2000 rpm por 10 min a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e adicionado 800 µL de NaCl 0,9%. Os leucócitos foram resuspensores com agitação em vórtex e adicionados 2,4 mL de água destilada gelada, sendo homogenizada com o auxílio de vórtex. Durante 90 segundos, o tubo foi mantido em banho de gelo e, após esse tempo, foi adicionado 800 µL de NaCl 3,6%, e novamente agitado em vórtex, para ser em seguida centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos a 4°C.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi mais uma vez descartado e, se ainda existiam eritrócitos no *pellet*, uma nova lavagem com NaCl e água destilada era realizada e, novamente centrifugado. O *pellet* de leucócitos foi armazenado a -20°C por no máximo, 60 dias.

Antes da medida da atividade enzimática nos leucócitos isolados, foi necessária a diluição do *pellet* em 500 µL de água destilada para que as mesmas fossem sonicadas e tivessem suas membranas plasmáticas e lisossomais lisadas possibilitando a liberação das enzimas lisossômicas. A sonicação (Sonicator Ultrasonic Processor, Hert Systems) foi realizada em dois

ciclos de 25 segundos intercalados por 30 segundos, com intensidade de 7,5 a 10%, que representa 45 W, com as amostras em banho de gelo.

#### 5.4. Cultivo de fibroblastos

Tanto para indivíduos do grupo controle quanto para os indivíduos do grupo experimental, foi realizado o lançamento de uma biópsia de pele, isto é, a amostra de pele foi fragmentada em minúsculos pedaços colocados cuidadosamente no interior de um frasco de cultura estéril (Figuras 3A e 3B). Após esse processo, foi acrescentado 3 mL de meio de cultura Ham F-10 (Gibco®) suplementado com 20% de soro bovino fetal SBF (Gibco®) e 43 µL de gamicina, no frasco invertido, incubando-o em estufa à 37°C por 40 minutos, para em seguida, o frasco ser desvirado e incubado durante sete dias. Após esse período, o meio de cultura foi trocado a cada dois dias até atingirem a confluência adequada, ou seja, até que as células estivessem cobrindo completamente o fundo do frasco (Figura 3C).

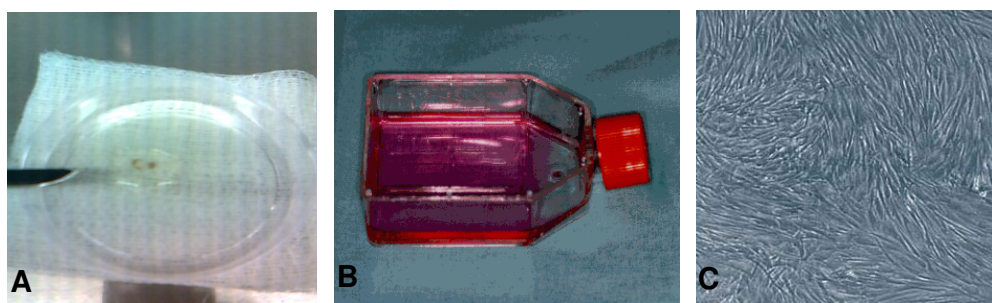


Figura 3: (A) Biópsia de pele fragmentada em pequenos explantes; (B) Frasco de cultura contendo os explantes e meio de cultura, pronto para ser incubado; (C) Cultura de fibroblastos confluentes.

### **5.5. Coleta de fibroblastos**

Depois de confluentes, as culturas foram lavadas duas vezes com 2 mL de PBS pré-aquecido. Removido o PBS foi adicionado 2 mL de solução de EDTA 0,02% em PBS. Após, foram adicionadas 10 gotas de tripsina-EDTA e incubadas por 10 minutos a 37°C. As células foram suspensas mecanicamente e transferidas com pipeta Pasteur para um tubo de centrifuga em banho de gelo e o frasco lavado duas vezes com 2 mL de PBS, para então serem centrifugados com refrigeração (4°C) durante 10 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 5 mL de salina 0,9% para ser novamente centrifugado como na etapa anterior. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* armazenado até a dosagem em freezer de -20°C.

Antes da medida da atividade enzimática ou dosagem do colesterol intracelular dos fibroblastos, foi necessária a diluição do *pellet* em 300 µL de água destilada para que as mesmas fossem sonicadas e suas membranas plasmáticas e lisossomais lisadas. A sonicação foi realizada da mesma forma já descrita para leucócitos.

### **5.6. Técnica de Filipin adaptada de Kruth e colaboradores (1986)**

O teste de Filipin foi realizado a partir da confluência das células no frasco de cultura. Neste ponto, as células foram tripsinizadas, contadas em Câmara de Neubauer e distribuídas 14000 células sobre uma lamínula estéril em cada poço de três placas estéreis de 24 poços (Figura 4A). Em cada poço foi adicionado 450 µL meio MEM suplementado com 5% de soro deficiente em lipoproteína (LPDS). As placas foram mantidas a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> durante quatro dias. Passado este tempo, o meio de cada poço foi trocado e

adicionou-se 0,73 µg/100 µL de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e as placas foram novamente incubadas por mais 24 horas.

Na ausência de luz, as células foram lavadas duas vezes com 300 µL de tampão PBS pré-aquecido e o meio retirado com seringa de 1 mL. Foi feita então, a fixação das células por 45 minutos com 300 µL de tampão fosfato formalina 10% e pH 7,2 em câmara escura. Quando o fixador foi retirado, as células foram novamente lavadas duas vezes com 300 µL de tampão PBS e posteriormente duas vezes com 300 µL de solução salina 0,9 % por 5 minutos cada.

Para a coloração das lamínulas foi utilizado 130 µL do corante de Filipin (0,01% em PBS). Este corante foi obtido a partir de uma solução mãe 0,05%, preparada da seguinte forma: 1 mg de corante filipin foi dissolvido em 1 mL de DMSO. Desta solução, foi retirado 400 µL e adicionado 1,6 mL de tampão PBS, formando uma solução 0,01%. As lamínulas ficaram em câmara escura por 45 minutos após a adição do corante. Passado este período, as mesmas foram lavadas com 300 µL de solução salina 0,9% por duas vezes e esta removida com seringa de 1 mL.

A lamínula de cada um dos poços foi cuidadosamente retirada da placa e colocada sobre papel absorvente com a face com os fibroblastos virada para cima. Foi colocada uma gotícula com 10 µL de citifluor sobre uma lâmina histológica e sobre esta, foi disposta a lamínula com a face, com os fibroblastos, voltada para baixo. O excesso de citifluor foi cuidadosamente retirado com papel filtro, sem pressionar a lamínula e então esta foi selada contra a lâmina com esmalte, ficando armazenadas a 4°C até o momento da análise no microscópio de fluorescência. Foram utilizados filtros de excitação

em aproximadamente 358 nm e emissão em 461 nm, para uma exposição de 64 ms (Figura 4B).

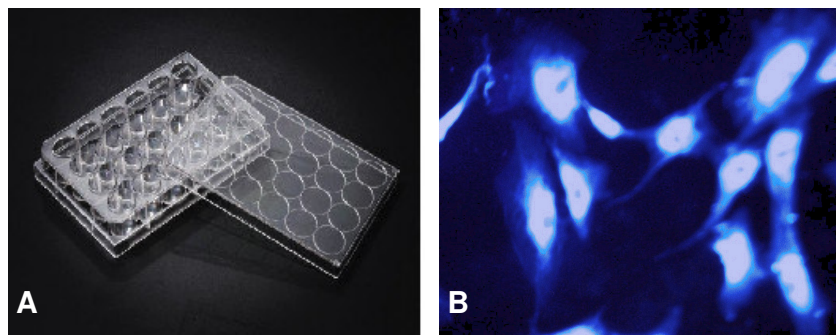


Figura 4: (A) Placa de 24 poços usada para a técnica miniaturizada do teste de filipin; (B) Teste de filipin de paciente com fenótipo clássico de NPC.

### 5.7. Quantificação da fluorescência do teste de Filipin

Todas as lâminas foram analisadas e fotografadas pelo programa NIS – Element AR 3.10 no microscópio de fluorescência Nikon (Nikon Instruments, Melville, NY). As imagens tiveram a quantificação da fluorescência analisada quanto ao número de pixels, pelo programa CellM Olympus.

### 5.8. Dosagem de colesterol

O colesterol intracelular dos fibroblastos foi determinado através de técnica fluorimétrica, utilizando o kit comercial Amplex<sup>®</sup> Red Cholesterol (Provas Moleculares) de acordo com as instruções do fabricante. Para tanto, foi utilizada uma curva padrão de quatro pontos, um controle positivo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e as amostras que foram pipetadas em uma placa fluorimétrica preta de 96 poços e fundo plano (OptiPlate<sup>™</sup> -96F, Perkin Elmer) conforme a tabela I:

Tabela I: Curva padrão para dosagem de colesterol em fibroblastos.

	Tampão 1X (S)	Padrão colesterol 8 µg/mL (W1)	Solução 10 µM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Amostra*
Branco	50 µL	0	-	-
Ponto I	43,75 µL	6,25 µL	-	
Ponto II	37,5 µL	12,5 µL	-	-
Ponto III	25 µL	25 µL	-	-
Ponto IV	0	50 µL	-	-
Solução 10 µM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (controle positivo)	-	-	50 µL	-
Amostra	-	-	-	50 µL

Sobre a curva e as amostras, foram adicionados 50 µL de solução de reação W2 (300 µM Amplex<sup>®</sup> Red Reagent + 2 U/ml peroxidase + 2 U/mL colesterol oxidase + 0,2 U/mL colesterol esterase) em todos os poços. A placa foi selada com alumínio e deixada durante 30 minutos a 37°C, em incubadora de placas com agitação e calor seco. Após a incubação, a fluorescência foi medida em leitor de placa (SpectraMax M5 – Molecular Devices) a 544 nm de excitação e 590 nm de emissão. O valor obtido foi corrigido pela dosagem de proteínas encontradas nos fibroblastos testados e expresso em µg de colesterol/ mg de proteína.

### 5.9. Dosagem de proteínas

Para a quantificação das proteínas totais em leucócitos e fibroblastos foi utilizada a técnica colorimétrica de Lowry et al. (1951) miniaturizada, que atualmente é utilizada pelo nosso laboratório. Essa técnica utiliza somente 10 µL de amostra para leucócitos e 20 µL para fibroblastos e é toda feita em



placas transparentes de fundo plano de 96 poços (PE SpectraPlate™ -96TC, Perkin Elmer).

O protocolo consiste em preparar uma curva de oito pontos com concentrações que vão de 2,5 a 50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de albumina, com o volume final de 50  $\mu\text{L}$ . Para a reação em leucócitos foram utilizados 10  $\mu\text{L}$  de amostra e 40  $\mu\text{L}$  de água destilada e 20  $\mu\text{L}$  de amostra e 30  $\mu\text{L}$  quando a dosagem foi realizada em fibroblastos. O controle negativo foi feito utilizando-se 50  $\mu\text{L}$  de água destilada. Em todos os poços foram adicionados 150  $\mu\text{L}$  de reativo alcalino de cobre homogenizando com pipeta e incubados por 10 minutos em temperatura ambiente. Após foi adicionado 15  $\mu\text{L}$  de Folin-Ciocalteus (Merck) diluído 1,4 vezes em água destilada, homogenizado com pipeta e incubado por 30 min em temperatura ambiente. Toda técnica foi feita em duplicata e a leitura realizada em 750 nm de absorbância em espectrofotômetro com leitor de placa (SpectraMax M5 – Molecular Devices).

#### **5.10. Medida da atividade enzimática da ASM**

Para a dosagem da atividade da ASM, foram utilizadas técnicas miniaturizadas adaptadas de Pantchev et al. (1980), já realizadas em nosso laboratório para a triagem e/ou diagnóstico de Doença de Niemann-Pick tipo B. As técnicas padrão foram reduzidas a fim de diminuir o volume de amostra bem como dos custos do ensaio. A técnica para leucócitos foi reduzida quatro vezes e para o ensaio em SPF em duas vezes.

### 5.10.1. Leucócitos

A medida da atividade da ASM é um método radioscópico, no qual é utilizado o substrato radioativo esfingomielina  $^{14}\text{C}$  – 10  $\mu\text{Ci}/200 \mu\text{l}$ . A técnica foi realizada sempre em duplicata. Primeiramente, 2,5  $\mu\text{L}$  do substrato foi pipetado cuidadosamente dentro de tubos tipo eppendorff de 1,5 mL, segundo a tabela II.

Tabela II: Técnica miniaturizada para dosagem de ASM em leucócitos

	Teste	Branco	Total
Substrato	2,5 $\mu\text{l}$	2,5 $\mu\text{l}$	2,5 $\mu\text{l}$
Taurocolato/triton	2,5 $\mu\text{l}$	2,5 $\mu\text{l}$	-
Tampão acetato	2,5 $\mu\text{l}$	2,5 $\mu\text{l}$	-
Água	2,5 $\mu\text{l}$	7,5 $\mu\text{l}$	-
Amostra	5 $\mu\text{l}$	-	-

Os tubos ficaram abertos em capela de exaustão durante dez minutos, para evaporação do diluente volátil clorofórmio: metanol, do substrato. Transcorrido esse tempo, o tubo com a radioatividade total foi fechado para ser utilizado mais tarde. Nos demais, foi adicionado 2,5  $\mu\text{L}$  de taurocolato de sódio com triton X100 em água destilada e 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão acetato de sódio 0,5 M pH 5,0. Cada tubo foi agitado em vórtex durante 30 segundos e adicionado 2,5  $\mu\text{l}$  de água destilada nos testes e 7,5  $\mu\text{L}$  no tubo branco. Em cada um dos testes foi colocado 5  $\mu\text{L}$  de amostra para então serem incubados durante quatro horas com agitação a 37°C em incubadora a seco (Marconi MA-127).

Passado esse tempo, os tubos foram colocados em banho de gelo para parar a reação e logo foi adicionado 12,5  $\mu\text{L}$  de albumina 10% aquecida a 50°C. Foi adicionado em vórtex, tubo a tubo, 94  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético a 10% (TCA) para separação da fração ácida da enzima. As amostras foram

colocadas em banho de gelo durante cinco minutos e centrifugadas em temperatura de 4°C a 2000 rpm por dez minutos em centrífuga para eppendorf (Centrifuge 5417R with Rotor FA 45-30-11 - Eppendorf). Enquanto isso, foram preparados *vials* cilíndricos de 4 mL com 3 mL de líquido de cintilação (OptiPhase HiSafe II, LKB). Após serem centrifugados, foram retirados 100 µL do sobrenadante de cada amostra e transferido para os *vials* com OptiPhase, sem misturar. No *vial* do total, foi adicionado 120 µL de TCA. Os *vials* foram fechados e colocados dentro de frascos de vidro transparentes, para a titulação da radioatividade em cintilador β Perkin Elmer (Liquid Scintillation Analyzer Tri-Carb® 2800 TR) e os resultados expressos em nmol/h/mg de proteína.

#### 5.10.2. SPF

Assim como em leucócitos, a medida da atividade da ASM em SPF também é um método radioscópico, no qual é utilizado o substrato radioativo esfingomielina <sup>14</sup>C – 10 µCi/200 µl. A técnica foi realizada sempre em duplicata. Em primeiro lugar, 5 µL do substrato foi pipetado cuidadosamente dentro de tubos tipo eppendorff de 2 mL, segundo a tabela III.

Tabela III: Técnica miniaturizada para dosagem de ASM em leucócitos

	Teste	Branco	Total
Substrato	5 µl	5 µl	5 µl
Amostra	Picote 1,2 (0,9 µl)	Picote s/ sangue	-
Água destilada	30 µl	30 µl	-
Taurocolato/triton	10 µl	10 µl	-
Tampão acetato	10 µl	10 µl	-

Os tubos ficaram abertos em capela de exaustão durante 15 minutos, para evaporação do diluente volátil clorofórmio: metanol. Transcorrido esse tempo, o tubo com radioatividade total foi fechado para ser utilizado mais tarde. Nos demais, foi adicionado um picote de 1,2 mm de diâmetro de amostra em SPF em cada um dos tubos teste e um picote de mesmo diâmetro, porém sem sangue, no tubo branco. Logo, foram colocados 30  $\mu\text{L}$  de água destilada em cada tubo e adicionados 10  $\mu\text{L}$  de taurocolato de sódio com triton X100 em água destilada e mais 10  $\mu\text{L}$  de tampão acetato de sódio 2,5 M, pH 5,5. Cada tubo foi agitado em vórtex durante 30 segundos. As amostras foram incubadas durante 24 horas com agitação a 37°C em incubadora a seco.

Passado esse tempo, os tubos foram colocados em banho de gelo para parar a reação e logo foi adicionado 50  $\mu\text{L}$  de albumina 10% aquecida a 50°C. Foi adicionado em vórtex, tubo a tubo, 375  $\mu\text{L}$  de TCA. As amostras foram colocadas em banho de gelo durante cinco minutos e centrifugadas a 2000 rpm por dez minutos. Enquanto isso, foram preparados *vials* cilíndricos de 4 mL com 3 mL de líquido de cintilação. Após serem centrifugados, foram retirados 250  $\mu\text{L}$  do sobrenadante de cada amostra e transferido para os *vials* com líquido de cintilação, sem misturar. No *vial* do total, foi adicionado 250  $\mu\text{L}$  de TCA. Os *vials* foram fechados e colocados dentro de frascos de vidro transparentes, para a titulação da radioatividade em cintilador  $\beta$  e os resultados expressos em nmL/24h/mL.

#### **5.11. Medida da atividade da enzima beta-glicosidase (GBA)**

### 5.11.1. Leucócitos

A técnica utilizada para a medida da atividade enzimática da beta-glicosidase (GBA) foi miniaturizada por Goldim (2012) adaptada de Peters et al. (1976). Em uma placa fluorimétrica preta de 96 poços, foram colocados 5  $\mu$ L de amostra diluídos em 12,5  $\mu$ L de tampão citrato fosfato 0,54 M, pH 5.5. A estes, foi adicionado 25  $\mu$ L do substrato 4-metilumbeliferil  $\beta$ -D-glicosídeo 10 mmol/L (substrato) com 50 mmol/L de taurocolato de sódio em água destilada. A placa foi selada com adesivo de alumínio e incubada a 37°C durante uma hora com agitação em incubadora da placas a seco. Após esse período, a reação foi parada com 200  $\mu$ L de tampão glicina-NaOH 0,5 M, pH 10,5. A leitura da fluorescência foi realizada em leitor de placa a 365 e 450 nm.

### 5.11.2. SPF

A atividade da enzima GBA em SPF foi obtida de acordo com técnica miniaturizada por Goldim (2012), adaptada de Civallero et al. (2006). Um picote em Cartão Whatman 903 de 1,2 mm de diâmetro foi colocado em um dos poços de uma placa preta fluorimétrica de 96 poços e eluído em 20  $\mu$ L de tampão citrato fosfato 0,54 M, pH 5.5. Logo em seguida foram acrescentados 40  $\mu$ L do substrato 4-metilumbeliferil  $\beta$ -D-glicosídeo 10 mmol/L com taurodeoxicolato de sódio 50 mmol/L em água destilada. A placa foi selada com adesivo de alumínio e incubada a 37°C durante cinco horas, em incubadora de placas a seco com agitação. Para parar a reação foi usado 200  $\mu$ L de tampão glicina-NaOH 0,5 M etilenodiamina, pH 11,3. A leitura da fluorescência foi feita em leitor de placa a 365 e 450 nm.

## **5.12. Medida da atividade da enzima beta-galactosidase (GLB)**

### **5.12.1. Leucócitos**

Para a medida da atividade da beta-galactosidase (GLB) foi utilizada a técnica miniaturizada por Goldim (2012) adaptada de Suzuki e Suzuki (1970). Em uma placa fluorimétrica preta de 96 poços, foram colocados 10  $\mu\text{L}$  de amostra diluídos em 10  $\mu\text{L}$  de tampão de eluição NaCl 0,2 M e adicionado 20  $\mu\text{L}$  do substrato 4-Metilumbeliferil- $\beta$ -D-galactosídeo 1,33 mM. A placa foi selada com adesivo de alumínio e incubada a 37°C durante uma hora com agitação em incubadora das placas a seco. Após esse período, a reação foi parada com 200  $\mu\text{L}$  de tampão glicina-NaOH 0,5 M, pH 10,5. A leitura da fluorescência foi realizada com leitor de placa a 365 e 450 nm.

## **5.13. Medida da atividade da quitotriosidase (QT)**

### **5.13.1. Plasma**

A técnica para a medida da atividade enzimática da QT em plasma utilizada foi aquela descrita por Hollak e colaboradores (1994), mas com novos valores de referência e ponto de corte estabelecidos utilizando uma curva ROC com 100% de sensibilidade e especificidade. Toda técnica foi realizada em banho de gelo. As amostras de plasma dos três grupos estudados foram tratadas previamente com ácido cítrico 0,2 M (50  $\mu\text{L}$  de plasma e 5  $\mu\text{L}$  de ácido cítrico) e, após acidificadas, 2,5  $\mu\text{L}$  das mesmas foram colocados em placa preta de 96 poços e fundo reto, juntamente com 50  $\mu\text{L}$  do substrato 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-NN'-N"-triacetilquitotriosídeo 0,026 mM e 2,5  $\mu\text{L}$  de água

destilada. A placa foi selada com adesivo aluminizado e permaneceu a 37°C durante 15 minutos em incubadora da placas a seco com agitação. Depois disso, a reação foi interrompida com 200 µL de tampão glicina-NaOH 0,5 M (37,535 g de ácido amino acético e 12,5 g de NaOH 0,3 M dissolvidos em 800 mL de água destilada, pH 10,3). A leitura da fluorescência foi realizada em leitor de placas em comprimento de onda de 450 nm de emissão e 365 nm de excitação.

### **5.13.2. SPF**

A medida da atividade da enzima QT em SPF foi realizada de acordo com técnica miniaturizada por Goldim (2012), adaptada de Civallero et al. (2006). Um picote em Cartão Whatman 903 de 1,2 mm de diâmetro foi colocado em um dos poços de uma placa preta fluorimétrica de 96 poços e eluido em 15 µL de 0,25 M de tampão acetato de sódio, pH,5,5. Após, foi acrescentado 15 µL de 4-metilumbeliferil β-D-NN'-N"-triacetilquitotriosídeo, 0,19 mmol/L (substrato) em água destilada. A placa foi selada com adesivo de alumínio e incubada a 37°C durante 30 minutos com agitação em incubadora da placas a seco. Como tampão de parada da reação foi utilizado 200 µL de etilenodiamina 0,13 M, pH 11,3. A leitura da fluorescência foi feita em leitor de placa a 365 e 450 nm.

### **5.14. Descarte de materiais**

O material biológico foi descartado, conforme indicação da Secretaria de Gestão Ambiental da UFRGS, diretamente nos recipientes da Aborgama, localizados na parte externa do prédio do departamento de Bioquímica. O

transito do lixo biológico foi feito pelas escadas externas (área social) com o saco de lixo branco fechado adequadamente e luvas de borracha. Os demais reagentes foram descartados nos recipientes apropriados para substâncias aquosas sem solventes orgânicos, em local designado pela Secretaria de Gestão Ambiental, dentro do prédio.

#### **5.15. Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. A comparação entre os três grupos foi realizada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni quando o valor de F foi significativo ( $p < 0,05$ ). Quando foram comparados dois grupos entre si foi utilizado o teste  $t$  de Student para amostras independentes. Para todas as análises estatísticas realizadas, foi utilizado o programa GraphPad Prism5.

#### **5.16. Considerações éticas**

Esta pesquisa seguiu as condições estabelecidas na declaração de Helsinque e na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares em especial a 340/04. Foi categorizada no Grupo II (risco mínimo) – coleta de material do paciente.



## Capítulo II – Resultados

### 1. Visualização do colesterol nos fibroblastos de NPC, NPC variante e controles saudáveis:

Na figura 5 podemos observar uma imagem representativa de cada grupo analisado, após coloração do colesterol com corante filipin e visualização em microscópio de fluorescência. Como pode ser visto, indivíduos normais não apresentam fluorescência no citoplasma, indicando que não há acúmulo de colesterol (Figura 5A). Já indivíduos com NPC forma clássica, por apresentarem uma quantidade aumentada de colesterol no citoplasma, mostram uma intensa fluorescência (Figura 5C). Quando observamos o citoplasma de indivíduos com a forma variante, a fluorescência apresentada não é aquela observada na forma clássica (Figura 5B).

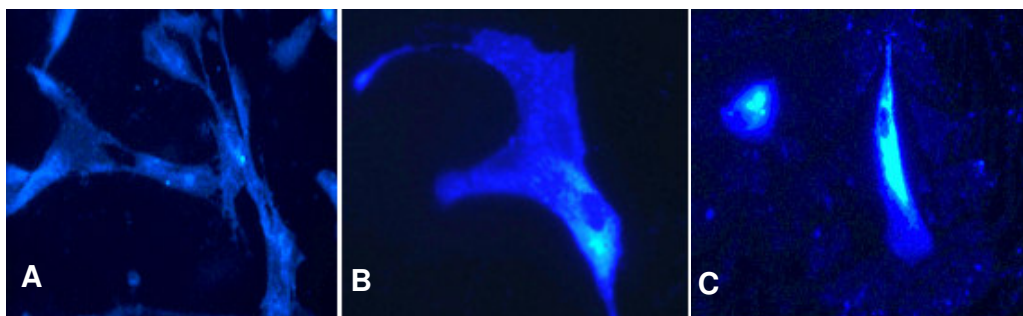


Figura 5: Imagens representativas dos grupos estudados. (A) Controles saudáveis (CS); (B) Niemann-Pick C com fenótipo variante (NPC var); (C) Niemann-Pick C com fenótipo Clássico (NPC cl).

## 2. Quantificação do colesterol observado ao microscópio – quantidade de pixels:

Foi possível quantificar a fluorescência do colesterol observado no teste de filipin nos três grupos estudados através da quantidade de pixels na imagem, utilizando o programa CellM Olympus. O aplicativo analisa a intensidade da fluorescência das células e faz uma média para cada imagem. A partir das médias obtidas para cada indivíduo, de cada grupo (Figura 6). Analizando os resultados com ANOVA de uma via verificou-se que CS é significativamente diferente de NPC cl e de NPC var e que ambos também são significativamente diferentes entre si ( $p < 0,0001$ ), onde a intensidade de fluorescência é bem mais pronunciada em NPC cl e intermediária em NPC var.

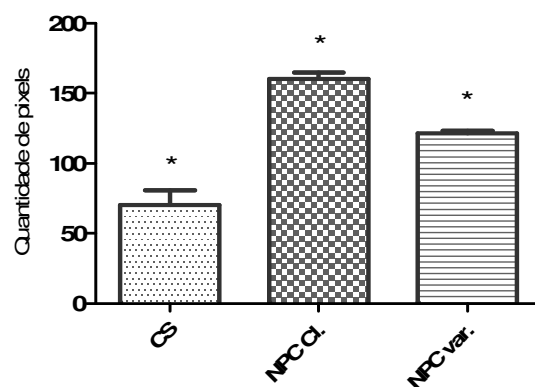


Figura 6: Intensidade da fluorescência do teste de filipin quantificada através dos pixels da imagem. \* Diferença significativa entre os três grupos, com  $p < 0,0001$ . Controles saudáveis (CS); Niemann-Pick C com fenótipo Clássico (NPC cl); Niemann-Pick C com fenótipo variante (NPC var). Análise realizada por ANOVA de uma via seguida de teste de Bonferroni. Média  $\pm$  desvio padrão.

### 3. Quantidade de colesterol intracelular observada pela dosagem de colesterol nos fibroblastos:

Com o ensaio para quantificação do colesterol intracelular, foi possível observar uma diferença significativa entre os grupos CS e NPC cl ( $p < 0,0001$ ) quando analisado com teste  $t$  (Figura 7A). Por tratar-se apenas de um indivíduo, NPC var está representado na figura 7 B com o objetivo de apenas demonstrar que o acúmulo de colesterol deste indivíduo e, possivelmente de outros com fenótipo variante, encontra-se em uma faixa intermediária.

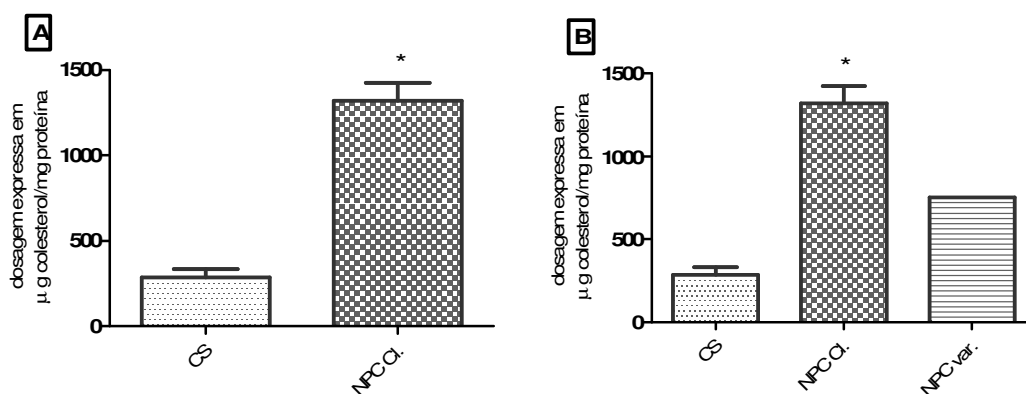


Figura 7: Quantidade de colesterol intracelular em fibroblastos em ensaio com o kit laboratorial Amplex® Red Cholesterol. A quantidade de colesterol observada em NPC cl apresenta-se significativamente diferente (\*) de CS, ( $p < 0,0001$ ). A: Controles saudáveis (CS); B: Niemann-Pick C com fenótipo Clássico (NPC cl); C: Niemann-Pick C com fenótipo variante (NPC var). Análise realizada por teste  $t$ . Média  $\pm$  desvio padrão.

### 4. Razão entre a quantidade de colesterol acumulada nos fibroblastos e a quantidade de pixels observada ao microscópio:

Ao analisar a razão entre o colesterol intracelular encontrado nos fibroblastos e a fluorescência do teste de filipin (quantificada em pixels), foi possível observar com a aplicação de teste  $t$ , que há diferença significativa entre CS e NPC cl ( $p < 0,0008$ ), sendo a razão para NPC cl maior do que CS

(Figuras 8 A). Na figura 8 B, o fenótipo NPC var está presente apenas para demonstrar que a razão entre o acúmulo de colesterol e a fluorescência no seu teste de filipin deste indivíduo e, possivelmente de outros com fenótipo variante, encontra-se em uma faixa intermediária.

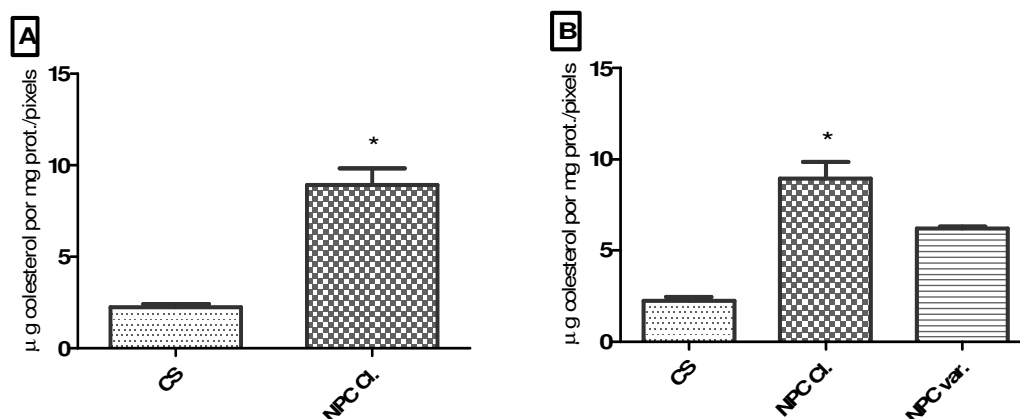


Figura 8: Razão entre a quantidade de colesterol acumulada nos fibroblastos e a quantidade de pixels observada ao microscópio. A razão observada entre NPC cl e CS apresenta uma diferença (\*) significativa ( $p < 0,0008$ ). Controles saudáveis (CS); Niemann-Pick C com fenótipo Clássico (NPC cl); Niemann-Pick C com fenótipo variante (NPC var). Análise realizada com teste *t*. Média  $\pm$  desvio padrão.

## 5. Comparação da atividade enzimática de ASM nos grupos estudados:

Quando a atividade da enzima ASM em leucócitos (Figuras 9 A e 9 B) e SPF (Figuras 10 A e 10 B) foi comparada entre os grupos CS, NPC cl e NPC var, não houve diferença significativa em nenhum dos materiais pela análise com teste *t*, ( $p < 0,583$  - leucócitos e  $p < 0,2148$  - SPF). Embora não tenha havido diferença estatisticamente significativa entre os grupos, pode ser observada pelas figuras uma atividade menor no grupo NPC cl nos dois materiais. Devido a falta de um número maior de indivíduos com fenótipo NPC var, o mesmo consta nas figuras 9 B e 10 B apenas de forma representativa.

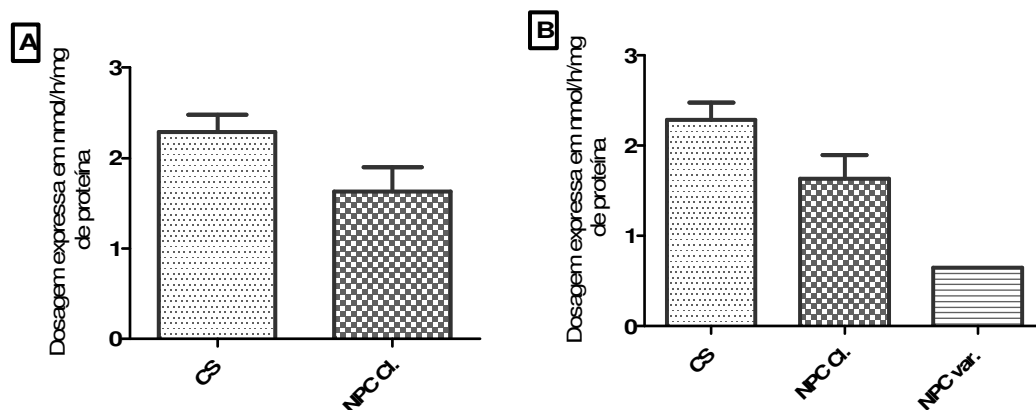


Figura 9: Atividade da enzima ASM em leucócitos: Não houve diferença significativa entre a atividade de ASM nos CS e NPC cl quando as mesmas foram analisadas pelo teste  $t$  ( $p < 0,583$ ). Controles saudáveis (CS); Niemann-Pick C com fenótipo Clássico (NPC cl); Niemann-Pick C com fenótipo variante (NPC var). Média  $\pm$  desvio padrão.

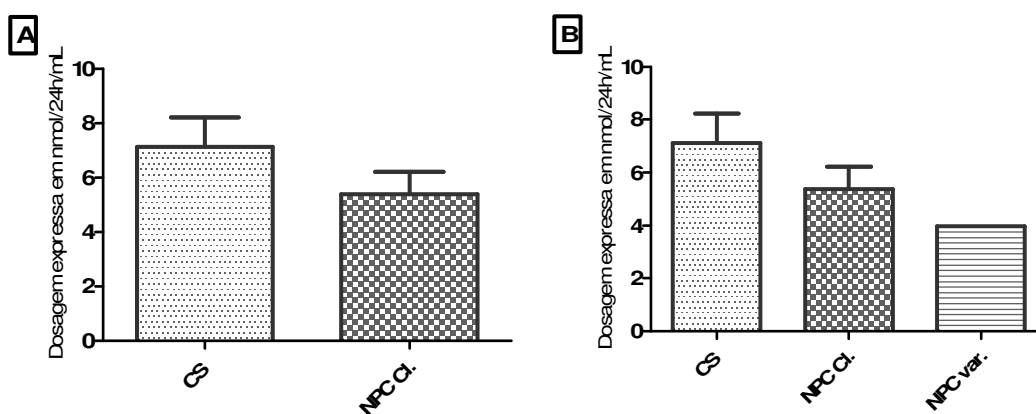


Figura 10: Atividade da enzima ASM em SPF: Não houve diferença significativa entre a atividade de ASM nos CS e NPC cl quando as mesmas foram analisadas pelo teste  $t$  ( $p < 0,2148$ ). Controles saudáveis (CS); Niemann-Pick C com fenótipo Clássico (NPC cl); Niemann-Pick C com fenótipo variante (NPC var). Média  $\pm$  desvio padrão.

## 6. Comparação da atividade enzimática de QT nos grupos estudados:

Analisando os valores obtidos na medida da atividade da enzima QT em plasma, foi possível verificar aplicando teste de Bonferroni, que não houve diferença significativa entre NPC cl e NPC var ( $p > 0,05$ ), mas houve diferença

entre os grupos CS e NPC cl e entre os grupos CS e NPC var ( $p < 0,05$ ) (Figura 11), ou seja, os dois grupos de pacientes NPC possuem uma atividade mais aumentada da QT em relação aos controles. Em SPF (Figuras 12 A e 12 B), manteve-se o mesmo padrão, isto é, os grupos NPC também possuem atividade aumentada da QT em relação ao grupo CS ( $p < 0,0251$  pelo teste  $t$ ). Como o número de amostras de indivíduos com fenótipo NPC var, era insuficiente para realização da análise estatística, o mesmo consta na figura 12 B apenas de forma representativa.

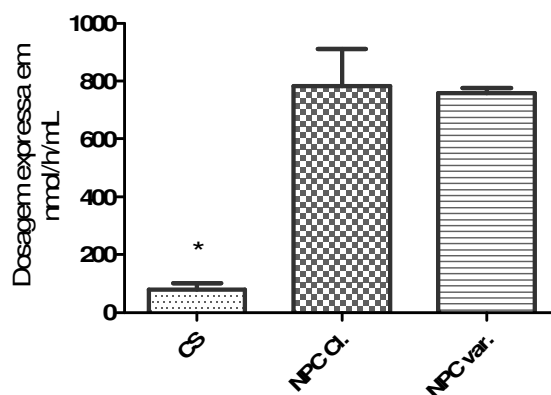


Figura 11: Atividade da enzima QT em plasma: Não houve diferença significativa entre os grupos NPC cl e NPC var ( $p > 0,05$ ), mas esta ocorreu (\*) entre os grupos CS e NPC cl e entre CS e NPC var ( $p < 0,05$ ). Controles saudáveis (CS); Niemann-Pick C com fenótipo Clássico (NPC cl); Niemann-Pick C com fenótipo variante (NPC var). Média  $\pm$  desvio padrão.

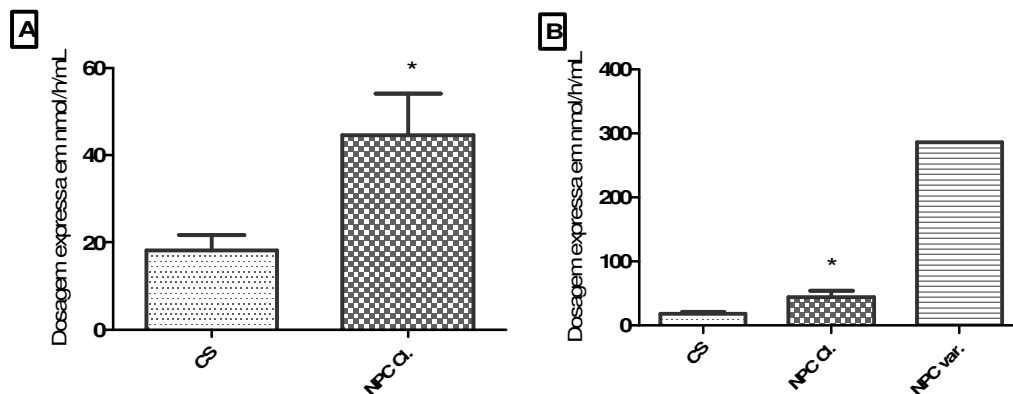


Figura 12: Atividade da enzima QT em SPF: Observou-se diferença significativa (\*) entre CS e NPC cl quando aplicado o teste  $t$  ( $p < 0,0251$ ). Controles saudáveis (CS); Niemann-Pick C com fenótipo Clássico (NPC cl); Niemann-Pick C com fenótipo variante (NPC var). Média  $\pm$  desvio padrão.

## 7. Comparação da atividade enzimática de GBA nos grupos estudados:

Quando a atividade da enzima GBA em leucócitos (Figuras 13 A e 13 B) foi comparada entre CS e NPC cl, não houve diferença significativa entre eles ( $p > 0,0799$ ), embora pela observação das figuras, a atividade da GBA no grupo NPC cl pareça maior do que aquela dos CS. Já na análise realizada em SPF (Figuras 14 A e 14 B), ocorreu diferença significativa entre estes dois grupos ( $p < 0,0251$ ). As análises foram realizadas com teste  $t$  devido ao número insuficiente de amostras de indivíduos com fenótipo NPC var. Este último grupo consta nas figuras 13 B e 14 B apenas de forma representativa.

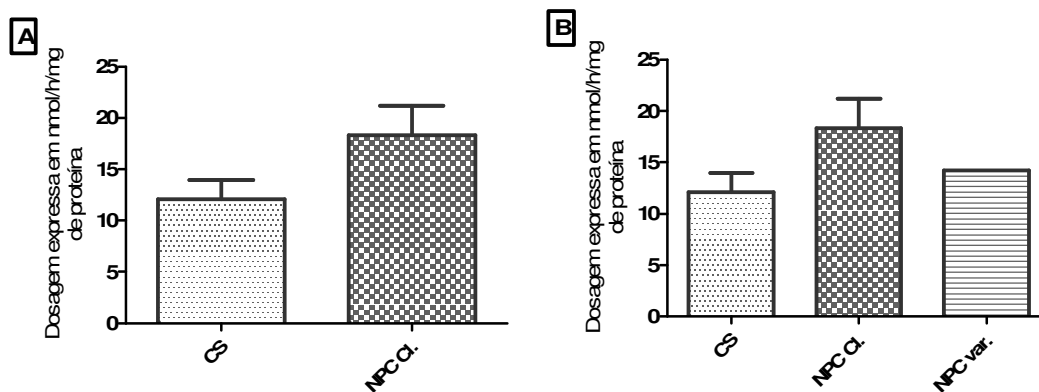


Figura 13: Atividade da enzima GBA em leucócitos: De acordo com a análise pelo teste *t*, não houve diferença significativa entre CS e NPC cl ( $p > 0,0799$ ). Controles saudáveis (CS); Niemann-Pick C com fenótipo Clássico (NPC cl); Niemann-Pick C com fenótipo variante (NPC var). Média  $\pm$  desvio padrão.

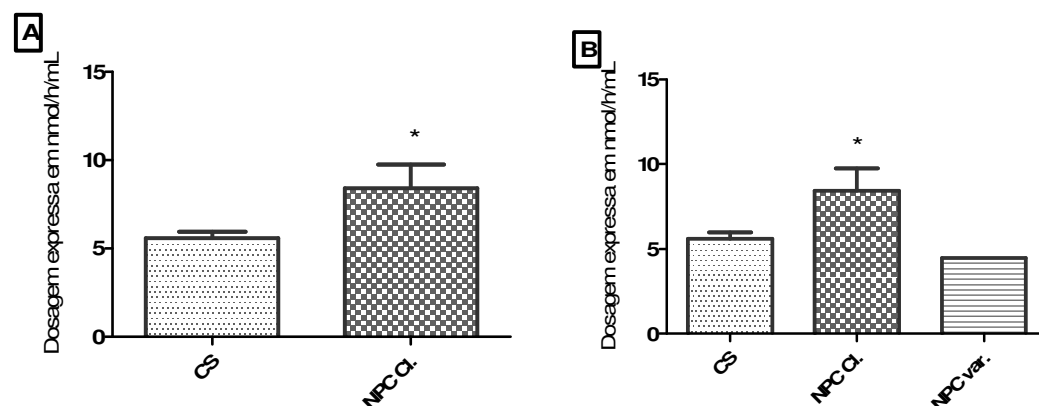


Figura 14: Atividade da enzima GBA em SPF: Foi observada diferença significativa (\*) de acordo com a análise pelo teste *t* entre CS e NPC cl ( $p < 0,0251$ ). Controles saudáveis (CS); Niemann-Pick C com fenótipo Clássico (NPC cl); Niemann-Pick C com fenótipo variante (NPC var). Média  $\pm$  desvio padrão.

## 8. Comparação da atividade enzimática de GLB nos grupos estudados:

De acordo com a análise da atividade da enzima GLB em leucócitos de indivíduos dos grupos CS e NPC cl utilizando o teste *t*, não foi observada diferença significativa entre esses grupos ( $p > 0,2092$ ), embora pela observação das figuras 15 A e 15 B a atividade do grupo experimental pareça maior que



aquela dos CS. Devido ao número insuficiente de amostras do grupo NPC var, este consta na figura 15 B apenas de forma representativa.

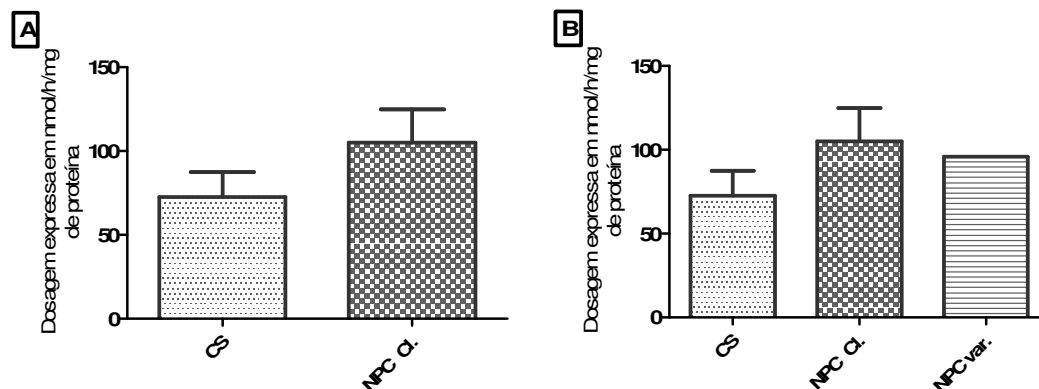


Figura 15: Atividade da enzima GLB em leucócitos: De acordo com o teste *t*, não houve diferença significativa entre CS e NPC cl ( $p > 0,2092$ ). Controles saudáveis (CS); Niemann-Pick C com fenótipo Clássico (NPC cl); Niemann-Pick C com fenótipo variante (NPC var). Média  $\pm$  desvio padrão.

### 9. Ponto de corte e valores de referência para ASM em leucócitos e SPF:

Foram estabelecidos novos valores de referência e ponto de corte, para a medida da atividade da ASM tanto em leucócitos quanto em SPF utilizando-se para isto uma curva ROC com 100% de especificidade e sensibilidade ( $p < 0,001$ ). Para tanto foram utilizados indivíduos saudáveis, como grupo controle, e pacientes com doença de Niemann-Pick tipo B (NPB), cuja atividade da ASM está naturalmente diminuída, como grupo de pacientes (tabela IV).

Tabela IV. Valores de referência estabelecidos para a medida da ASM em leucócitos e SPF:

	Leucócitos		SPF	
	n	Atividade enzimática (nmol/h/mg de proteína) *	n	Atividade enzimática (nmol/24h/mL) *
NPB	12	0 – 0,59 (0,37 ± 0,18 )	15	0,11 – 0,42 (0,24 ± 0,15)
CS	20	0,97 - 4,71 (2,5 ± 0,96)	20	2,37 - 28,3 (10,78 ± 7,83)
Ponto de Corte		0,78		1,39

\* variação (média ± desvio padrão)

## **Parte III**

### **Discussão**

Apesar da aparente alta sensibilidade e especificidade do teste de filipin para o diagnóstico da doença de Niemann-Pick tipo C sua aplicabilidade é limitada, por duas razões: primeiro, ele depende de fibroblastos cultivados que necessitam uma biópsia de pele; e segundo, ele é um teste totalmente subjetivo dependendo da interpretação do técnico que o está aplicando. Sendo assim, a busca por uma quantificação da fluorescência do colesterol acumulado torna-se muito importante.

Neste trabalho nós demonstramos que a quantificação da fluorescência do colesterol observado no teste de filipin nos três grupos estudados através da quantidade de pixels na imagem, é um método prático e não subjetivo. Esta técnica demonstrou que há uma diferença significativa entre o acúmulo de colesterol intracelular em CS, NPC cl e NPC var. O aplicativo analisa a intensidade da fluorescência das células e faz uma média para cada imagem. Os resultados obtidos com essa técnica estão de acordo com aqueles encontrados por Tängeremo et al. (2011), que utilizou o software DetecTiff<sup>®</sup> para suas análises, confirmando a eficácia do método para o esclarecimento de padrões duvidosos, ou seja, fluorescência menos pronunciada ao teste de filipin e aliou a esses padrões, os achados clínicos e bioquímicos de tais pacientes.

No ensaio para quantificação do colesterol intracelular em fibroblastos, foi possível observar uma diferença significativa entre os grupos CS e NPC cl. Por tratar-se apenas de um indivíduo, NPC var foi representado na figura com o objetivo de apenas demonstrar que o acúmulo de colesterol deste indivíduo

e, possivelmente de outros com fenótipo variante, encontra-se em uma faixa intermediária, indicando que, possivelmente, haveria diferença significativa se houvesse um “n” maior. Se isso for verdadeiro, a dosagem intracelular de colesterol poderia ser um bom parâmetro quantitativo para auxiliar no teste de filipin quando este apresentar padrão de fluorescência apenas moderado, uma vez que o indivíduo NPC var apresentou acúmulo intracelular de colesterol quatro vezes maior que a média dos CS (751,78 e 183,80 µg de colesterol/mg de proteína, respectivamente). A média de colesterol acumulado nos indivíduos NPC cl foi de 1318,91 µg de colesterol/mg de proteína, correspondendo a sete vezes a média da dosagem de CS e pouco menos que o dobro do colesterol acumulado nas células do NPC var. Tãmgemo et al. (2011) comparou a quantificação do colesterol livre em fibroblastos de pacientes NPC cl, var e CS observado na fluorescência do teste de filipin, através da análise automatizada de imagens, com a quantidade de colesterol intracelular contida em fibroblastos desses mesmos grupos verificada pelo kit bioquímico Amplex<sup>®</sup> Red (Molecular Probes). Neste estudo, a análise de imagens correspondeu estreitamente aos níveis celulares de colesterol livre quantificado bioquimicamente. Através dela, foi possível distinguir os fenótipos clássico e variante em fibroblastos NPC, mostrando níveis de colesterol moderadamente elevados no primeiro grupo e muito elevado no segundo, em comparação aos níveis encontrados no grupo CS, demonstrando que a análise automatizada da fluorescência do teste de filipin por um software adequado é capaz de quantificar de forma confiável os níveis de colesterol, o que sugere um teste potencial para apoiar o diagnóstico da doença de NPC a partir de células cultivadas. Os resultados encontrados em nosso trabalho estão de acordo com os dos autores anteriores, embora

utilizemos uma quantificação da fluorescência mais simples e de mais baixo custo.

Neste trabalho, foi possível obter imagens e quantificação do colesterol intracelular, por meio da quantificação dos pixels, somente de dois indivíduos NPC var. Ao contrário, o ensaio bioquímico por meio da coleta de fibroblastos para dosagem do colesterol foi possível apenas para um dos indivíduos, pois o volume de células do outro foi insuficiente para realização do mesmo. Por esse motivo, a razão colesterol/pixels deste indivíduo foi mostrada apenas para demonstrar que essa estaria em uma faixa intermediária entre CS e NPC cl. Possivelmente com um “n” maior, seria possível diferenciar os NPC var dos indivíduos NPC cl e principalmente daqueles indivíduos saudáveis, onde algum tipo de fluorescência pode ocorrer por interferência do acúmulo de outros lipídios, que não o colesterol, deixando dúvidas na simples observação da imagem obtida pelo teste de filipin.

A miniaturização das técnicas em leucócitos e SPF para ASM se mostraram eficientes e válidas. Com elas foi possível reduzir as reações enzimáticas em SPF a 50% do volume original e também diminuir o tamanho do picote de 3 mm para 1,2 mm podendo assim serem efetuados mais picotes por gota de sangue seco. As reações em leucócitos também se mostraram satisfatórias sendo reduzida a 25% do volume original com uma redução em reagentes e volume de amostra considerável, tornando o ensaio mais barato. A padronização de técnicas miniaturizadas para medida da atividade de enzimas chaves no diagnóstico de DLDs já tinha sido estabelecida por nosso grupo, embora para outras enzimas (Castilhos et al., 2011 e Goldim, 2012), e assim

como neste trabalho, foram estabelecidos valores de referência e ponto de corte diferentes daqueles das técnicas originais.

A maioria das enzimas analisadas neste estudo não apresentaram diferenças significativas entre CS e NPC.

A atividade da ASM não apresentou diferença significativa entre CS e NPC cl, embora, pela figura, possamos observar uma menor atividade nos grupos NPC. Os resultados encontrados por Vanier et al. (2010) mostraram que a ASM pode apresentar-se normal em leucócitos NPC, embora se apresente um pouco reduzida no ensaio em fibroblastos.

Analisando os valores obtidos na medida da atividade da enzima QT em plasma, foi possível verificar que não houve diferença significativa entre NPC cl e NPC var, mas houve diferença tanto entre CS e NPC cl quanto entre CS e NPC var. Em SPF, ocorreu diferença significativa entre CS e NPC cl. O número de amostras de indivíduos com fenótipo NPC var, era insuficiente, portanto, os valores encontrados para esses indivíduos constam na figura apenas de forma representativa. A grande variação nos valores encontrados em SPF se deve, provavelmente, ao fato desta técnica utilizar sangue total e não haver correção pelo cálculo da proteína contida na amostra, o que revela uma baixa sensibilidade e especificidade da mesma. O aumento significativo da atividade da QT em plasma, em pacientes NPC foi relatado em outros estudos, mas sem uma distinção entre os fenótipos clássico ou variante dos pacientes analisados (Wajner et al., 2004; Lo et al., 2010).

Quando a atividade da enzima GBA em leucócitos foi comparada entre CS e NPC cl, não houve diferença significativa. Talvez, aumentando-se o número amostral, poderíamos tê-la observado. Em SPF, esta diferença entre

os dois grupos, pôde ser observada. Devido ao número insuficiente de indivíduos com fenótipo NPC var, não foi possível fazermos uma comparação. Em Lo et al. (2010), foi relatado que a GBA pode apresentar atividade reduzida em NPC, embora não de forma tão drástica como na doença de Gaucher. Seus dados experimentais sugerem que a glicosilceramida está acumulada em pacientes NPC. A principal característica bioquímica de NPC é o acúmulo intracelular de lipídios. Em tecidos periféricos, o colesterol não esterificado predomina, mas no SNC, os glicoesfingolipídios desempenham papéis mais significativos e provavelmente chave nesta patogênese. Glucosilceramida, lactosilceramida, esfingosina, bis-monoacilglicerol fosfato e gangliosídios GM1 e GM2 estão presentes em excesso, no cérebro. Os glicoesfingolipídios, especialmente o glucocerebrosídeo, acumulam-se em células deficientes na proteína NPC1, na via endossomal-lisossômica. A forma precursora da glicocerebrosidase ocorre em níveis normais em fibroblastos de NPC, mas existe uma diminuição deste na proteína madura. Este padrão sugere uma degradação acelerada da glicocerebrosidase madura, ao invés da diminuição na sua produção, em contraste com o que ocorre na doença de Gaucher tipo I, onde a mutação no gene GBA1 provoca uma diminuição na produção de glicocerebrosidase (Salvioli et al., 2004). Mais indivíduos seriam necessários para que nós pudéssemos ter certeza da atividade da GBA em pacientes com NPC. Já em SPF, como a atividade enzimática não é intra, mas extracelular, talvez observemos o contrário dos leucócitos, como ocorre com pacientes com Mucopolidose, onde a atividade aumentada de várias hidrolases lisossômicas no plasma é resultado do extravasamento das mesmas do interior das células para este meio (Scriver et al., 2000).

Não foram observadas diferenças significativas na atividade da GLB entre os grupos CS e NPC cl, embora observe-se que os indivíduos com NPC possam apresentar uma atividade aumentada desta enzima. Mais uma vez, o número de amostras de indivíduos NPC var foi insuficiente e este consta na figura 15 apenas de forma representativa. Talvez um aumento no número amostral em todos os grupos auxilie e seja necessário. De acordo com Vanier (2010), o armazenamento de lipídios em pacientes NPC é mais pronunciado no baço do que no fígado, onde as alterações podem ser sutis. Os glicolipídios constituem os principais lipídios acumulados no cérebro por oposição ao desequilíbrio do colesterol, que é quantitativamente menor em neurônios. As alterações em glicoesfingolipídios ocorrem especialmente em gangliosídeos GM2 e GM3, que aparecem aumentados de 10 a 20 vezes, sendo que o aumento de GM2 ocorre muito mais cedo e é mais proeminente em NPC do que em outras doenças lisossômicas. Em estudos realizados por Lloyd-Evans e Platt (2010), onde ratos NPC1 foram cruzados com ratos geneticamente modificados para expressar deficiência de GalNAc-transferase de modo que não pudessem sintetizar GM2, GM1 ou outros gangliosídeos complexos, foi observado que o fenótipo apresentado na doença de NPC não foi afetado por essa manipulação. No entanto, os níveis de colesterol em neurônios que já não tinham GM1/GM2 foram reduzidos, indicando que o acúmulo de colesterol é dependente do acúmulo de gangliosídeos.

Pouco se sabe sobre a função da proteína NPC1 junto ao metabolismo da célula. Ela é a responsável pelo transporte de colesterol, mas se afeta a atividade/transporte de enzimas do metabolismo de outros glicoesfingolipídios ainda é uma incógnita. O que sabemos é que na NPC ocorre aumento destes



esfingolípídios e a atividade aumentada ou diminuída de suas enzimas de degradação e síntese poderia contribuir para este quadro.

## Conclusões

1. Através de ensaios bioquímicos qualitativos e quantitativos, foi possível desenvolver ferramentas capazes de auxiliar na confirmação para o diagnóstico da doença de Niemann-Pick C, quando um fenótipo apresentar característica indefinida/variante no teste de Filipin.
2. Com a quantificação do número de pixels, observados no padrão de fluorescência perinuclear apresentado no teste de filipin, verificamos que indivíduos saudáveis têm significativamente menos colesterol acumulado do que indivíduos com NPC clássico e NPC variante. Este último grupo apresentou menos colesterol que o grupo NPC clássico.
3. Também foi possível constatar que a quantidade de colesterol citoplasmático acumulada em fibroblastos dos dois grupos NPC comparados entre si e entre indivíduos saudáveis foi significativamente maior nos indivíduos NPC. No caso dos indivíduos NPC variantes, estes apresentam uma quantidade de colesterol um pouco menor do que os NPC com fenótipo clássico, mas claramente mais elevado do que os indivíduos saudáveis.
4. Foram estabelecidos novos valores de referência e pontos de corte para a atividade da enzima esfingomielinase tanto de leucócitos quanto em SPF para a técnica miniaturizada.

5. A atividade da enzima esfingomielinase tanto em leucócitos quanto em sangue impregnado em papel filtro não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudados.
  
6. Com os valores obtidos para a medida da atividade da enzima quitotriosidase em plasma e em sangue impregnado em papel filtro, verificamos que não houve diferença significativa entre os dois grupos NPC, mas houve diferença entre estes e os indivíduos saudáveis, ou seja, os indivíduos afetados tanto com o fenótipo clássico quanto com o variante possuem uma atividade aumentada desta enzima.
  
7. A atividade da enzima  $\beta$ -glicosidase em leucócitos não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudados, embora sua atividade tenha sido significativamente mais alta em sangue impregnado em papel filtro de pacientes com NPC.
  
8. A análise em leucócitos da atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase não apresentou diferenças entre os grupos estudados.

## **Perspectivas**

Temos como perspectivas deste trabalho aumentar o número de indivíduos em cada um dos grupos estudados e realizar a medida de outras hidrolases lisossômicas como a hexosaminidase A, responsável pela degradação do gangliosídeo GM2.

Pretendemos estender a pesquisa de todas as enzimas estudadas à fibroblastos de pacientes com NPC clássico e variante. Não foi possível realizar isto no presente trabalho, por falta de material destes indivíduos.

Além disso, pretendemos também, fazer a análise molecular das mutações dos pacientes NPC clássico e variante, relacionando-as com o acúmulo de colesterol observado e quantificado pelas imagens obtidas no teste de filipin e a dosagem de colesterol intracelular, associando esses achados com a idade do paciente, sexo e severidade dos sintomas.

## Referências

- Ahmad I; Hunter RE; Flax, JD. Neural stem cell implantation extends life in Niemann-Pick C1 mice. **Journal of applied genetics**, 48 (3): 269–72. 2007.
- Ahmad, I; Lope-Piedrafita, S; Bi, X; et al. Allopregnanolone treatment, both as a single injection or repetitively, delays demyelination and enhances survival of Niemann-Pick C mice. **Journal of neuroscience research**, 82 (6): 811–21. 2005.
- Ballabio, A. Disease pathogenesis explained by basic science: lysosomal storage diseases as autophagocytic disorders. **Int J Clin Pharmacol Ther**, 47: 34-38; 2009.
- Beheregaray, AP; Souza, FT; Coelho, JC. Effect of a peroxysomal proliferators agent on intracellular cholesterol accumulation in cultured fibroblasts from Niemann-Pick type C disease patients. **Clin. Chim. Acta**, 336:137-142, 2003.
- Castilhos, CD; Mezzalira, J; Goldim, MP; et al. Effect of sample collection, temperature and time of storage on  $\beta$ -galactosidase and total hexosaminidase activities in dried blood collected on filter paper. **Clin Chem Lab Med**. Aug; 49(8):1299-302. Epub 2011 May 17.
- Civallero, G; Michelin, K; de Mari, J; et al. Twelve different enzyme assays on dried-blood filter paper samples for detection of patients with selected inherited lysosomal storage diseases. **Clinica chimica acta**; international journal of clinical chemistry 372: 98-102. 2006.
- Coelho, JC and Giugliani, R. Fibroblasts of skin fragments as a tool for the investigation of genetic diseases: technical recommendations. **Genetics and Molecular Biology**, 23, 2, 269-271, 2000.

- Gilbert, DF; Meinhof, T; Pepperkok, R; et al. DetecTiff: a novel image analysis routine for high-content screening microscopy. **J. Biomol. Screen**, 14: 944 – 95. 2009.
- Goldim, MPS. and Coelho, JC. Validação das técnicas fluorimétricas para estabelecimento da atividade específica da beta-glicosidase e quitotriosidase de sangue heparinizado em papel filtro para o diagnóstico da doença de Gaucher. **Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica**. 2012.
- Hollak, CE; van Weely, S; van Oers, MH; et al. Marked Elevation of Plasma Chitotriosidase Activity A Novel Hallmark of Gaucher Disease. **J. Clin. Invest**, 93: 1288-1292, 1994. <http://www.ojrd.com/content/5/1/16>
- Imrie, J; Dasgupta, S; Besley, GT; et al. The natural history of Niemann-Pick disease type C in the UK. **J Inherit Metab Dis**, 30:51-59. 2007.
- Infante, RE; Wang, ML; Radhakrishnan, A; et al. NPC2 facilitates bidirectional transfer of cholesterol between NPC1 and lipid bilayers, a step in cholesterol egress from lysosomes. **Proc Natl Acad Sci USA**, 105:15287-15292. 2008.
- Kruth, H; Comly, ME; Butler, JD; et al. Type C Niemann-Pick Disease: Abnormal metabolism of low density lipoprotein in homozygous and heterozygous fibroblasts. **The Journal of Biological Chemistry**, 261:16769-16774, 1986.
- Kwon, HJ; Abi-Mosleh, L; Wang, ML; et al. Structure of N-terminal domain of NPC1 reveals distinct subdomains for binding and transfer of cholesterol. **Cell**, 137:1213-1224. 2009.
- Liscum, L. and Sturley, SL. Intracellular trafficking of Niemann-Pick C proteins 1 and 2: obligate components of subcellular lipid transport. **Biochim Biophys Acta**, 1685: 22–27. 2004.

- Lloyd-Evans, E. and Platt, FM. Lipids on Trial: The Search for the Offending Metabolite in Niemann-Pick type C Disease. **Traffic**, 11:419-428. 2010.
- Lo, SM; McNamara, J; Seashore, MR; et al. Misdiagnosis of Niemann-Pick disease type C as Gaucher disease. **Journal of inherited metabolic disease**. 2010.
- Lowry, OH; Rosebrough, NJ; Farr, AL; et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, 193:265-275, 1951.
- Macías-Vidal, JL; Rodríguez-Pascau, G; Sánchez-Ollé, M; et al. The Spanish NPC Working Group. Molecular analysis of 30 Niemann-Pick type C patients from Spain. **Clin. Genet**. 2010. In press.
- Marsden, D. and Levy, H. Newborn Screening of Lysosomal Storage Disorders **Clinical Chemistry**, 56: 1071–1079. 2010.
- McGovern, MM. and Schuchman, EH. Acid Sphingomyelinase Deficiency. In: Pagon, RA; Bird, TD; Dolan, CR; et al editors. **GeneReviews**<sup>TM</sup> [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-.2006 Dec 07 [updated 2009 Jun 25].
- Mukherjee, S. and Maxfield, FR. Lipid and cholesterol trafficking in NPC. **Biochim Biophys Acta**, 1685: 28–37, 2004.
- Müller, KB; Rodrigues, MDB; Pereira, VG; et al. Reference values for lysosomal enzymes activities using dried blood spots samples - a Brazilian experience. **Diagnostic Pathology**, 5:65. 2010.  
<http://www.diagnosticpathology.org/content/5/1/65>

- Nakamura, K; Hattori, K; Endo, F. Newborn Screening for Lysosomal **Storage Disorders American Journal of Medical Genetics Part C** (Seminars in Medical Genetics), 157:63–71. 2011.
- Patterson, MC; Vecchio, D; Prady, H; et al. Miglustat for treatment of Niemann-Pick C disease: a randomised controlled study. **The Lancet Neurolog**, v.6, n.9, p.765-772. 2007.
- Patterson, MC; Vanier, MT; Suzuki, K; et al. Niemann-Pick disease type C: a lipid trafficking disorder. In: Scriver C.S. et al (eds). **The molecular and molecular basis of inherited disease**. 8a. ed. New York: Mc Graw Hill, p. 3611-33. 2001.
- Peters, SP; Coyle, P; Glew, RH. Differentiation of beta-glucocerebrosidase from beta-glucosidase in human tissues using sodium taurocholate. **Arch Biochem Biophys**, 175: 569-571; 1976.
- Reuser, AJ; Verheijen, FW; Bali, D; et al. The use of dried blood spot samples in the diagnosis of lysosomal storage disorders - Current status and perspectives. **Molecular genetics and metabolism**, 104: 144-8. 2011.
- Roff, CF; Goldin, E; Comly, ME; et al. Niemann-Pick Type C Disease: Deficient intracellular transport of exogenously derived cholesterol. **Am J Med Genet**, 42:593, 1992.
- Salvioli, R; Scarpa, S; Ciaffoni, F; et al. Glucosylceramidase mass and subcellular localization are modulated by cholesterol in Niemann-Pick disease type C. **J Biol Chem**, 279(17):17674–17680. 2004.
- Sanderson, S; Green, A; Preece, MA; et al. The incidence of inherited metabolic disorders in the West Midlands, UK. **Arch Dis Child**, 91:896–899. 2006.



- Santos, ML; Raskin, S; Telles, DS; et al. Treatment of a child diagnosed with Niemann-Pick disease type C with miglustat: A case report in Brazil . **Journal of inherited metabolic disease**. 2008.
- Saudubray, JM. and Charpentier, C. Clinical phenotypes: Diagnosis/Algorithms. In: Scriver, CR; Beaudet, AL; Sly, W; et al. **The metabolic and molecular bases of inherited disease**, 7th edition. McGraw-Hill. 1995.
- Schuchman, EH. The pathogenesis and treatment of acid sphingomyelinase-deficient Niemann-Pick disease. **J. Inherit. Metab. Dis**, 30: 654-663. 2007.
- Scriver, CR. Garrod's Croonian Lectures (1908) and the charter Inborn Errors of Metabolism: Albinism, alkaptonuria, cystinuria, and pentosuria at age 100 in 200. **J Inherit Metab Dis**, 31:580–598. 2008.
- Scriver, CR; Scriver, C; Beaudet, AL; et al. **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**, 4 Volume Set. McGraw-Hill. 2000.
- Skoog, WA. and Beck, WS. Studies on the fibrinogen, dextran and phytohemagglutinin methods of isolating leukocytes. **Blood**, 11: 436-454; 1956.
- Spiegelman, JI; Mindrinos, MN; Oefner, PJ. High-accuracy DNA sequence variation screening by DHPLC. **Biotechniques**, 29: (5):1084-92, 2000.
- Storch, J. and Xu, Z. Niemann-Pick C2 (NPC2) and intracellular cholesterol trafficking. **Biochim Biophys Acta**, 1791:671-678. 2009.
- Sun, X; Marks, DL; Park, WD; et al. Niemann-Pick C variant detection by altered sphingolipid trafficking and correlation with mutations within a specific domain of NPC1. **Am. J. Hum. Genet**, 68:1361–1372, 2001.

- Tängemo, C; Weber, D; Theiss, S; et al. Niemann-Pick Type C disease: characterizing lipid levels in patients with variant lysosomal cholesterol storage. **J Lipid Res**, Apr;52(4):813-25. 2011.
- Vance, JE; Hayashi, H; Karten, B. Cholesterol homeostasis in neurons and glial cells. **Semin Cell Dev Biol**, 16:193-212. 2005.
- Vanier, MT. Niemann-Pick disease type C. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, 5:16. 2010.
- Wajner, A; Michelin, K; Burin, MG; et al. Biochemical characterization of chitotriosidase enzyme: comparison between normal individuals and patients with Gaucher and with Niemann-Pick diseases. **Clinical biochemistry**, 37: 893-7. 2004.
- Wang, RY; Bodamer, OA; Watson, MS; et al. Lysosomal storage diseases: Diagnostic confirmation and management of presymptomatic individuals. **Genetics IN Medicine**. Volume 13, Number 5, May 2011.

**ANEXOS**

**Lista de tabelas**

Tabela I: Curva padrão para dosagem de colesterol em fibroblastos..... 23

Tabela II: Técnica miniaturizada para dosagem de ASM em leucócitos..... 25

Tabela III: Técnica miniaturizada para dosagem de ASM em leucócitos..... 26

Tabela IV: Valores de referência estabelecidos para a medida da ASM em leucócitos e SPF..... 41

## Lista de figuras

Figura 1: Modelo esquemático representando o acúmulo lisossômico em NPA/NPB devido à deficiência na atividade de ASM.....	4
Figura 2: Modelo esquemático da via de transporte de colesterol lisossômico utilizando as proteínas NPC1 e NPC2.....	8
Figura 3: (A) Biópsia de pele fragmentada em pequenos explantes; (B) Frasco de cultura contendo os explantes e meio de cultura, pronto para ser incubado; (C) Cultura de fibroblastos confluentes.....	19
Figura 4: (A) Placa de 24 poços usada para a técnica miniaturizada do teste de filipin; (B) Teste de filipin de paciente com fenótipo clássico de NPC.....	22
Figura 5: Imagens representativas dos grupos estudados.....	32
Figura 6: Intensidade da fluorescência do teste de filipin quantificada através dos pixels da imagem.....	33
Figura 7: Quantidade de colesterol intracelular em fibroblastos em ensaio com o kit laboratorial Amplex <sup>®</sup> Red Cholesterol.....	34
Figura 8: Razão entre a quantidade de colesterol acumulada nos fibroblastos e a quantidade de pixels observada ao microscópio.....	35
Figura 9: Atividade da enzima ASM em leucócitos .....	36
Figura 10: Atividade da enzima ASM em SPF .....	36
Figura 11: Atividade da enzima QT em plasma .....	37
Figura 12: Atividade da enzima QT em SPF.....	38

Figura 13: Atividade da enzima GBA em leucócitos .....	39
Figura 14: Atividade da enzima GBA em SPF .....	39
Figura 15: Atividade da enzima GLB em leucócitos.....	40

**Apêndice A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Voluntário Nº. \_\_\_\_\_

**Título da pesquisa: Doença de Niemann-Pick tipo C: caracterização bioquímica do fenótipo clássico e sua comparação com o fenótipo variante**

Você está sendo convidado a participar do trabalho cujo objetivo é desenvolver técnicas laboratoriais que auxiliem no diagnóstico de doenças lisossômicas de depósito, dentro do projeto “Doença de Niemann-Pick tipo C: caracterização bioquímica do fenótipo clássico e sua comparação com o fenótipo variante”.

Está sendo solicitada a doação de um fragmento de pele de antebraço (biópsia) e 10ml de sangue heparinizado. Os dados advindos com a sua doação são de importância científica relevante para o estabelecimento de novas formas de diagnóstico na área de doenças lisossômicas de depósito. O material utilizado apenas para fins do projeto de pesquisa, sendo garantida a confidencialidade das informações obtidas, sendo reservado ao doador acesso às mesmas.

Pelo presente, declaro que fui devidamente informado sobre o projeto de pesquisa, de forma clara e detalhada, da liberdade de não participar do estudo e tive minhas dúvidas esclarecidas.

Data: \_\_\_\_\_

Indivíduo: \_\_\_\_\_

**Assinatura do Pesquisador:** \_\_\_\_\_

Nome do pesquisador para contato: Dra. Janice Carneiro Coelho  
Telefone: (51) 33085549  
Contato: MSc. Carla Vieira Andrade  
Telefone: (51) 99089099

## Apêndice B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Voluntário Nº. \_\_\_\_\_

### **Título da pesquisa: Doença de Niemann-Pick tipo C: caracterização bioquímica do fenótipo clássico esua comparação com o fenótipo variante**

Vimos por meio desta, convidá-lo a participar de uma pesquisa que estamos realizando no Laboratório de Doenças Lisossômicas de Depósito do Departamento de Bioquímica da UFRGS. O objetivo desta pesquisa é comparar os valores enzimáticos em fibroblastos plasma e leucócitos de indivíduos saudáveis com aqueles encontrados em fibroblastos e leucócitos de pacientes com fenótipo clássico e variante da doença de Niemann-Pick C. As análises serão realizadas no Laboratório de Doenças Lisossômicas de Depósito do Departamento de Bioquímica da UFRGS.

**Justificativa:** O teste de Filipin é considerado padrão-ouro para o diagnóstico de NPC, mas trata-se de uma análise subjetiva. Fenótipos variantes para NPC um padrão de fluorescência não compatível com o padrão clássico, o que pode gerar resultados falso-negativos. Nestes casos, outros ensaios bioquímicos e/ou moleculares são necessários para auxiliar na confirmação do diagnóstico. A atividade de enzimas em plasma e leucócitos, assim como a dosagem de colesterol em fibroblastos são testes quantitativos, que, associados ao teste de Filipin, podem permitir que se chegue com mais segurança ao resultado final.

**Procedimentos a serem utilizados:** A realização deste trabalho será através da coleta de amostras de 9ml de sangue periférico. Do material obtido serão separados plasma e leucócitos que, depois de realizadas as dosagens enzimáticas, serão descartados. Para a coleta de sangue, o Sr.(a) sentirá um leve desconforto com a punção, com possibilidade de um leve hematoma (mancha roxa).

**Confidencialidade:** Os seus dados serão utilizados de uma forma anônima e a divulgação dos resultados será no meio científico.

Portanto, fui informado dos objetivos da pesquisa acima, de maneira clara e detalhada. Recebi informações a respeito da coleta a ser feita e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim eu o desejar. O pesquisador certificou-me que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais e terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa, em face destas informações. Declaro, outrossim, que recebi cópia deste termo, de que todos os dados sobre a minha pessoa serão confidenciais e mantidos em sigilo.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do voluntário

\_\_\_\_\_  
Nome

\_\_\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador

\_\_\_\_\_  
Nome

\_\_\_\_\_  
Data

Nome do pesquisador para contato: Dra. Janice Carneiro Coelho

Telefone: (51) 33085549

Contato: MSc. Carla Vieira Andrade

Telefone: (51) 99089099