

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

**NÍVEIS DE FATORES INFLAMATÓRIOS E OXIDATIVOS  
EM PACIENTES COM DOENÇA DE GAUCHER**

**CRISTINA DA SILVA GARCIA**

Orientadora

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

Porto Alegre

2015

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

**NÍVEIS DE FATORES INFLAMATÓRIOS E OXIDATIVOS  
EM PACIENTES COM DOENÇA DE GAUCHER**

**CRISTINA DA SILVA GARCIA**

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

## CIP - Catalogação na Publicação

Garcia, Cristina da Silva  
Níveis de fatores inflamatórios e oxidativos em  
pacientes com doença de Gaucher. / Cristina da Silva  
Garcia. -- 2015.  
104 f.

Orientador: Janice Carneiro Coelho.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Doença de Gaucher. 2. Citocinas. 3.  
Interleucinas. 4. Proteína S100B. 5. Fator de Necrose  
Tumoral -alfa. I. Coelho, Janice Carneiro, orient.  
II. Título.

“Paciência, persistência e transpiração fazem  
uma combinação imbatível para o sucesso.”  
(Napoleon Hill)

## AGRADECIMENTOS

**Tenho muito a agradecer a todas as pessoas que trilharam comigo esse caminho...**

**Aos** meus pais, Lionir Garcia Pereira e Erita da Silva Garcia (*in memoriam*), pelo amor e apoio incondicional, pois sempre me incentivaram aos estudos, me ensinaram a ter caráter e, sobretudo, nunca desistir diante das dificuldades. Tenho certeza que os meus pais são a base de tudo em minha vida.

**À** minha irmã Letícia S. Garcia, pelo amor, amizade e pelo exemplo de determinação, pois foi sempre me espelhando nela que trilhei meu caminho. Muito obrigada pela paciência e por estar sempre ao meu lado me fazendo ver e viver a vida de uma forma muito mais bonita.

**À** Janice Coelho, minha orientadora, por todos os anos de orientação e convivência desde a época de iniciação científica. Agradeço principalmente por toda confiança depositada em mim, ao incentivo à pesquisa e aos ensinamentos durante esses anos.

**À** Jaine Santin, minha bolsista de iniciação científica, por sua dedicação, lealdade e competência que foram fundamentais para o sucesso desse trabalho. Agradeço também pela amizade cultivada durante o tempo em que trabalhamos juntas.

**Ao** pessoal que ao longo desses anos passaram pelo Laboratório de Doenças Lisossômicas de Depósito – lab 25, pelas discussões e trocas de

conhecimento, em especial a Mariana Goldim, pelo apoio e ensinamentos que muito auxiliaram.

**Aos** colaboradores que foram de suma importância para realização desse trabalho Alexandre Mello, Gilson Dorneles do IPA.

**À** Prof. Vera Trindade e colegas do laboratório 25, pela amizade, convívio e por estarem sempre dispostos a ajudar.

**Aos** membros da banca, Dr. Clovis Wannmacher, Dra. Carmem Vargas e Dr. Jarbas de Oliveira, por aceitarem o convite para avaliação desse trabalho.

**Ao** Serviço de Hemoterapia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, à Associação Catarinense de Pacientes e Amigos de Gaucher (ACPAG), médicos e outros profissionais da saúde pela colaboração e fornecimento de amostras utilizadas no presente estudo. Em especial aos pacientes Gaucher, que acreditaram e aceitaram participar dessa pesquisa.

**À** minha tia, Anita da Silva, por todas as conversas e conselhos durante todos esses anos. Agradeço também os lanches gostosos que ela me enviava.

**Às** colegas-amigas (Luciana, Fernanda, Viviane, Graziela) que fizeram parte da minha formação e que vão continuar presentes em minha vida.

**Aos** meus amigos e familiares, pelos momentos de descontração e pela compreensão nos meus momentos de ausência.

**Ao** Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, ao Departamento de Bioquímica e a Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela estrutura e excelência no ensino e pesquisa.

**À** Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

## Sumário

RESUMO.....	1
Palavras-chave: .....	1
LISTA DE ABREVIACÕES.....	2
INTRODUÇÃO .....	4
Erros Inatos do Metabolismo .....	4
Doenças Lisossômicas de Depósito.....	6
Doença de Gaucher .....	7
Diagnóstico .....	10
Tratamento.....	11
Biomarcadores .....	12
Quitotriosidase .....	13
Citocinas.....	14
Proteína S100B.....	17
Estresse Oxidativo.....	18
OBJETIVOS.....	22
Objetivo Geral.....	22
Objetivos Específicos.....	22
MATERIAL E MÉTODOS E RESULTADOS.....	25
Capítulo 1.....	26
Citocinas na Doença de Gaucher tipo I: comparação com pacientes em tratamento por reposição enzimática .....	26
Capítulo 2.....	45
Oxidative stress parameters of Gaucher disease type I patients.....	45
Capítulo 3.....	70
Resultados adicionais: Correlação entre a medida da atividade da Quitotriosidase e a Interleucina 6.....	70
DISCUSSÃO.....	77
CONCLUSÃO.....	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	93

## RESUMO

A Doença de Gaucher (DG) é a doença lisossômica de depósito mais frequente, sendo causada pela deficiência da atividade da enzima  $\beta$ -glicosidase ácida (GBA), que é responsável pela degradação de glicosilceramidas nos lisossomos. Seu déficit resulta no acúmulo intracelular de glicosilceramidas formando as chamadas Células de Gaucher. A DG é dividida em três grupos baseada na ausência (tipo 1) ou presença e gravidade de envolvimento do sistema nervoso central (tipo 2 e 3). A demonstração da deficiência da atividade da GBA é considerada o método padrão ouro para o diagnóstico, sendo complementada pela medida da atividade da enzima quitotriosidase (QT), que é considerada um biomarcador para a DG. Embora a função exata das células de Gaucher ainda permaneça desconhecida, acredita-se que elas secretam fatores que induzem resposta inflamatória e a produção de espécies reativas. Sabe-se que a instituição do tratamento por reposição enzimática (TRE) diminui significativamente a atividade da QT, porém essa diminuição não chega até os níveis de normalidade. A deficiência da GBA na DG também induz uma cascata de eventos, culminando secundariamente na produção de espécies reativas. Visto isso, o objetivo deste trabalho foi mensurar os níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-17a), proteína S100B em pacientes com DG com e sem tratamento por reposição enzimática e relacioná-los com a atividade da QT, e também, determinar o nível de alguns marcadores de dano oxidativo como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conteúdo de carbonilas, atividade da catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) e mensurar o conteúdo total de sulfidrilas (SH), marcadores da defesa antioxidante, visando um método auxiliar para o diagnóstico e acompanhamento do tratamento destes pacientes.

Observamos que os níveis de IL-6 em pacientes DG sem tratamento foi duas vezes maior do que os encontrados nos indivíduos saudáveis e que a instituição do TRE provoca uma diminuição significativa nos níveis de IL-6 no soro dos pacientes. Também foi observada uma correlação positiva entre os níveis de IL-6 e a atividade da QT, ou seja, quanto maior a atividade da QT, maior os níveis de IL-6 no soro de pacientes em tratamento. Já as outras citocinas pró-inflamatórias mensuradas, TNF- $\alpha$  e IL-17a, não apresentaram diferença significativa entre os indivíduos saudáveis e os pacientes Gaucher, bem como a medida da proteína S100B. Nos fatores oxidativos observamos alterações na CAT, SOD e sulfidrilas, o que sugere que pacientes DG sofrem mudanças na produção de espécies reativas quando comparados aos indivíduos normais. Este aumento na CAT, SOD e sulfidrilas poderia estar relacionado com a prevenção do aumento do peróxido de hidrogênio e a prevenção de danos lipídicos. No entanto, os outros três parâmetros (TBARS, carbonila e relação SOD / CAT) não demonstraram uma diferença significativa entre os grupos. Com isso, concluímos que a IL-6 mostrou-se a melhor ferramenta a ser utilizada juntamente com a QT para auxiliar no diagnóstico e acompanhamento do tratamento de pacientes DG.

**Palavras-chave:** Doença de Gaucher; Citocinas; S100B; Interleucina 6, Interleucina 17a; Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$ .



## LISTA DE ABREVIações

**DG:** doença de Gaucher

**DLD:** doença lisossômica de depósito

**ECA:** enzima conversora de angiotensina

**EIM:** erros inatos do metabolismo

**EO:** estresse oxidativo

**ERO:** espécie reativa de oxigênio

**GBA:**  $\beta$ -glicosidase ácida

**GM-CSF:** fator de estimulação de colônia de granulócitos e macrófagos

**IL-1:** interleucina 1

**IL-2:** interleucina 2

**IL-6:** interleucina 6

**IL-8:** interleucina 8

**IL-10:** interleucina 10

**IL-17a:** interleucina 17a

**QT:** quitotriosidase

**RL:** radical livre

**SPF:** sangue impregnado em papel filtro

**TNF- $\alpha$ :** fator de necrose tumoral alfa

**TRAP:** fosfatase ácida tartarato-resistente

**TRE:** terapia de reposição enzimática

## **INTRODUÇÃO**

## INTRODUÇÃO

### Erros Inatos do Metabolismo

Os Erros Inatos do Metabolismo (EIM) constituem-se em um grupo heterogêneo de doenças genéticas raras, caracterizadas pela presença de mutações patogênicas em genes que codificam enzimas, proteínas transportadoras ou co-fatores envolvidos em alguma rota metabólica. Essas alterações nas rotas metabólicas podem causar acúmulos anormais de metabólitos, falta de produtos essenciais ou acúmulo de subprodutos gerados, pelo desvio do substrato para uma rota alternativa, afim de diminuir a concentração de substratos podendo muitas vezes acumular produtos tóxicos ao organismo (Picon et al. 2010; Scolamiero et al. 2015).

No início do século XX, Sir Archibal Edward Garrod (1887-1936) empregou o termo “Erros Inatos do Metabolismo” para designar um grupo de doenças que estava pesquisando (alcaptonúria, cistinúria, pentosúria benigna, e albinismo). Garrod concluiu que estas doenças também eram comuns a outros membros da família e resultavam de falhas em alguma etapa do processo metabólico. Isto foi correlacionado com as Leis de Mendel, já que estas alterações existiam desde o nascimento, persistiam durante a vida, muitas vezes levavam à morte e apresentavam os mesmos sintomas e características (Scriver 2008).

A incidência isolada de cada uma destas doenças metabólicas genéticas é pequena, uma vez que se tratam de doenças com padrão de herança autossômica recessiva em sua grande maioria. No entanto, como já foram descritos mais de 500 distúrbios conhecidos como EIM, a frequência se torna mais expressiva, de aproximadamente 1/800 nascidos vivos (El Husny & Caldato

2006). Apenas uma pequena parte dos EIM tem sua herança ligada ao cromossomo X. Como o indivíduo necessita em torno de 50% da atividade enzimática para que as reações ocorram, possuir um dos alelos sem mutações patogênicas, como acontece nas heranças ligada ao sexo, é suficiente para garantir um funcionamento do organismo. Por este motivo heterozigotos possuem sintomas atenuados ou muitas vezes não são afetados (El Husny & Caldato 2006; Mak et al. 2013).

Tratando-se de alterações metabólicas bastante distintas, os EIM possuem diversas classificações. De acordo com a classificação de Saudubray e Charpentier (2001), os EIM dividem-se em duas categorias: a *Categoria 1*, engloba as alterações que afetam um único sistema orgânico ou apenas um órgão e a *Categoria 2*, que abrange um grupo de doenças cujo defeito bioquímico compromete uma via metabólica comum a diversos órgãos, como as doenças lisossomais, ou restrito a um órgão apenas, porém com manifestações humorais e sistêmicas. Respeitando a variabilidade de alterações da *Categoria 2*, as doenças metabólicas hereditárias que a compõem são divididas em três diferentes grupos conforme suas características fisiopatológicas e fenotípicas:

- Grupo I: Distúrbios de síntese ou catabolismo de moléculas complexas;
- Grupo II: Erros inatos do metabolismo intermediário que levam a intoxicação aguda ou crônica;
- Grupo III: Deficiência na produção ou utilização de energia.

Entre os distúrbios de síntese ou catabolismo de moléculas complexas estão as doenças lisossomais, que são as mucopolissacaridoses e as esfingolipidoses, assim como as doenças peroxissomiais (Mak et al. 2013; El Husny & Caldato 2006; Saudubray et al. 2006).

## **Doenças Lisossômicas de Depósito**

Os lisossomos são organelas citoplasmáticas responsáveis pela degradação de macromoléculas como proteínas, polissacarídeos, ácidos nucleicos e lipídios através de enzimas contidas no seu interior. Os lisossomos são altamente polimórficos, possuem uma combinação distinta de pelo menos 50 tipos diferentes de enzimas hidrolíticas incluindo proteases, nucleases, glicosidases, lípases, fosfolipases, dentre outras. Estas enzimas lisossômicas são hidrolases ácidas, que tem sua atividade ótima em pH dentro da faixa de 4-5 na luz lisossomal. Quando existe algum defeito em uma destas enzimas, em seu transporte ou em proteínas que modulam a sua atividade (co-fatores), produz-se um acúmulo de substrato dentro do lisossomo que conseqüentemente aumenta de tamanho, causando o posterior aumento da célula, órgãos e tecidos (Pereira et al. 2008).

As Doenças Lisossômicas de Depósito (DLD) compreendem um subgrupo dos Erros Inatos do Metabolismo, onde a maioria destas doenças genéticas é causada pela deficiência de enzimas chamadas hidrolases lisossômicas, que agem na degradação de substratos no interior dos lisossomos. Esses substratos, não degradados, acumulam-se nos lisossomos causando um amplo espectro de anormalidades esqueléticas, comprometimento do sistema nervoso, disfunções orgânicas e acúmulo de lipídios complexos nos tecidos (Scriver et al. 2000). Atualmente são classificadas como DLD mais de 50 doenças. Apesar de cada uma dessas doenças serem, individualmente, relativamente raras, juntas elas afetam um em cada 1500 a 5000 recém-nascidos (Scriver et al. 2000; Platt 2014).

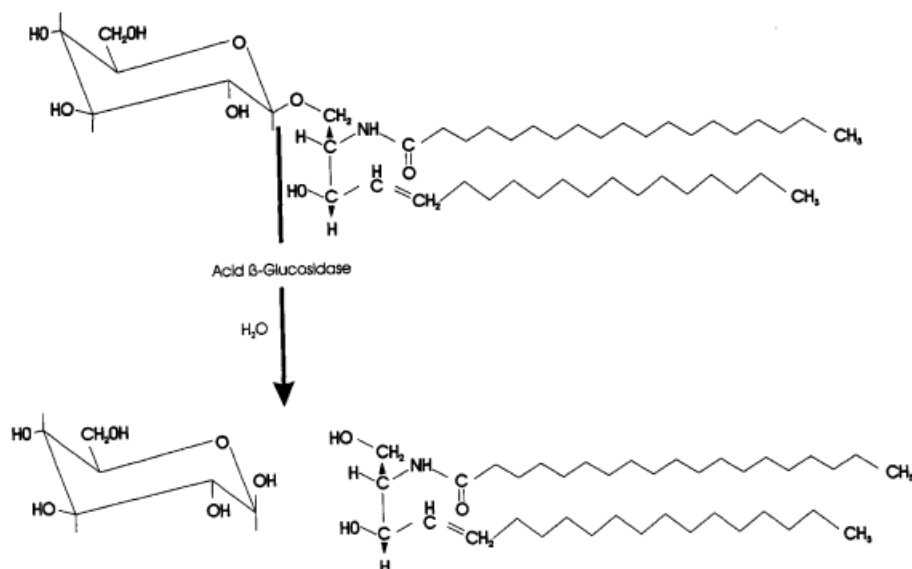
Nas últimas décadas vêm sendo desenvolvidos e já estão disponíveis diversos tipos de tratamentos para as DLDs como, terapia gênica, transplante de medula óssea, inibidores de síntese de substrato e terapia de reposição enzimática, embora não disponíveis para todas elas (Kwapiszewski et al. 2011; Wenger et al. 2003). Essas terapias atenuam os sintomas e melhoram significativamente a qualidade de vida dos pacientes (Kornfeld 1992).

As DLDs podem ser classificadas de diferentes maneiras, sendo que a classificação mais adequada é baseada na proteína ou enzima deficiente, porém uma mesma enzima pode causar o acúmulo de substratos diferentes. Visto isso, a classificação clinicamente mais utilizada é baseada no tipo de substrato que se acumula nos lisossomos: esfingolipidoses, mucopolissacaridoses, glicoproteinoses, mucolipidoses, oligossacaridoses e glicogenoses (Futerman & van Meer 2004).

### **Doença de Gaucher**

A Doença de Gaucher (DG; OMIM 230800) é a doença de depósito lisossômico mais frequente, sendo causada pela deficiência da atividade da enzima glicocerebrosidase ou  $\beta$ -glicosidase ácida (GBA; EC 3.2.1.45). É herdada de forma autossômica recessiva e engloba um conjunto heterogêneo de sinais e sintomas. A doença apresenta frequência marcadamente elevada entre a população de judeus Ashkenazi. De modo geral, a frequência varia de 1:50.000 (Fost et al. 2006) nascidos vivos. Nos Estados Unidos, a estimativa da incidência é de aproximadamente 1:40.000 nascidos vivos e entre os descendentes de judeus Ashkenazi, de 1:900 e 1:15 heterozigotos obrigatórios (Sobreira & Bruniera 2008; Pacheco & Uribe 2013; Scott et al. 2010).

A GBA é responsável pela degradação da glicosilceramida em glicose e ceramida e seu déficit resulta no acúmulo intracelular da glicosilceramida (Figura 1), principalmente nas células da linhagem macrófágica.



**Figura 1.** Substrato natural da β- glicosidase ácida, glicosilceramida, e os produtos da clivagem, glicose e ceramida.

Estes macrófagos repletos de glicosilceramida são chamados de Células de Gaucher. Embora a função exata destas células na patogênese da DG ainda permaneça desconhecida, acredita-se que elas secretam fatores que induzem resposta inflamatória e fazem a conexão entre o acúmulo de lipídeo lisossomal e as diversas manifestações clínicas (Sobreira & Bruniera 2008; Pacheco & Uribe 2013).

A doença de Gaucher engloba um conjunto contínuo de sinais e sintomas que vão desde a forma letal perinatal até a doença assintomática. A DG é dividida em três grupos baseada na ausência (tipo 1) ou presença e gravidade de envolvimento do sistema nervoso central (tipo 2 e 3).

O tipo 1 (OMIM# 230800) é a forma mais frequente, não apresenta acometimento do sistema nervoso central e eventuais sintomas neurológicos observados são secundários a complicações sistêmicas da doença. As manifestações podem ocorrer desde a infância até tardiamente na vida adulta. A hepatoesplenomegalia é uma das primeiras manifestações visíveis e é achado quase que universal. Ocorrem também alterações hematológicas, em consequência do sequestro e hiperatividade esplênica e da infiltração medular pelas células de Gaucher, onde os eventos mais frequentes são trombocitopenia e anemia, podendo ocorrer também leucopenia. Podem ocorrer também manifestações esqueléticas como osteopenia, osteoporose, necrose avascular e crianças podem apresentar atraso no crescimento, na maturação esquelética e do início da puberdade. Os sintomas ósseos são os primeiros sintomas apresentados, mas são observados tardiamente devido a dificuldade de diagnóstico (Sobreira & Bruniera 2008; Pacheco & Uribe 2013; Scriver et al. 2000).

No tipo 2 (OMIM# 230900) ocorre acúmulo da glicosilceramida dentro dos neurônios gerando assim um prognóstico ruim, com morte prevista entre 9 e 11 meses de idade. Os pacientes classicamente apresentam alteração neurológica progressiva associada aos sinais viscerais. O quadro clínico é homogêneo e caracteriza-se por degeneração do tronco cerebral de forma rápida precoce e grave (Sobreira & Bruniera 2008; Pacheco & Uribe 2013).

O tipo 3 (OMIM# 231000) apresenta-se entre a infância e a adolescência, eventualmente na vida adulta. Alguns pacientes apresentam doença neurológica de progressão lenta com convulsões generalizadas ou mioclônicas e comprometimento sistêmico mais leve. Outros apresentam



envolvimento visceral e ósseo mais extenso e desenvolvimento precoce de anormalidades nos movimentos oculares, e raramente desenvolvem doença neurológica progressiva (Sobreira & Bruniera 2008; Pacheco & Uribe 2013).

## **Diagnóstico**

A Doença de Gaucher pode ser diagnosticada através de achados morfológicos, medida da atividade enzimática ou análise molecular. O diagnóstico morfológico é feito através da presença de células de Gaucher na amostra analisada, frequentemente aspirado da medula óssea. No entanto, é insuficiente para confirmar o diagnóstico, pois células muito semelhantes às células de Gaucher podem ser encontradas em outras doenças como a talassemia, leucemia granulocítica crônica e mieloma múltiplo (Sobreira & Bruniera 2008).

A demonstração da deficiência da atividade da enzima  $\beta$ -glicosidase ácida é considerada o método padrão ouro para o diagnóstico. A atividade enzimática pode ser medida em leucócitos do sangue periférico e outras células nucleadas, usando substratos fluorescentes e seguindo seus derivados fluorescentes. A medida da atividade da enzima quitotriosidase é utilizada como complemento à dosagem da GBA, pois é considerada um biomarcador para a DG. As medidas das atividades destas enzimas ainda podem ser realizadas em sangue impregnado em papel filtro (SPF) como método de triagem (Sobreira & Bruniera 2008; Goldim et al. 2012).

O diagnóstico molecular, executado por técnica de reação em cadeia de polimerase dos fragmentos genômicos e detecção das mutações específicas, permite definir o genótipo e pode ser útil na identificação de portadores

(heterozigotos não-doentes) e no diagnóstico pré-natal, além de ter certo valor prognóstico (Sobreira & Bruniera 2008).

## **Tratamento**

A terapia de reposição enzimática (TRE) para a DG foi aprovada em 1991 pela Food and Drug Administration. A GBA exógena, inicialmente extraída de placenta humana (alglucerase, Ceredase®, Genzyme Corporation, Cambridge, Massachusetts) foi substituída em 1994 pela forma recombinante (imiglucerase, Cerezyme®, Genzyme Corporation). Na última década, a TRE tornou-se o tratamento padrão para a DG tipo 1. Sabe-se que é geralmente bem tolerada, capaz de reverter anos de acúmulo de substrato e produz melhora clínica e de qualidade de vida para os doentes (Sobreira & Bruniera 2008).

A reversão do envolvimento celular pela TRE requer que quantidades suficientes da enzima sejam entregues às células e órgão afetados. Como o medicamento tem baixa penetração nos pulmões e ossos, e não atravessa a barreira hemato-encefálica, sua eficácia no tratamento destes órgãos e sistemas pode ser limitada ou apresentar resposta mais lenta (Sobreira & Bruniera 2008).

No Brasil, foi também aprovada a terapia de redução de substrato com miglustate (Zavesca®, Actelion Pharmaceuticals, Allschwill, Suíça) para o tratamento de DG tipo 1. O miglustate inibe reversivelmente a síntese de glicosilceramida e reduz o acúmulo do substrato intracelular. Tem sido indicado como opção terapêutica para pacientes entre 18 e 70 anos com manifestações leves a moderadas e sem risco de novas complicações ósseas e que tenham restrições ao uso da TRE (de Fost et al. 2008; Sobreira & Bruniera 2008)

## **Biomarcadores**

Biomarcadores são moléculas que apresentam-se em concentrações aumentadas ou diminuídas durante a evolução das doenças, são usadas como métodos de monitoramento do tratamento (Pacheco & Uribe 2013).

Vários estudos sobre doenças crônicas utilizam modelagem de biomarcadores para descrever a sua evolução como a imunodeficiência adquirida, Doença de Parkinson e diabetes mellitus (Stirnemann et al. 2010).

A DG tem alguns biomarcadores descritos como: a quitotriosidase (QT; EC 3.2.1.14), ferritina, enzima conversora de angiotensina (ECA; EC 3.4.15.1) e fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP; EC 3.1.3.2) que apresentam-se elevadas durante a evolução da DG (Pacheco & Uribe 2013; Stirnemann et al. 2010; Hollak et al. 1994; Orchard et al. 2011). Suas concentrações aumentam com a progressão da doença e geralmente diminuem durante TRE (Cabrera-Salazar et al. 2004).

Outras substâncias que também já foram descritas como biomarcadores para DG são GM-CSF, sCD14, IL8, CCL18 e saponina C (de Fost et al. 2008; Hollak et al. 1997; Cabrera-Salazar et al. 2004). Além disso, não é conhecido se os níveis de biomarcadores no diagnóstico podem prever o prognóstico de pacientes DG tratados e não tratados e se estes pacientes respondem ou não a terapia (Poll et al. 2002). Apesar da falta de diretrizes oficiais a quitotriosidase é a enzima mais utilizada para acompanhamento da DG (Stirnemann et al. 2010).

## **Quitotriosidase**

A Quitotriosidase (QT) é uma quitinase, pertencente a família das glicosilhidrolases, secretada por macrófagos ativados de nosso organismo. Em condições fisiopatológicas esses macrófagos ativados podem produzir grandes quantidades dessa enzima (Hollak et al. 1994; Malaguarnera et al. 2004). A QT que tem como função a hidrólise da quitina é encontrada em diversas espécies de invertebrados desde bactérias até eucariotos, acredita-se que ela tenha potencial quimioterapêutico, função inseticida e fungicida (Fusetti et al. 2002; Danks 1988; Lee et al. 2007).

A QT está relacionada com a DG, sendo que o aumento na atividade da enzima QT nessa doença é significativo quando comparado à atividade encontrada em indivíduos normais, chegando a 600 vezes. A relação entre o aumento da atividade da enzima QT e a DG ainda é desconhecida, contudo observou-se que com a TRE há um decréscimo nessa atividade, sendo assim o melhor e mais usado parâmetro para avaliação da eficácia do tratamento (Rodrigues et al. 2009; Sheth et al. 2010).

Embora a atividade da QT esteja aumentada da DG e com o tratamento ela diminua, ela, em algum momento do tratamento, estabiliza, nunca chegando a níveis normais. Por esse motivo não sabemos se a dose de enzima artificial está correta ou deveria ser diminuída ou aumentada.

Uma limitação no uso da atividade da QT como biomarcador é a existência de genótipos variantes do gene que codifica a enzima QT (gene CHIT1) que resulta na redução ou não produção da enzima em alguns

indivíduos (Danks 1988; Lee et al. 2007). Sendo assim, torna-se necessário o estudo de outros biomarcadores para o monitoramento da evolução da TRE na DG.

## **Citocinas**

As citocinas são sintetizadas pelos macrófagos, monócitos e linfócitos, possuem curto tempo de atuação, pois são liberadas durante uma resposta imune, agem coletivamente e são responsáveis por acionar os linfócitos B que se incumbem de produzir anticorpos específicos. Essa cascata de sinalização ocorre através dos receptores da membrana plasmática das células imunológicas, que recebem e reconhecem os sinais, dando início à resposta imune.

A ação das citocinas é múltipla, pois podem se auto-estimular ou estimular outras células de diferentes linhagens, desencadeando determinadas funções celulares. Dentre os principais tipos de citocinas apresentam-se as interleucinas, também conhecidas como linfocinas, que estão envolvidas na sinalização de linfócitos, geralmente são produzidas por vários tipos de leucócitos, tendo a função de reconhecer o antígeno, induzir a proliferação de linfócitos T e a divisão celular. As interleucinas são classificadas em IL-1, IL-2 e assim sucessivamente, sendo que cada uma dessas interleucinas desenvolvem um papel no sistema imune. Os interferons, que agem no combate de bactérias, vírus e células mutantes formadoras de tumores, são subdivididos em alfa, beta e gama e também atuam aumentando a expressão de moléculas que inibem o desenvolvimento de antígenos (Cavaillon 2005).

A citocina pró-inflamatória Interleucina 6 (IL-6) é produzida por muitos tipos de células incluindo macrófagos e tem sido implicada na função de modulação dos macrófagos com o aumento da idade. A IL-6 é capaz de modular a transição da inflamação aguda para crônica, alterando o infiltrado leucocitário a partir de neutrófilos polimorfonucleares de monócitos e macrófagos (Ramanathan et al. 2013).

A IL-8 por sua vez é produzida rapidamente em grande escala através de vários tipos de células em resposta a estímulos inflamatórios. Os monócitos, macrófagos e células T, assim como outras células de linhagem linfoblástica podem produzir IL-8 em resposta ao estímulo da IL-1 ou Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (Cavaillon 2005).

A IL-1 também chamada de hematopoietina-1 é produzida por macrófagos, embora tecidos epidérmicos, epiteliais, linfoides e vascular também possam sintetizá-la. A IL-1 é quimiotático para linfócitos e regula vários aspectos de desenvolvimento de linfócitos B e T, incluindo maturação do Timo e precursores de células B e indução de linfoquina e síntese e expressão de receptores de linfoquinas (Cavaillon 2005).

O TNF-  $\alpha$ , por sua vez, é uma citocina envolvida na reação inflamatória inicial, sendo uma das substâncias estimulatórias de reações de fase aguda e expressada principalmente por macrófagos ativados (M1) e linfócitos T CD4+ com fenótipo Th1 (Gaur & Aggarwal 2003; Locksley et al. 2001).

A interleucina 17a (IL-17a) desempenha papel chave na defesa do hospedeiro e nas doenças inflamatórias. IL-17a derivada de fontes inata e adaptativa pode lutar contra a invasão do patógeno em diversas fases e locais

de infecção, o que pode aumentar ainda mais a complexidade e uma salvaguarda para a resposta imune defensiva (Jin & Dong 2013).

A IL10 por sua vez tem um papel importante na regulação das respostas imunes, porque bloqueia a ativação da síntese de citocinas e é um inibidor de macrófagos, células T e da função efetora das células Natural Killer (NK) (Cavaillon 2005).

Como vimos acima, as citocinas medeiam os processos inflamatórios e as respostas imunes, sendo secretadas principalmente por macrófagos, monócitos e linfócitos. Como a QT é produzida por neutrófilos e macrófagos, armazenada em grânulos e liberada após estimulação com Fator de Estimulação de Colônia de Granulócitos-Macrófagos (GM-CSF), seria razoável esperar que o nível de GM-CSF e outras citocinas sinalizadoras estejam aumentados na DG, pois esta apresenta níveis elevados para essa enzima biomarcadora da doença.

Na literatura, incluindo trabalho de nosso grupo de pesquisa, encontramos resultados demonstrando um aumento significativo de citocinas pró-inflamatórias em pacientes Gaucher sem tratamento (nos três subtipos da doença) (Hollak et al. 1997; Altarescu et al. 2003; Altarescu et al. 2005; Allen et al. 1997; Wajner et al. 2007; Pandey & Grabowski 2013). Porém há raros trabalhos descrevendo a evolução dos níveis plasmáticos dessas citocinas após a instituição do tratamento por reposição enzimática.

Os trabalhos normalmente mostram a evolução de algumas citocinas em pacientes com DG de subtipo 2 e/ou 3 (pacientes que apresentam acometimento neuronal) ou com comparações entre a TRE e a terapia de inibição de síntese de substrato (Giraldo et al. 2006; Cox-Brinkman et al. 2008; van Breemen et al.

2009). Não havendo nenhum trabalho evidenciando a evolução de citocinas pró-inflamatórias em pacientes DG tipo 1.

### **Proteína S100B**

A proteína S100B é membro de uma família de proteínas multigênicas moduladas pelo cálcio (Sorci et al. 2013). A S100B exerce tanto as atividades regulatórias intracelulares como as extracelulares (Ye et al. 2015).

Como um regulador intracelular, a S100B está envolvida na regulação do metabolismo energético, transcrição, fosforilação de proteínas, na proliferação celular, sobrevivência, diferenciação e motilidade, e homeostase do  $Ca^{2+}$ , através da interação com uma grande variedade de proteínas (enzimas, substratos enzimáticos, subunidades do citoesqueleto, proteínas adaptadoras, fatores de transcrição, E3 ligases de ubiquitina e canais iônicos) em um número restrito de tipos de células (Sorci et al. 2013).

Como um sinal extracelular a S100B engata o receptor de reconhecimento de padrões, receptor avançado para produtos finais de glicação (RAGE), em células do sistema imunológico, bem como em célula neuronal, glial e células da microglia, células musculares lisas, mioblastos esqueléticos e cardiomiócitos. No entanto, o RAGE pode não ser o único receptor ativado pela S100B, a proteína é capaz de ativar outros tipos de receptores, em tipos de células específicas (Sorci et al. 2013).

Além disso, os efeitos extracelulares da S100B variam dependendo da sua concentração local. A S100B pode exercer efeitos tróficos no sistema nervoso central e periférico e no tecido do músculo esquelético participando,



assim, da homeostase do tecido tanto na sua reparação quanto na sua regeneração (Sorci et al. 2013).

### **Estresse Oxidativo**

Radicais livres (RLs) são átomos ou moléculas que apresentam elétrons desemparelhados, possuem poder oxidante, podendo emparelhar seu elétron a moléculas como lipídios, DNA e enzimas importantes ao metabolismo. Os radicais livres são produzidos pelas células, durante o processo de obtenção de energia de forma aeróbica. Radical livre não é o termo mais adequado para designar as espécies reativas patogênicas, pois algumas delas não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada. As espécies reativas produzidas no metabolismo humano provem de átomos de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio. Como em sua maioria são derivadas do O<sub>2</sub>, utiliza-se o termo “espécies reativas do oxigênio” (EROs) (Ferreira & Matsubara 1997).

As EROs são essenciais para a execução de um grande número de processos celulares, incluindo a sinalização induzida por fatores exógenos como: poluição ambiental, radiação ultravioleta, cigarro, álcool, estresses, dentre outros. No entanto, EROs são altamente reativas. A formação excessiva ou prolongada de EROs pode resultar em danos consideráveis para os constituintes celulares, e está implicada no surgimento de uma grande variedade de doenças, bem como no processo de envelhecimento, hipertensão, e problemas cardiovasculares. A fim de evitar possíveis danos mas permitindo a sua função de sinalização, a manutenção da concentração de EROS é alcançada através de numerosos sistemas enzimáticos (Hoogeboom & Burgering 2009).

O estresse oxidativo (EO) baseia-se na relação entre os níveis celulares de oxidantes e antioxidantes. Um desequilíbrio nesta relação poderia determinar

alterações na fisiologia celular considerando por um lado o papel de radicais livres em vias de sinalização e por outro como agentes do dano oxidativo (Sies 1991). Esse dano pode ser ocasionado pela redução dos níveis de antioxidantes (Halliwell & Whiteman 2004; Sies 2015):

- Por mutações que afetam a atividade de defesas antioxidantes enzimáticas (superóxido dismutases, catalases, peroxirredoxinas, tiorredoxinas, glutaciona peroxidases, glutaciona redutases, enzimas de reparo);
- Por ação de toxinas que reduzem as defesas antioxidantes (como a redução de glutaciona (GSH) por conjugação a metabólitos e xenobióticos em sua biotransformação);
- Por deficiências na ingestão de minerais (cofatores de enzimas antioxidantes);
- Pelo aumento na produção de espécies reativas: por exposição de células e tecidos a condições de hiperóxia (altas tensões de O<sub>2</sub>);
- Por efeito de substâncias (fármacos, xenobióticos, toxinas) que possam gerar espécies reativas em sua biotransformação;
- Pela ativação excessiva de espécies reativas (como na ativação de fagócitos em doenças inflamatórias crônicas);

Os radicais livres e outras espécies reativas estão envolvidos em doenças humanas, estando relacionados em mais de 100 delas como doença de Parkinson, Alzheimer, aterosclerose, fibrose cística e artrite reumatóide (Reolon et al. 2009).

Na literatura muitos trabalhos já demonstraram o envolvimento do estresse oxidativo na patogênese dos EIM, sendo que o acúmulo de metabólitos

tóxicos é apontado como o principal responsável pelo aumento de RLs (Ribas et al. 2010; Sitta et al. 2009; Deon et al. 2007; Barschak et al. 2006).

Os lisossomos são muito suscetíveis ao estresse oxidativo, espécies reativas danificam os lisossomos colocando em perigo a sua permeabilidade (Reolon et al. 2009). Ceramidas e glicosfingolípídeos estão envolvidos em vias de transdução de sinal que causam a formação de EROs. Portanto, o desequilíbrio na via dos glicosfingolípídeos caracterizadora da DG pode contribuir para o aumento nos níveis de EROs em células de Gaucher (Zahran et al. 2015).

## **OBJETIVOS**

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

O presente trabalho objetivou fundamentalmente determinar e comparar os níveis dos parâmetros pró-inflamatórios e oxidativos no plasma de pacientes com doença de Gaucher com e sem tratamento por reposição enzimática comparando com indivíduos normais e estabelecer associações entre esses parâmetros e a atividade da enzima Quitotriosidase.

### **Objetivos Específicos**

1. Determinar os níveis de interleucina 6 (IL-6) no plasma de pacientes DG com e sem tratamento comparando com indivíduos normais.
2. Determinar os níveis de Fator de Necrose Tumoral – alfa (TNF- $\alpha$ ) no plasma de pacientes DG com e sem tratamento comparando com indivíduos normais.
3. Determinar os níveis de interleucina 17a (IL-17a) no plasma de pacientes DG com e sem tratamento comparando com indivíduos normais.
4. Determinar os níveis da proteína S100B no plasma de pacientes DG com e sem tratamento comparando com indivíduos normais.
5. Determinar marcadores de dano oxidativo em pacientes Gaucher sem tratamento comparando com indivíduos normais.

6. Correlacionar a atividade da enzima quitotriosidase com os níveis de interleucina 6 (IL-6) em pacientes DG com e sem tratamento comparando com indivíduos normais.

# **MATERIAIS E MÉTODOS**

## **E RESULTADOS**

## **MATERIAL E MÉTODOS E RESULTADOS**

Os materiais e métodos empregados e os resultados dessa dissertação serão apresentados na forma de artigos científicos.



## **Capítulo 1.**

---

**Citocinas na Doença de Gaucher tipo I: comparação com pacientes em tratamento por reposição enzimática**

---

Submetido em 27de abril de 2015 a revista Clinical Chimica Acta.

**Cytokines in Type-1 Gaucher's Disease:  
Comparative with Patients in Enzyme Replacement Therapy**

**Authors:** Cristina da Silva Garcia<sup>a,b</sup>, Jaine Santin<sup>a</sup>, *Alexandre Silva de Mello*<sup>c</sup>, *Gilson Pires Dorneles*<sup>c</sup>, *Alessandra Peres*<sup>c</sup>, Francieli Rohden<sup>a,b</sup>, Regina Maria Guaragna<sup>a,b</sup>, *Janice Carneiro Coelho*<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>Biochemistry Department, Institute of Basic Healthcare Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup>Graduate Program in Biological Sciences: Biochemistry, Institute of Basic Healthcare Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup>*Centro Metodista Universitário – IPA; Research Center; Physiology Laboratory, Porto Alegre, RS, Brazil*

**Corresponding author**

\*Janice C Coelho, PhD

Department of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Sul,  
Rua Ramiro Barcelos, 2600 anexo, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil.

Phone.: +55 51 33085550; fax: +55 51 33085535.

E-mail address: janice.coelho@ufrgs.br

**Abstract**

Gaucher's Disease (GD) is a lysosomal storage disease caused by the deficiency in the activity of the enzyme acid  $\beta$ -glucosidase (GBA), which is responsible for degrading glucoceramide. The deficit in this enzyme leads to the intracellular storage of glucoceramide, which forms the so-called Gaucher Cells. Although the exact role of these cells in GD's pathogenesis is still unknown, it seems that they secrete factors that induce the inflammatory response and make the connection between lysosomal lipid storage and the various clinical manifestations. This study aimed to measure the serum levels of some cytokines such as IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-17a and protein S100B in untreated subtype-1 GD patients compared with healthy persons and GD patients undergoing enzyme replacement therapy (ERT) for periods below and above ten years. As a result, a significant difference was found for IL-6 between some groups analyzed, however, the same was not observed for TNF- $\alpha$ , IL-17a, or protein S100B. It is concluded that, among the cytokines studied, IL-6 is the best parameter to diagnose and follow type-1 Gaucher's disease patients in ERT.

**Keywords:** Gaucher's Disease; Cytokines; S100B; Interleukin 6; Interleukin 17a, Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ .

## 1. Introduction

Gaucher's Disease (GD) is the most common lysosomal storage disease and is caused by the deficiency in the activity of the enzyme acid  $\beta$ -glucosidase (GBA; EC 3.2.1.45). It is an autosomal recessive congenital disease and comprises a heterogeneous set of signs and symptoms. Overall, its prevalence ranges from 1:50,000 to 1:100,000 [1,2].

GD comprehends a continuous set of signs and symptoms ranging from the lethal perinatal form to the asymptomatic disease. GD is split into three groups based on the absence (type 1) or presence and severity of the involvement of the central nervous system (types 2 and 3).

GBA is responsible for degrading glucoceramide (GC) into glucose and ceramide and its deficit results in intracellular GC storage mainly in macrophage cells. These GC-laden macrophages are called Gaucher Cells. Although the exact role of these cells in GD's pathogenesis is still unknown, it seems that they secrete factors that induce the inflammatory response and make the connection between lysosomal lipid storage and the various clinical manifestations [1,2].

Excess GC and glucosylsphingosine storage in the lysosomes directly leads to the recruiting and involvement of macrophages with pro-inflammatory phenotype (M1) in several tissues and organs of GD patients [3,4]. Actually, not only macrophages but also neutrophils, dendrite cells, and T and B lymphocytes have increased functional activities, along with several cytokines with pro-inflammatory properties such as interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), and interleukin 2 (IL-2) [5,6].

Cytokine IL-6 is classically pro-inflammatory and is secreted by T lymphocytes and M1 macrophages particularly as a response to traumas, tissue damage, infections, and sepsis, which is also present in the early phase of the inflammatory response. Its primary roles are to stimulate synthesis of acute-phase liver proteins, induce fever through the synthesis of PGE<sub>2</sub> in the hypothalamus, mobilize energy stores in the metabolically active tissues (muscles, liver, and fat), induce neutrophil production in the bone marrow, stimulate B-lymphocyte growth, and inhibit the activity of regulatory T lymphocytes [7–9]. However, IL-6 anti-inflammatory actions have been described, particularly after induction of systemic stress such as under physical

exercise, where this cytokine levels are increased in the musculoskeletal tissue and is then described as a myokine [10,11].

TNF- $\alpha$  is a cytokine involved in the early inflammatory reaction, is one of the substances that stimulate acute-phase reactions and is expressed mainly by activated macrophages (M1) and CD4+ T lymphocytes with Th1 phenotype. Moreover, TNF- $\alpha$  intracellular signaling activates some transcription factors directly involved in the inflammatory response such as NF $\kappa$ B and JNK, which induces pro-apoptotic and cellular proliferation reactions [12,13]. TNF- $\alpha$  is also able to stimulate the production of acute-phase proteins such as C-reactive protein; phosphorylate serine residue from insulin receptor IRS-1 and, thus, reduce insulin signaling; be a potent chemotactic agent; promote the increased expression of neutrophil vascular adherence molecules; and stimulate phagocytosis activity and expression of IL-1 and prostaglandin E2 in M1 macrophages. Recent evidence also shows that this cytokine reduces IL-10 expression by CD4+ lymphocytes [14,15].

Interleukin 17a (IL-17a) plays a role in the defense of the host and in inflammatory diseases. IL-17a derived from innate and adaptive sources may fight against pathogen invasion at different infection phases and sites, which may add further complexity and a safeguard to the defensive immune response [16]. Many studies have shown that cdT cells and the IL-17a that these cells produce are important in early defense against bacterial infection. Lastly, IL-17a can also be produced by several other innate immune cell types, such as lymphoid tissue inducer cells, natural killer and natural killer T cells, macrophages and Paneth cells. The functional importance of the IL-17a produced by these cell types during inflammation is not very well characterized [16–18].

S100B, a small acidic protein, is a member of a multigenic family of calcium-modulated proteins. It is mainly produced by astrocytes, oligodendrocytes, neural progenitor cells, certain neuronal populations, ependymocytes, Schwann cells, enteric glial cells, melanocytes, kidney epithelial cells, adipocytes, chondrocytes, skin Langerhans cells, a subpopulation of lymphocytes, muscle satellite cells, and skeletal myofibers and the secreted protein, depending on its concentration, can exert either trophic or toxic effects. In humans, increased S100B levels have been detected in brain trauma and ischemia, neurodegenerative, neurometabolic inflammatory, and psychiatric

disease. Serum S100B levels have been used as markers of brain disease [19,20].

Since the role of Gaucher cells is still unknown, although it has been shown that they secrete factors that induce the inflammatory response, this study aims to measure some cytokines and compare the serum levels in untreated type-1 Gaucher's disease patients with healthy persons and GD patients undergoing enzyme replacement therapy (ERT).

## **2. Materials and Methods**

### *2.1. Sample*

The blood samples used as healthy controls were collected from blood donors at the blood bank of the Clinics Hospital of Porto Alegre by the team in charge of blood collection. 15 samples were collected from men and women at equal distribution. These samples were properly identified with numbers so as to preserve the identity of the donors, who had no knowledge of the results and had their identities concealed throughout the research.

The samples from type-1 GD patients came from previously diagnosed leukocytes. 45 samples from GD patients were used. The blood was collected from patients by the medical team and was then sent to the laboratory by a shipping company specialized in biological samples.

This study was approved by the ethics committee from our university in accordance with the World Medical Declaration of Helsinki for ethical principles in clinical research studies involving human subjects. All participants signed an informed consent form before the study start.

From all subjects, 10 mL of blood were collected in heparin tubes. The plasma was separated through centrifugation at 2,500 rpm for 10 min, aliquoted, and frozen at -20 °C for further analyses.

## 2.2. Analyzed Groups

The samples were split into four groups: healthy controls (C), untreated GD patients (GD), GD patients treated for under ten years (GD<10), and GD patients treated for over ten years (GD>10), with n=15 for each group.

## 2.3. Dosages

The plasma dosages of IL-6, TNF- $\alpha$ , and IL-17a were measured using the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) method following the manufacturer's recommendations (Mini ELISA Development Kit, PeproTech Inc, USA). For S100B dosages, the ELISA method followed the recommendations of another manufacturer (Mini ELISA Development Kit, ABNOVA Inc, USA).

For all dosages, 100  $\mu$ L capture antibody were added to each well and the plates were incubated overnight at room temperature. The following day, after the plates were washed and prepared, 100  $\mu$ L of either the standard or the samples were added to each well and the plates were incubated for 2 h at room temperature. Next, the plates were aspirated and washed (4x) and 100  $\mu$ L detection antibody were added to each well followed by further incubation at room temperature for 2 h. After the plates were washed again, 100  $\mu$ L avidin-peroxidase were added to each well and the plates were incubated for 30 min. Finally, 100  $\mu$ L substrate solution were added to each well and the plates were incubated at room temperature for color development. The plates were read using an ELISA reader at 405 nm. The sensitivity of each assay was 23-1500 pg/mL (TNF- $\alpha$ ), 24-1500 pg/mL (IL-6), 16-1000 pg/mL (IL-17a), and 50-4000 pg/mL (S100B).

## 3. Statistical Analysis

Data are reported as mean $\pm$ SD. The dosages of the four groups were compared by one-way ANOVA with Tukey's Post-Hoc test ( $p < 0.05$ ) using the software GraphPad Prism 5.

#### 4. Results

Untreated GD patients showed a significantly high IL-6 level compared to the control group (Figure 1). After treatment initiation, IL-6 levels significantly decreased ( $p < 0.05$ ).

TNF- $\alpha$ , IL-17a, and S100B, as seen in Figures 2, 3, and 4, respectively, did not significantly differ among the groups analyzed.

#### 5. Discussion

Gaucher's disease is a lysosomal storage disease caused by deficiency in the activity of enzyme GBA, which is responsible for degrading glucoceramide (GC). The decrease or lack of GBA activity leads to intracellular GC storage, which forms the so-called Gaucher cells.

Studies suggest that GC accumulation in macrophages triggers events that contribute to the increased production of monocytes, neutrophils, and chemo-attracting proteins as well as IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , and TNF $\alpha$  in GD which could cause the recruitment of neutrophils and transformation of monocytes into the effector macrophages and dendritic cells to initiate inflammatory reactions in visceral tissues of GD. The detailed mechanisms of such pathophysiology remain to be described [5]. The change in the pattern of these proteins in GD motivated the authors of the present study to research the effect of ERT on the levels of these compounds.

IL-6 is a typical example of such multifunctional cytokine. It was originally identified as a B-cell differentiation. IL-6 has been implicated in the development of localized osteolysis in multiple myeloma and in the development of post-menopausal osteoporosis. High serum IL-6 levels in GD patients may thus reflect the development of the bone lesions commonly associated with this disorder. Since IL-6 and IL-10 are important regulators of lymphocyte growth and differentiation, and IL-6 levels were significantly raised in patients with oligo- or polyclonal increases in serum immunoglobulins, enhanced release of these cytokines from pathological macrophages provides a pathological link between GD and associated lymphoproliferative disorders [21]. Elevated serum IL-6 levels are related to the development of both monoclonal and polyclonal gammopathies



[22], which have been frequently reported to be elevated in GD patients, and are known to be associated to hyperactivity of the immune system [23,24]. In addition, IL-6 induces growth of T cells and acute-phase response in the liver, findings typically observed in GD patients [25]. This raises the possibility that IL-6 may play a central role in the development of GD and its association with multiple myeloma, which is also characterized by high IL-6 levels [25].

IL-6 also has powerful effects on the skeleton since it is a potent stimulator of bone resorption and reduces bone formation in calvarial cultures [25,26]. Taking these effects of IL-6 into consideration, the high levels of this cytokine in this study's patients may account for the disturbances in bone remodeling in type-1 GD patients [25]. Other studies had already shown an increase in IL-6 levels in GD patients [27–29].

The present data match those studies. It was observed that untreated GD patients have twice as high IL-6 level compared to healthy persons, which is in accordance with the theory of a great pro-inflammatory response due to the presence of Gaucher cells and bone lesions.

Following that line of thought, IL-6 levels in GD patients were expected to return to normal or, at least, close to it. The results show that IL-6 levels significantly decreased and approached the value expected for healthy controls, possibly due to the decrease in bone lesions in these patients [21,25]. In accordance with this result, it is expected that, as treatment time increases and bone levels decrease, IL-6 levels come increasingly closer to normal.

TNF- $\alpha$  was identified many years ago as a product of lymphocytes and macrophages that promote lysis of certain cell types, particularly tumor cells [13]. TNF- $\alpha$  is a pleiotropic cytokine produced in muscle, adipose, and lymphoid tissue by activated macrophages that mediates endothelial leukocyte interactions by inducing expression of adhesion molecules. TNF- $\alpha$  interacts with receptors in endothelial cells and induces the increase in vascular permeability to allow leukocytes to access the infection site. Thus, it is involved in systemic inflammations and is one of the cytokines that cause acute-phase reaction [30]. It is also responsible for decreasing insulin response by decreasing the expression to the cell surface of glucose transporters (GLUT-4), substrate 1 phosphorylation of insulin receptors (IRS-1), and specific phosphorylation of the insulin receptor [31,32].

In this study, no significant difference was found in serum TNF- $\alpha$  levels between untreated GD patients and healthy persons. That suggests that the decrease in fatty tissue by the GD patients [31] may have kept TNF- $\alpha$  secretion at normal levels [30,31,33,34]

For GD patients undergoing ERT, a slight increase was observed in serum levels compared to untreated patients, although this increase was not significant, which shows an upwards trend as treatment progresses. This response matches the patients' clinical response of an improvement in bone and abdominal status with ERT. The increase in TNF- $\alpha$  could lead to higher permeability of the endothelium membranes, as previously shown [14], which makes circulation easier and, consequently, improves the bone and abdominal status [14].

Th17 cells are supposed to be involved in various autoimmune diseases, such as rheumatoid arthritis, psoriasis, multiple sclerosis, and inflammatory bowel diseases. Based on the biologic functions and regulation, IL-17a has regulatory roles in host defense and chronic inflammation which result in tissue damage and autoimmunity. So the IL-17a links innate and adaptive immunity and has both beneficial and pathological effects on the immune system [35,36]. Th17 cells play an important role in Crohn's Disease because they maintain intestinal mucosal barrier function by affecting innate and adaptive responses. Mucosal Th17 cells prevent migration of pathogens from breaking mucosa to the systemic circulation through the chemotaxis of neutrophils and macrophages. One of the important features of Th17 cells is to balance mucosal inflammation by regulating the immunogenic response against self-antigens or intestinal pathogens due to their relationship with regulatory T cells. The other is plasticity, the ability of these cells to differentiate it to other T cell subgroups under various types of stimulation. The role of Th17 cells and IL-17a cytokines in GD is not fully understood [35,36].

Since IL-17a's role in GD's inflammatory is not well understood, the authors chose to compare its levels in treated and untreated patients. Nevertheless, no significant difference was found, which showed that this interleukin does not seem to be a good tool to follow type-1 GD patients in ERT. The studies describing increased IL-17a, levels usually deal with diseases that, mostly, have intestinal symptoms, such as Crohn's disease and ulcerative colitis.

These symptoms are not typical in GD patients, which may explain why the levels of this interleukin were not increased in them [35,37].

S100B, a small acidic protein, is a member of a multigenic family of calcium-modulated proteins. It is mainly produced by astrocytes and the secreted protein, depending on its concentration, can exert either trophic or toxic effects. In humans, increased S100B levels have been detected in brain trauma and ischemia, neurodegenerative, neurometabolic, inflammatory, and psychiatric diseases [19].

S100B, as described in the literature, is used as a marker for neuronal damage and inflammatory processes. Type-1 GD patients have a broad spectrum and degree of visceral involvement, including organomegaly, anemia, thrombocytopenia, bone ache, and degenerative bone diseases, with no impact on the nervous system. In face of all that, no alterations in the level of this protein were expected. In the present study, untreated GD patients did not significantly differ regarding S100B when compared to healthy controls and to the GD patients in ERT. In type-1 GD patients, S100B could not be considered a tool to follow the treatment.

In conclusion, it was observed that, of the cytokines researched in the present study, IL-6 was shown to be the most appropriate to be used in the diagnosis and follow-up of type-1 GD patients mainly due to the great inflammatory response caused by GC lysosomal storage.

## 6. REFERENCES

- [1] Sobreira EAP, Bruniera P. Avaliação de dois anos de tratamento da doença de Gaucher tipo 1 com terapia de reposição enzimática em pacientes do estado de São Paulo , Brasil. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2008;30:193–201.
- [2] Pacheco N, Uribe A. Enzymatic analysis of biomarkers for the monitoring of Gaucher patients in Colombia. *Gene* 2013;521:129–35. doi:10.1016/j.gene.2013.03.044.
- [3] Lichtenstein M, Zimran A, Horowitz M. Cytokine mRNA in Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis* 1997;23:395–401. doi:10.1006/bcmd.1997.0156.
- [4] Grabowski G a. Series Lysosomal Storage Disease 1 Phenotype, diagnosis, and treatment of Gaucher's disease 2008;372:1263–71.
- [5] Pandey MK, Grabowski GA. Immunological cells and functions in Gaucher disease. *Crit Rev Oncog* 2013;18:197–220. doi:10.1615/CritRevOncog.2013004503.
- [6] Kacher Y, Futerman AH. Impaired IL-10 transcription and release in animal models of Gaucher disease macrophages. *Blood Cells Mol Dis* 2009;43:134–7. doi:10.1016/j.bcmd.2009.03.006.
- [7] Heinrich PC, Behrmann I, Müller-Newen G, Schaper F, Graeve L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 1998;334 ( Pt 2):297–314.
- [8] Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 2003;374:1–20. doi:10.1042/BJ20030407.
- [9] Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T. Interleukin-6 Family of Cytokines and gp130. *Blood* 1995;86:1243–54.
- [10] Bruunsgaard H, Galbo H, Halkjaer-Kristensen J, Johansen TL, MacLean D a, Pedersen BK. Exercise-induced increase in serum interleukin-6 in humans is related to muscle damage. *J Physiol* 1997;499 ( Pt 3):833–41.
- [11] Pedersen BK, Febbraio MA, Introduction I. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol Rev* 2008;88:1379–406. doi:10.1152/physrev.90100.2007.
- [12] Gaur U, Aggarwal BB. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem Pharmacol* 2003;66:1403–8.

- [13] Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. *Cell* 2001;104:487–501. doi:10.1016/S0092-8674(01)00237-9.
- [14] Walsh LJ, Trinchieri G, Waldorf H a, Whitaker D, Murphy GF. Human dermal mast cells contain and release tumor necrosis factor alpha, which induces endothelial leukocyte adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:4220–4.
- [15] Said EA, Dupuy FP, Trautmann L, Zhang Y, Shi Y, El-Far M, et al. Programmed death-1-induced interleukin-10 production by monocytes impairs CD4+ T cell activation during HIV infection. *Nat Med* 2010;16:452–9. doi:10.1038/nm.2106.
- [16] Jin W, Dong C. IL-17 cytokines in immunity and inflammation. *Emerg Microbes Infect* 2013;2:e60. doi:10.1038/emi.2013.58.
- [17] Cua DJ, Tato CM. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2010;10:479–89. doi:10.1038/nri2819.
- [18] Reynolds JM, Angkasekwinai P, Dong C. IL-17 family member cytokines: Regulation and function in innate immunity. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010;21:413–23. doi:10.1016/j.cytogfr.2010.10.002.
- [19] Michelakakis H, Kariyannis C, Moraitou M, Dimitriou E, Sarafidou J, Papassotiriou I. Serum S100B levels in X-linked adrenoleukodystrophy and Gaucher disease. *J Inherit Metab Dis* 2007;30:822. doi:10.1007/s10545-007-0640-9.
- [20] Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Tubaro C, Bianchi R, Giambanco I, et al. S100B protein in tissue development, repair and regeneration. *World J Biol Chem* 2013;4:1–12. doi:10.4331/wjbc.v4.i1.1.
- [21] Allen MJJ, Myer BJJ, Khokher AMM, Rushton N, Cox TMM. Pro-inflammatory cytokines and the pathogenesis of Gaucher's disease: increased release of interleukin-6 and interleukin-10. *QJ Med* 1997;90:19–25.
- [22] Brach MA, Herrmann F. Interleukin 6: presence and future. *Int J Clin Lab Res* 1992;22:143–51.
- [23] Bataille R, Jourdan M, Zhang XG, Klein B. Serum levels of interleukin 6, a potent myeloma cell growth factor, as a reflect of disease severity in plasma cell dyscrasias. *J Clin Invest* 1989;84:2008–11. doi:10.1172/JCI114392.
- [24] Shoenfeld Y, Beresovski A, Zharhary D, Tomer Y, Swissa M, Sela E, et al. Natural autoantibodies in sera of patients with Gaucher's disease. *J Clin Immunol* 1995;15:363–72.

- [25] Barak V, Acker M, Nisman B, Kalickman I, Abrahamov A, Zimran A, et al. Cytokines in Gaucher's disease. *Eur Cytokine Netw* 1999;10:205–10.
- [26] Hughes FJ, Howells GL. Interleukin-6 inhibits bone formation in vitro. *Bone Miner* 1993;21:21–8.
- [27] Wakusawa K, Haginoya K, Ishitobi M, Hino-Fukuyo N, Togashi N, Sato I, et al. The cytokine and chemokine profiles in rhabdomyolysis in a patient with gaucher disease type II. *Neuropediatrics* 2010;41:39–42. doi:10.1055/s-0030-1253425.
- [28] Mikosch P, Reed M, Baker R, Holloway B, Berger L, Mehta a. B, et al. Changes of bone metabolism in seven patients with gaucher disease treated consecutively with imiglucerase and miglustat. *Calcif Tissue Int* 2008;83:43–54. doi:10.1007/s00223-008-9143-4.
- [29] Wajner A, Michelin K, Burin MG, Pires RF, Pereira MLS, Giugliani R, et al. Comparison between the biochemical properties of plasma chitotriosidase from normal individuals and from patients with Gaucher disease, GM1-gangliosidosis, Krabbe disease and heterozygotes for Gaucher disease. *Clin Biochem* 2007;40:365–9. doi:10.1016/j.clinbiochem.2006.12.003.
- [30] Terlikowski SJ. Tumour necrosis factor and cancer treatment: a historical review and perspectives. *Rocz Akad Med W Białymstoku* 2001;46:5–18.
- [31] Costa J V., Duarte JS. Tecido adiposo e adipocinas. *Acta Med Port* 2006;19:251–6.
- [32] Pedersen BK, Brandt C. The role of exercise-induced myokines in muscle homeostasis and the defense against chronic diseases. *J Biomed Biotechnol* 2010;2010. doi:10.1155/2010/520258.
- [33] Altarescu G, Zimran A, Michelakakis H, Elstein D. TNF- $\alpha$  levels and TNF- $\alpha$  gene polymorphism in type I Gaucher disease. *Cytokine* 2005;31:149–52. doi:10.1016/j.cyto.2005.03.006.
- [34] Michelakakis H, Spanou C, Kondyli A, Dimitriou E, Van Weely S, Hollak CE, et al. Plasma tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) levels in Gaucher disease. *Biochim Biophys Acta* 1996;1317:219–22.
- [35] Sahin A, Calhan T, Cengiz M, Kahraman R, Aydin K, Ozdil K, et al. Serum Interleukin 17 Levels in Patients with Crohn's Disease: Real Life Data. *Dis Markers* 2014;2014:1–6. doi:10.1155/2014/690853.
- [36] Shabgah AG, Fattahi E, Shahneh FZ. Interleukin-17 in human inflammatory diseases. *Postępy Dermatologii I Alergol* 2014;
- [37] Wang Y, Fang M, Wang X, Liu W, Zheng Y, Wu X, et al. Proinflammatory effects and molecular mechanisms of interleukin-17 in intestinal epithelial cell line HT-29. *World J Gastroenterol* 2014;

## FIGURE CAPTIONS

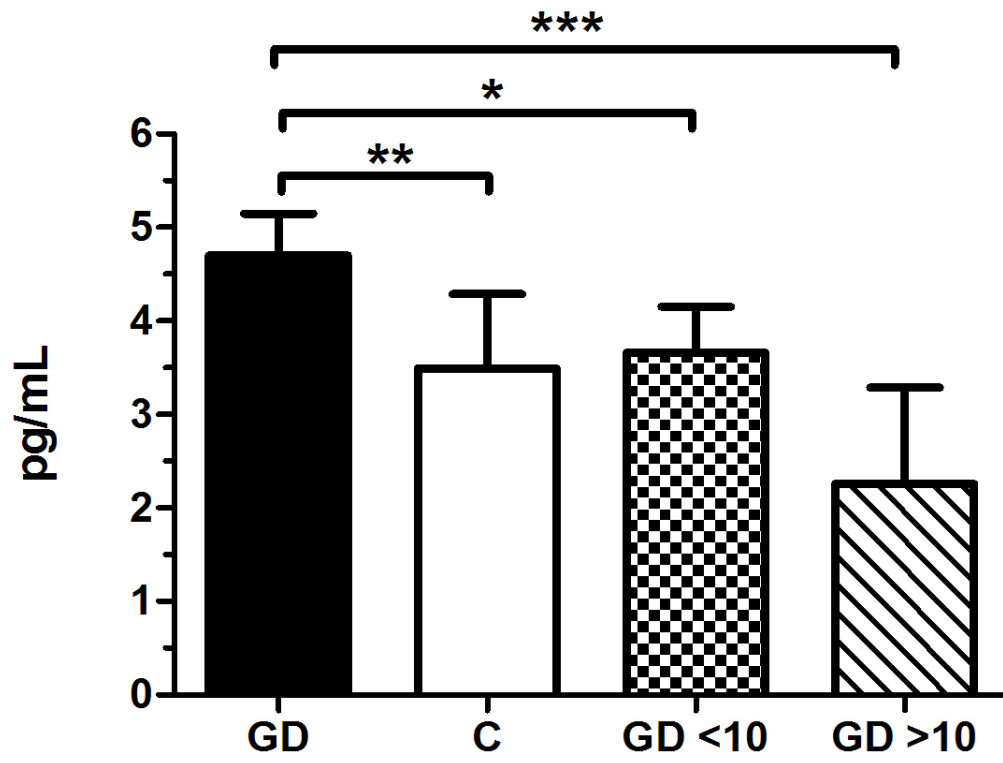
**Figure 1.** Serum interleukin 6 (IL-6) levels in Gaucher's disease patients untreated with enzyme replacement therapy (GD), healthy controls (C), Gaucher's disease patients in treatment for under 10 years (GD<10), and Gaucher's disease patients in treatment for over 10 years (n=15 per group). The results are expressed as mean±standard deviation of the subjects assessed. Significant difference between groups GD and C (\*\*p<0.01), GD and GD<10 (\*p<0.05), and GD and GD>10 (\*\*p<0.001).

**Figure 2.** Serum tumor necrosis factor alpha (TNF-α) levels in Gaucher's disease patients untreated with enzyme replacement therapy (GD), healthy controls (C), Gaucher's disease patients in treatment for under 10 years (GD<10), and Gaucher's disease patients in treatment for over 10 years (n=15 per group). The results are expressed as mean±standard deviation of the subjects assessed.

**Figure 3.** Serum interleukin 17a (IL-17a) levels in Gaucher's disease patients untreated with enzyme replacement therapy (GD), healthy controls (C), Gaucher's disease patients in treatment for under 10 years (GD<10), and Gaucher's disease patients in treatment for over 10 years (n=15 per group). The results are expressed as mean±standard deviation of the subjects assessed.

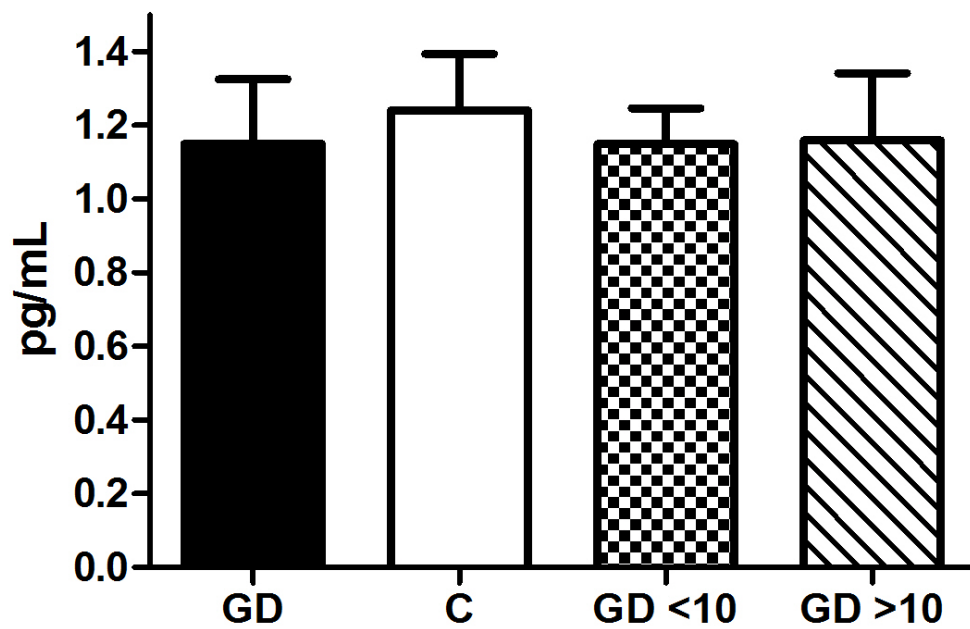
**Figure 4.** Serum protein S100B (S100B) levels in Gaucher's disease patients untreated with enzyme replacement therapy (GD), healthy controls (C), Gaucher's disease patients in treatment for under 10 years (GD<10), and Gaucher's disease patients in treatment for over 10 years (n=15 per group). The results are expressed as mean±standard deviation of the subjects assessed.

GARCIA et al – Figure 1

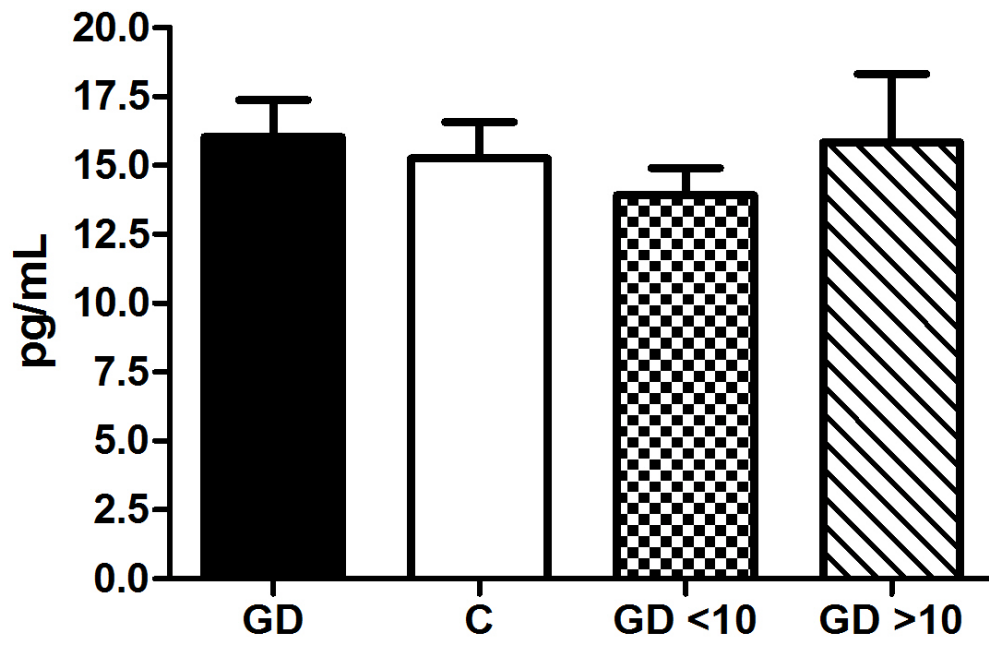




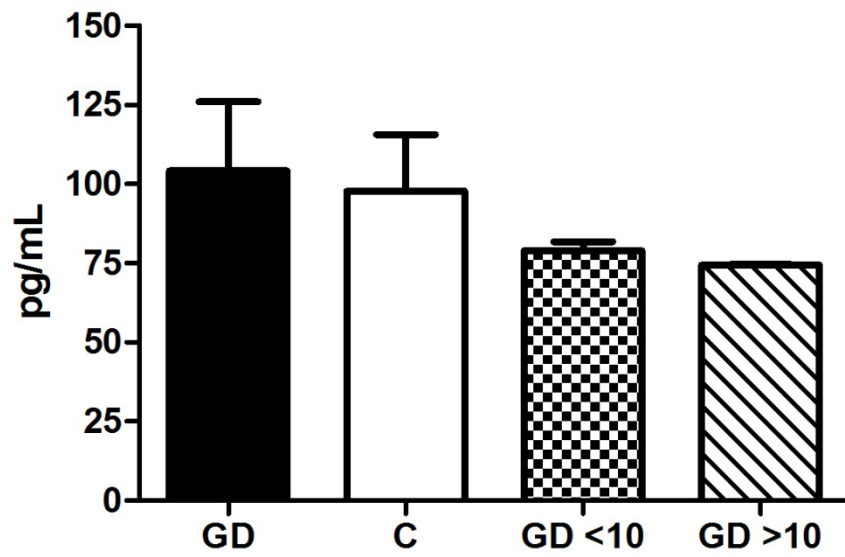
GARCIA et al – Figure 2



GARCIA et al – Figure 3



GARCIA et al – Figure 4



## **Capítulo 2.**

---

### **Oxidative stress parameters of Gaucher disease type I patients**

---

Publicado na revista Molecular Genetics and Metabolism Reports

Doi:10.1016/j.ymgmr.2015.05.001

**OXIDATIVE STRESS PARAMETERS OF GAUCHER DISEASE TYPE I  
PATIENTS**

Alexandre Silva Mello<sup>1\*</sup>, Cristina da Silva Garcia<sup>2</sup>, Fernanda de Souza Machado<sup>1</sup>,  
Niara da Silva Medeiros<sup>1</sup>, Mariane Farias Wohlenberg<sup>1</sup>, Jéssica Pereira  
Marinho<sup>1</sup>, Caroline Dani<sup>1</sup>, Cláudia Funchal<sup>1</sup>, Janice Carneiro Coelho<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>: Research Center; Methodist University Centre – IPA; Porto Alegre; Brazil.

<sup>2</sup>:Department of Biochemistry, ICBS-UFRGS, Federal University of Rio Grande  
do Sul; Porto Alegre; Brazil.

\*Address correspondence to:

Dr. Alexandre Silva de Mello

Centro Universitário Metodista - IPA

Rua Cel. Joaquim Pedro Salgado, 80

90420-060 - Porto Alegre – RS, Brazil

Telephone: 5551 3316 1270

E-mail: alexandre.mello@metodistadosul.edu.br; melloas@gmail.com

**Abstract**

The Inborn Errors of Metabolism (IEM) result from lack or deficiency in the activity of specific enzymes or proteins, leading to an accumulation of metabolic intermediates. Gaucher disease (GD) is considered a lysosomal storage disease in which a deficiency of the enzyme  $\beta$ -glucosidase leads to accumulation of glucosylceramide in lysosomes of the reticuloendothelial system. GD is an inborn error of glycosphingolipid metabolism, caused by deficient activity of the lysosomal enzyme glucocerebrosidase, an essential component of the phagocytic process. In healthy individuals, macrophages use glucocerebrosidase to break down dead cells and cellular debris, but when there is a deficiency of this enzyme; fats and carbohydrates accumulate in the macrophage lysosomes in the reticulate endothelial system. The macrophages expand to several times their normal size, and become known as Gaucher cells. Enzymatic deficiency in GD patients may induce a cascade of events, culminating in secondary effects such as the production of reactive oxygen species (ROS). The study aimed to test the use of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), Carbonyl and total sulfhydryl content (SH), measured in plasma, from patients with GD. The results showed a significant increase ( $p < 0.005$ ) in GD samples compared with healthy controls in CAT, SOD and Sulfhydryl, but there was no change in TBARS and Carbonyl in the comparison between the two groups. In conclusion, the present data indicate the increased value of enzymatic and non-enzymatic defenses without any effect on lipid peroxidation and damage to proteins.

**Key-words:**  $\beta$ -glucosidase; Reactive Oxygen Species; Gaucher disease type I; Lysosomal Storage Disorders; Oxidative Stress.

## 1.Introduction

Lysosomal Storage Disorders (LSDs) represent a group with more than 50 different inherited metabolic diseases resulting from defective function of the specific lysosomal enzyme, or defects in non-enzymatic lysosomal or non-lysosomal proteins. Due to the progressive accumulation of metabolites not degraded in lysosomes, a cellular and widespread tissue dysfunction, in addition to multisystem disorders, occurs [1]. Most LSDs are autosomal recessive origin; these diseases are rare, with a combined incidence estimated at 1 in 5000 live births[2,3].

Gaucher disease is an LSD where a storage of glucosylceramide (GlcCer) and other GSLs occur due to deficiency of the lysosomal enzyme glucocerebrosidase, causing multiple organ dysfunctions[4,5]. The enzyme is present in the lysosomes of all nucleated cells and cleaves the  $\beta$ -glucosidic bond of GlcCer, yielding glucose and ceramide [6]. The disease can be classified in three clinical types. Type 1, the most common, is the chronic, non-neuropathic form of the disease, which shows highly variable signs and symptoms and a variable course, with visceral and skeletal involvement (splenomegaly, hepatomegaly and bone damage that might lead to fractures) and hematologic anomalies (pancytopenia), among others. The neurological involvement can be observed in types 2 and 3 [7].

Evidence shows that the storage of GlcCer in macrophages is associated with inflammatory processes and the production of reactive species[10]. Enzymatic deficiency in GD patients may induce a cascade of events that results in side effects, such as the production of Reactive Oxygen Species (ROS) and Reactive Nitrogen Species (RNS) that can then generate the oxidative stress[9,

11,12], whereas in the body of healthy individuals, the production and degradation of ROS and RNS are generally balanced[13].

Reactive species are naturally formed during biological metabolism, but our organism is also capable of developing an antioxidant defense system, which may be enzymatic or non-enzymatic[14].

Oxidative stress occurs when there is an imbalance between pro-oxidants and antioxidants in favor of pro-oxidants [15]. Some studies describe the relationship between IEM and oxidative stress, but most of these studies assess the efficiency of enzyme replacement therapy, and not intracellular changes caused by ROS in affected patients of GD [16, 17].

This study aimed to test the use of thiobarbituric acid substances (TBARS) and Carbonyl as markers of oxidative damage, in addition to the catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and total content of Sulfhydryl (SH) as markers of antioxidant defense measured in plasma to better understand the cellular changes in GD (Figure 1). Therefore, we investigated the relation between ROS and GD, analyzing markers of oxidative stress in the blood of patients with GD type I, compared with blood from healthy controls (HC).

**INSERT FIGURE 1 (Overview of Oxidative Stress) HERE!!!**

## **2. Methods**

### *2.1. Patients and Controls*

Blood samples of 9 mL were collected from 10 patients previously diagnosed with GD type I and from 11 healthy subjects by one of the authors of this work directly from patients and volunteers. This study included 10 patients (7



women and 3 men; 3-46 years old) with DG and 11 HC (4 women and 7 men; 3-60 years old). For donors older than 18 years old or those responsible for underage donors, an informed consent was obtained according to the guidelines of the committee.

All samples were properly identified with numbers, preserving the identity of donors, who were not informed of the results nor had their identities revealed at any stage of the procedure. As a criterion for inclusion of the samples, individuals had to be at least 7 years old, weigh more than 18 kg and be higher than 90 cm.

The sample size calculation for comparing averages with different variances was made, establishing the level of significance at 5% and power by 90%. For this we used the MiniTab® 15 statistical software. The calculation indicated 10 subjects per group for a total of 20 samples.

The total heparinized blood was centrifuged to separate plasma and leukocytes and underwent a separation technique [18]. The chitotriosidase (CT) activity was measured in plasma, according to the technique of Hollak et. al. (1994) [19] and the activity of  $\beta$ -glucosidase (GLB) was measured in leukocytes, according to the technique of Goldim *et.al.* (2012)[20]. Reference values were established by assessing blood samples provided by the healthy volunteer donors. The diagnosis of GD patients was made in the Federal University of Rio Grande do Sul (Porto Alegre, RS, Brazil).

Lipid peroxidation and protein damage was analyzed using samples of plasma, the former through TBARS and the latter through carbonyl assay. The content of the non-enzymatic antioxidant defenses (sulfhydryl) and the activity of

the antioxidant enzymatic defenses catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) were also analyzed.

The research protocols and consent forms as well as the investigation were ethically and scientifically approved by the Research and Ethical Committee of UFRGS (nº 25686).

## *2.2. Enzymatic activities*

*2.2.1.  $\beta$ -Glucosidase (GBA) activity:* Reference values were established by assessing blood samples provided by healthy volunteer donors. GBA leukocyte activities [21, 22] were measured using artificial 4-methylumbelliperyl substrate (Sigma, StLouis, MO, USA) in dilution buffer (0.54M citrate phosphate, pH5.5 for GBA). Reactions were stopped using 0.5M glycine–NaOH, pH10.3 (GBA). After incubation, 200 $\mu$ L aliquots were transferred to black 96 well plates (Perkin-Elmer, 96F). All incubations were done at 37°C in dry plates with shaking (Marconi MA-127). GBA activity measurements were the standard technique[23]. Standard analysis was carried out in 1.5mL plastic tubes (Eppendorf). All readings were performed at 365nm (excitation) and 450nm (emission) in a 96 well plate reader (Spectra Max M5, Molecular Devices).

*2.2.2. Chitotriosidase (CT) activity:* A technique used for measuring enzyme activity in plasma CT was described by Hollak et al. 1994[19]. Reactions were stopped using 0.13 Methylene diamine, pH11.3 (CT). New reference values and cutoff values were established using ROC curve with 100% sensitivity and specificity. All readings were performed at 365nm (excitation) and 450nm (emission) in a 96 well plate reader (Spectra Max M5, Molecular Devices).

## *2.3. Parameters of oxidative stress*

*2.3.1. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS):* As an index of lipid peroxidation, we used thiobarbituric acid reactive species (TBARS) production during an acid-heating reaction, which is widely adopted as a sensitive method for measuring lipid peroxidation, as previously described by Wills [24]. The samples were stirred for a brief period of time with 10% trichloroacetic acid (TCA) and 0.67% thiobarbituric acid (TBA) and then heated in a boiling water bath for 15 min in closed tubes. TBARS were determined by absorbance at 535 nm. Results were expressed as nmol/mg of protein.

*2.3.2. Measuring the levels of oxidatively modified proteins:* Oxidative damage to proteins was assessed by determining Carbonyl groups on the basis of its reaction with dinitrophenylhydrazine (DNPH), as previously described by Levine et al.[25]. DNPH reacts with protein carbonyls to form hydrazones that can be measured spectrophotometrically. Firstly, 500  $\mu$ L 10 mM DNPH in 2 M HCl were added at room temperature for 1 h, with vortexing every 10–15 min. Next, 500  $\mu$ L 20% TCA were added, and tubes were mixed and centrifuged for 3 min. The supernatant was then discarded, and the pellets were washed three times with 1 mL of ethanol–ethyl acetate (1:1) to remove free reagent. After centrifugation, the precipitated protein was re-dissolved in 0.6 mL guanidine solution. Proteins were dissolved within 15 min at 37°C. The insoluble material was removed by centrifugation in a microcentrifuge for 3 min. The absorbance was read at 370 nm. Equal amounts of protein samples without DNPH were used as controls. The results were expressed in nmol/mg of protein.

*2.3.3. Measurement of total sulfhydryl groups (SH):* Sulfhydryl assay is based on the reduction of 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) by thiols, generating a yellow derivative (TNB) whose absorption is measured spectrophotometrically at

412 nm. Briefly, 0.1 mM DTNB was added to 120  $\mu$ L of the samples. This was followed by 30 min incubation at room temperature in a dark room. Absorption was measured at 412 nm. The sulfhydryl content is inversely correlated to oxidative damage to proteins. Results were reported as nmol/mg protein[26].

*2.3.4. Measure of the activity of antioxidant enzymes:* SOD activity was determined by a spectrophotometric method, measuring the inhibition of the rate of adrenochrome formation at 480nm (Spectrophotometer SP-2200, Biospectro) in medium containing 1 mM adrenalin and 50 mM glycine[27]. The results were expressed in U SOD/mg protein. The method used to determine CAT activity has been described by Aebi [28] and determines the rate of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> degradation measuring absorbance at 240nm (Spectrophotometer SP-2200, Biospectro). The results were expressed as UCAT/mg protein.

#### *2.4. Protein determination*

Protein concentration was determined according to the method described by Lowry et al. [29].

#### *2.5. Statistical analysis*

The data were evaluated through Student's t test, followed by Levene's test, used to compare results of the analysis of plasma with those of both HC and GD patients. Analysis was performed using statistical software package SPSS, version 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), and level of significance was set at  $P < 0.05$ . Data are reported as mean  $\pm$  SD.

### 3. Results

A total of 10 GD patients and 11 HC were included in this report. The average age was 20.00 years  $\pm$  15.69 for DG and 25.18 years  $\pm$  18.91 for HC. After sample collection, we measured enzymatic analysis, to confirm that a sample was from an HC or a GD patient (Table 1). Values were significantly different between the two enzymes in the groups included in this study, with GBA showing increased values in the HC group, whereas CT enzyme levels were higher in the DG group (Table 1).

**INSERT TABLE 1 HERE!**

**INSERT FIGURE 2 (Damage) HERE!**

**INSERT FIGURE 3 (Enzyme) HERE!**

We did not observe statistical differences between HC and GD groups for TBARS and Carbonyl assays (Figure 2). However, the results showed a statistical difference between the groups for Sulphydryl content ( $p < 0.04$ ) with  $1.57 \pm 2.77$  nmol/mg for HC and  $4.38 \pm 2.62$  nmol/mg for GD patients (Figure 2), showing higher levels for GD.

The mean between groups were significantly different in the CAT activity ( $p < 0.03$ );  $1.58 \pm 0.76$  UCAT/mg for HC and  $6.18 \pm 6.01$  UCAT/mg for GD patients (Figure 3). The mean SOD activity ( $p < 0.04$ ) was  $1.15 \pm 0.52$  USOD/mg for HC and  $2.12 \pm 1.13$  USOD/mg for GD patients (Figure 3). In addition, we observed statistical differences in SOD and CAT activities ( $p < 0.03$  and  $p < 0.04$ , respectively) in the GD group, which showed higher levels than the control. However, we did not observe differences in SOD/CAT ratio (Figure 3).

#### 4. Discussion

Inborn Errors of Metabolism result from the lack or deficiency in the activity of specific enzymes or proteins, leading to an accumulation of metabolic intermediates. The incidence of IEM is rare in the population, in general, 1: 1000 live births [30]. Gaucher disease is considered a lysosomal storage disease in which the deficiency of the enzyme  $\beta$ -glucosidase leads to accumulation of glucosylceramide (GlcCer) in lysosomes of the reticuloendothelial system. The cause of the deficiency of  $\beta$ -glucosidase may be associated with a mutation in an allele of the gene encoding the enzyme, but little is known about the mechanisms that lead to tissue damage [31, 32]. Evidence shows that the storage of GlcCer in macrophages is associated with inflammatory processes and the production of reactive species [9].

Several studies suggest that the presence of redox impairment may play a role in the pathogenesis of GD [11, 12, 13]. Many studies have correlated the IEM with increased ROS and antioxidant deficiency, which contribute to oxidative stress. Evidence suggests that oxidative stress may be an important pathological factor for numerous IEM[34-38]. The literature shows the deficiency of the enzyme  $\beta$ -glucosidase in cultured human fibroblasts increases the amount of reactive species [12]. Another study shows that  $\beta$ -glucosidase deficiency in patients alters the activity of the antioxidant enzymes catalase and superoxide dismutase in erythrocytes [11].

The results showed what seems to be a chronic condition control which is characteristic in the group of GD type I patients when compared to healthy controls, also showing the highest values Sulfhydryl in GD compared to healthy

controls, indicating that a larger amount of the SH group activity seems to be directly related to the control of lipid peroxidation.

The glutathione (GSH) has a central role in protecting cells against oxidative stress [11, 39]. Many of the reactions of GSH involving the sulfhydryl group (SH) are highly polarizable. These thiols are a class of organic sulfur derivatives, characterized by the presence of sulfhydryl residues present in biological systems, in addition to various functions including a central role in coordinating the antioxidant defense network. The mammalian biological system is a system that regulates the cellular redox state of SH, protecting cellular protein, which contains excessive oxidation of SH. This system includes low molecular weight in SH donor groups and enzymes which can catalyze the reduction of the SH groups of proteins and pro-oxidants[40].

One group used plasmalogens, which represent a unique class of phospholipids. Reduced red blood cell plasmalogen levels were reported in Gaucher disease patients. The relation between plasmalogen abnormalities in Gaucher disease patients and malonyldialdehyde levels, an indicator of lipid peroxidation, and the total antioxidant status, was further investigated. [41]. No significant difference in the levels of plasma TBARS (a marker of lipid peroxidation) were found, which is a strong indicator of oxidative stress within the cell. The data found in TBARS, corroborated by the literature, shows no difference in the values between the groups studied [11].

Detection of carbonyl groups is being widely used as an indicator of oxidative damage to proteins [42]. The increase in protein carbonyl group is associated with numerous pathological disorders, including Rheumatoid Arthritis, Alzheimer's disease, Respiratory Distress syndrome, Parkinson's disease and

Atherosclerosis [43]. However, we have seen no change between the values of this parameter, showing another form of control that the cell of GD patients seem to exhibit as opposed to the condition of chronic infection of the diseases mentioned before.

The superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) enzymes are among the studied cellular enzymatic antioxidants, which provide the first endogenous line of defense against oxidative injury. These alterations in the antioxidant system may cause the accumulation of  $H_2O_2$  or products of its decomposition present not only in the cytosol, but also in mitochondria, the production site of much of the reactive species B. [14, 15, 44].

Firstly, our results corroborate with other studies that showed an increase in the amount of activity on the antioxidant enzyme catalase (CAT) in patients compared to healthy controls[11], not only in GD, as in other lysosomal storage diseases (DLDs): Mucopolysaccharidosis type I and Fabry disease[11, 45, 46]. However, we have found a significant difference between groups in SOD, with the opposite results to other research groups, who obtained lower values for GD when comparing healthy control group[11, 47, 48]. This can be explained by controlling the levels of superoxide anion, because the increase in the levels of SOD in GD patients compared to healthy controls, would avoid a change in oxidation processes, such as protein damage. However, through the analysis of carbonyl, a marker of protein damage, no significant change was observed [13].

Furthermore, the monocyte/macrophage GD are chronically activated[49], but show a reduction in the generation of oxidative stress [50]. This may be due to monocytes GD, which adapt themselves to survive under basal conditions,



oxidative stress, in a state of chronic activation. Under these conditions, the cells become unable to be activated in response to an antigenic stimulus [12].

Our work shows what appears to be an intracellular control, because our results show an increase in CAT, SOD and SH (intracellular standard markers), whereas TBARS and Carbonyl (cell membrane markers) showed no difference between groups. In conclusion, the present data indicate the increased value of enzymatic and non-enzymatic defenses, without any effect on lipid peroxidation and damage to proteins.

## **5. Conclusion**

Our study showed an alteration in CAT, SOD and Sulfhydryl, which suggests that GD type I patients changed reactive oxygen species production when compared to HC. This increase in CAT, SOD e Sulfhydryl could likely be related to the prevention of the increase of hydrogen peroxide, preventing damage to lipids, confirmed by the TBARS and Carbonyl values maintenance. However, the other three parameters (TBARS, Carbonyl and SOD/CAT ratio) did not show a significant difference after conducting statistical analysis. We believe the results of this study are important to understand the cellular changes involved in these frequent LSDs.

## **Acknowledgements**

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Brazil.

## Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

## References

- [1] R.F. Mueller, I.D. Young, Biochemical genetics in: Emery's Elements of Medical Genetics, Eleventh ed., Churchill Livingstone, New York, 2011, pp. 372.
- [2] W.R. Wilcox, Lysosomal storage disorders: the need for better pediatric recognition and comprehensive care, *J. Pediatr.* 144 (2004) S3–S14.
- [3] F.M. Platt, Sphingolipid lysosomal storage disorders, *Nature.* 510 (2014) 68–75.
- [4] E. Beutler, G. Grabowski, Gaucher disease, in: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly D. Valle, (Eds.), *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, McGraw-Hill, New York, 2001, pp. 3635–3668.
- [5] C. Enderlin, R. Vogel, P. Conaway, Gaucher disease, *Am. J. Nurs.* 103 (2003) 50–60.
- [6] M. Fuller, T. Rozaklis, M. Lovejov, K. Zarrinkalam, J. Hopwood, P. Meikle, Glucosylceramide accumulation is not confined to the lysosome in fibroblasts from patients with Gaucher disease, *Mol. Genet. Metab.* 93 (2008) 437–443.
- [7] N. Pacheco, A. Uribe, Enzymatic analysis of biomarkers for the monitoring of Gaucher patients in Colombia, *Gene* 521 (2013) 129–135.
- [8] D.J. Sillence, Glucosylceramide modulates endolysosomal pH in Gaucher disease, *Mol. Genet. Metab.* 109 (2013) 194–200.
- [9] Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause or consequence? *Lancet.* 344 (1994) 721–724.

- [10] B. Uttara, A.V. Singh, P. Zamboni, R.T Mahajan, Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options, *Curr. Neuropharmacol.* 7 (2009) 65–74.
- [11] F.M. Roversi, L.C. Galdieri, B.H. Grego, F.G. Souza, C. Micheletti, A.M. Martins, V. D'Almeida, Blood oxidative stress markers in Gaucher disease patients, *Clin. Chim. Acta.* 364 (2006) 316–320.
- [12] M. Deganuto, M.G. Pittis, A. Pines, S. Dominissini, M.R. Kelley, R. Garcia, F. Quadrifoglio, B. Bembi, G. Tell, Altered Intracellular Redox Status in Gaucher Disease Fibroblasts and Impairment of Adaptive Response Against Oxidative Stress, *J. Cell. Physiol.* 212 (2007) 223–235.
- [13] M.W.J. Cleeter, K.Y. Chau, C. Gluck, A. Mehta, D.A. Hughes, M. Duchen, N.W. Wood, J. Hardy, J.M. Cooper, A.H. Schapira, Glucocerebrosidase inhibition causes mitochondrial dysfunction and free radical damage, *Neurochem Int.* 62 (2013) 1–7.
- [14] M. Salvador, J.A.P. Henriques, Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo. Canoas: Ed. da Ulbra, (2004) p.35–36.
- [15] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M.T. Cronim, M. Mazur, J. Telser, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *Int. J. Biochem. Cell. B.* 39 (2007) 44–84.
- [16] A.M. Zahran, K.I. Elsayh, S.E.M. El-Deek, Mona A.H. El-Baz, Oxidative Stress, Trace Elements, and Circulating Microparticles in Patients With Gaucher Disease Before and After Enzyme Replacement Therapy, *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* (2013) DOI: 10.1177/1076029613489595.
- [17] G.S. Ribas, R. Pires, J.C. Coelho, D. Rodrigues, C.P. Mescka, C.S. Vanzin, G.B. Biancini, G. Negretto, C.A.Y. Wayhs, M. Wajner, C.R. Vargas, Oxidative

stress in Niemann-Pick type C patients: a protective role of N-butyl-deoxyjirimycin therapy, *Int. J. Devl. Neuroscience* 30 (2012) 439-444.

[18] W.A. Skoog, W.S. Beck, Studies on the fibrinogen, dextran and phytohemagglutinin methods of isolating leukocytes, *Blood* 11 (1956) 436-54.

[19] C.E. Hollak, S. Van Weely, M.H. Van Oers, J.M. Aerts, Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease, *J. Clin. Invest.* 93 (1994) 1288–1292.

[20] M.P.S. Goldim, C.S. Garcia, C.D. Castilhos, V.V. Daitx, J. Mezzalira, A.C. Breier, J. Cé, A. Mello, C.V. Andrade, N. Sartori, J.C. Coelho, Screening of high-risk Gaucher disease patients in Brazil using miniaturized dried blood spots and leukocyte techniques, *Gene* 508 (2012) 197–198.

[21] K. Suzuki, Y. Suzuki, Globoid cell leucodystrophy (Krabbe's disease): deficiency of galactocerebroside beta-galactosidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 66(1970) 302–309.

[22] S.P. Peters, P. Coyle, R.H. Glew, Differentiation of beta-glucocerebrosidase from beta-glucosidase in human tissues using sodium taurocholate, *Arch. Biochem. Biophys.* 175 (1976) 569–582.

[23] G. Civallero, K. Michelin, J. de Mari, M. Viapiana, M. Burin, J.C. Coelho, R. Giugliani, Twelve different enzyme assays on dried-blood filter paper samples for detection of patients with selected inherited lysosomal storage diseases, *Clin. Chim. Acta* 372 (2006) 98–102.

[24] E.D. Wills, Mechanism of lipid peroxide formation in animal tissues, *Biochem. J.* 99 (1996) 667–676.

- [25] R.L. Levine, D. Garland, C.N. Oliver, A. Amici, I. Climent, B.W. Ahn, Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins, *Meth. Enzymol.* 186 (1990) 464–478.
- [26] M.Y. Akesenov, W.R. Markesbery, Change in thiol content and expression of glutathione redox system gene in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease, *Neurosci. Lett.* 302 (2001) 141–145.
- [27] J.V. Bannister, L. Calabrese, Assays for SOD, *Method. Biochem. Anal.* 32 (1987) 279–312.
- [28] H. Aebi, Catalase in vitro, *Meth. Enzymol.* 105 (1984) 121–126.
- [29] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Radall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–267.
- [30] M. Alfadhel, K. Al-Thihli, H. Moubayed, W. Eyaid, M. Al-Jeraisy, Drug treatment of inborn errors of metabolism: a systematic review, *Arch. Dis. Child.* 98 (2013) 454–61.
- [31] O.A. Bodamer, C. Hung, Laboratory and genetic evaluation of Gaucher disease, *Wien. Med. Wochenschr.* 160(2010) 600–604.
- [32] G.A. Grabowski, Treatment perspectives for the lysosomal storage diseases, *Expert. Opin. Emerg. Drugs.* 13 (2008) 197–211.
- [33] E. Beutler, T. Gelbart, Hematologically important mutations: Gaucher disease, *Blood Cells Mol. Dis.* 23 (1997) 2–7.
- [34] P.J. Guire, A. Parikh, G.A. Diaz, Profiling of oxidative stress in patients with inborn errors of metabolism. *Mol. Genet. Metab.* 98(2009)173–80.
- [35] F.M. Stefanello, C. Matté, C.D. Pederzoli, J. Kolling, C.P. Mescka, M.L. Lamers, A.M. de Assis, M.L. Perry, M.F. dos Santos, C.S. Dutra-Filho, A.T.

Wyse, Hypermethioninemia provokes oxidative damage and histological changes in liver of rats. *Biochimie*. 91(2009) 961–968.

[36] J.C. Rocha, M.J. Martins, Oxidative stress in phenylketonuria: future directions, *J. Inherit. Metab. Dis.*35(2012)381–398.

[37] M.C. Vázquez, E. Balboa, A.R. Alvarez, S. Zanlungo, Oxidative stress: a pathogenic mechanism for Niemann-Pick type C disease, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2012 (2012) 205713.

[38] C.S. Vanzin, G.B. Biancini, A. Sitta, C.A. Wayhs, I.N. Pereira, F. Rockenbach, S.C. Garcia, A.T. Wyse, I.V. Schwartz, M. Wajner, C.R. Vargas, Experimental evidence of oxidative stress in plasma of homocystinuric patients: a possible role for homocysteine. *Mol. Genet. Metab.*104(2011)112–117.

[39] C. Michiels, M. Raes, O. Toussaint, J. Remacle, Importance of SE-glutathione peroxidase, catalase, and CU/ZN-SOD for cell survival against oxidative stress, *Free Radical Bio. Med.* 17 (1994) 235–248.

[40] A.I. Zugno, F.M. Stefanello, E.B.S. Scherer, C. Mattos, C.D. Pederzolli, V.M. Andrade, C.M.D. Wannmacher, M. Wajner, C.S. Dutra-Filho, A.T.S. Wyse, Guanidinoacetate decreases antioxidant defenses and total protein sulfhydryl content in striatum of rats, *Neurochem. Res.* 33 (2008) 1804–1810.

[41] M. Moraitou, E. Dimitriou, N. Dekker, I. Monopolis, J. Aerts, H. Michelakakis, Gaucher disease: plasmalogen levels in relation to primary lipid abnormalities and oxidative stress, *Blood. Cells. Mol. Dis.* 53 (2014) 30–33.

[42] M.L. Urso, P.M. Clarkson, Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation, *Toxicology*. 189 (2003) 41–54.

- [43] L.L. Zwart, J.H.N. Meerman, J.N.M. Commandeur, N.P.E. Vermeulen, Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans, *Free Radical Bio. Med.* 26 (1999) 202–226.
- [44] W. Dröge, Free radicals in the physiological control of cell function, *Physiol. Rev.* 82 (2002) 47–95.
- [45] V.G. Pereira, A.M. Martins, C. Micheletti, V. D’Almeida, Mutational and oxidative stress analysis in patients with mucopolysaccharidosis type I undergoing enzyme replacement therapy, *Clin. Chim. Acta.* 387 (2008) 75–79.
- [46] K.B. Müller, L.C. Galdier, V.G. Pereira, A.M. Martins, V. D’Almeida, Evaluation of oxidative stress markers and cardiovascular risk factors in Fabry Disease patients, *Genet. Mol. Biol.* 35 (2012) 418–423.
- [47] M. Aker, A. Zimran, A. Abrahamov, M. Horowitz, Y. Matzner, Abnormal neutrophil chemotaxis in Gaucher disease, *Br. J. Haematol.* 83 (1993) 187–191.
- [48] A. Zimran, D. Elstein, A. Abrahamov, G.L. Dale, M. Aker, Y. Matzner, Significance of abnormal neutrophil chemotaxis in Gaucher’s disease, *Blood.* 84 (1994) 2374–2375.
- [49] J.A. Casal, L. Lacerda, L.F. Perez, R.A. Pinto, C.S. Miranda, J.C. Tutor, Relationships between serum markers of monocyte/macrophage activation in type 1 Gaucher’s disease, *Clin. Chem. Lab. Med.* 40 (2002) 52–55.
- [50] Y. Liel, A. Rudich, O. Nagauker-Shriker, T. Yermiyahu, R. Levy, Monocyte dysfunction in patients with Gaucher disease: Evidence for interference of glucocerebroside with superoxide generation, *Blood.* 83 (1994) 2646–2653.

## FIGURE CAPTIONS

**Figure 1** –Overview of oxidative damage markers and antioxidant defense markers used in this study: 1. Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS); 2. Carbonyl; 3. Superoxide Dismutase (SOD); 4. Catalase (CAT); 5. Total Sulfhydryl Content (SH).2. Materials and methods.

**Figure 2** – Damage: TBARS and Carbonyl; and Sulfhydryl in the plasma of GD and HC. Data are expressed as mean $\pm$ SD. \*Different letters indicate statistical differences according to ANOVA and Tukey's post-test ( $p < 0.05$ ).

**Figure 3** – Enzyme: CAT; SOD and SOD/CAT ratio in the plasma of GD and HC. Data are expressed as mean $\pm$ SD. \*Different letters indicate statistical differences according to ANOVA and Tukey's post-test ( $p < 0.05$ ).

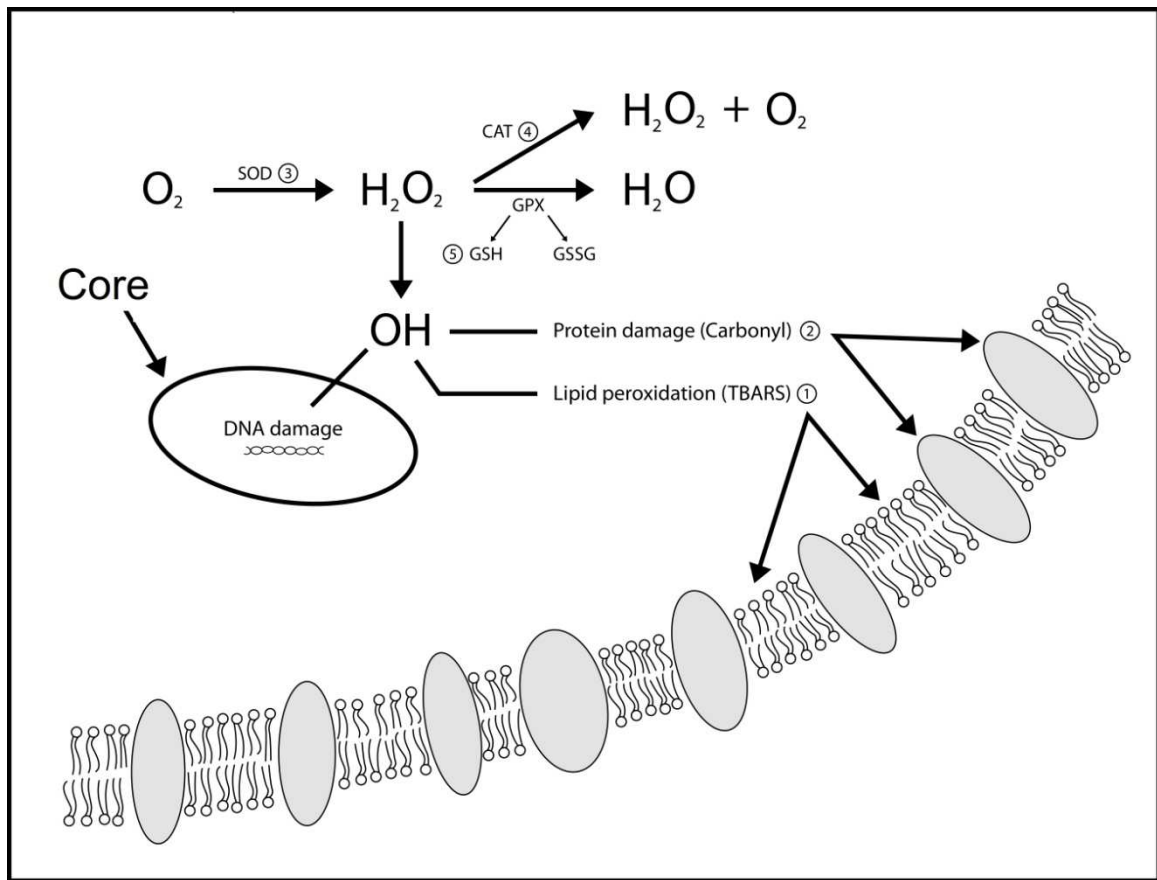


**MELLO et al – Table 1****Table 1.** Enzymatic values of the Gaucher Disease patients and Healthy Controls

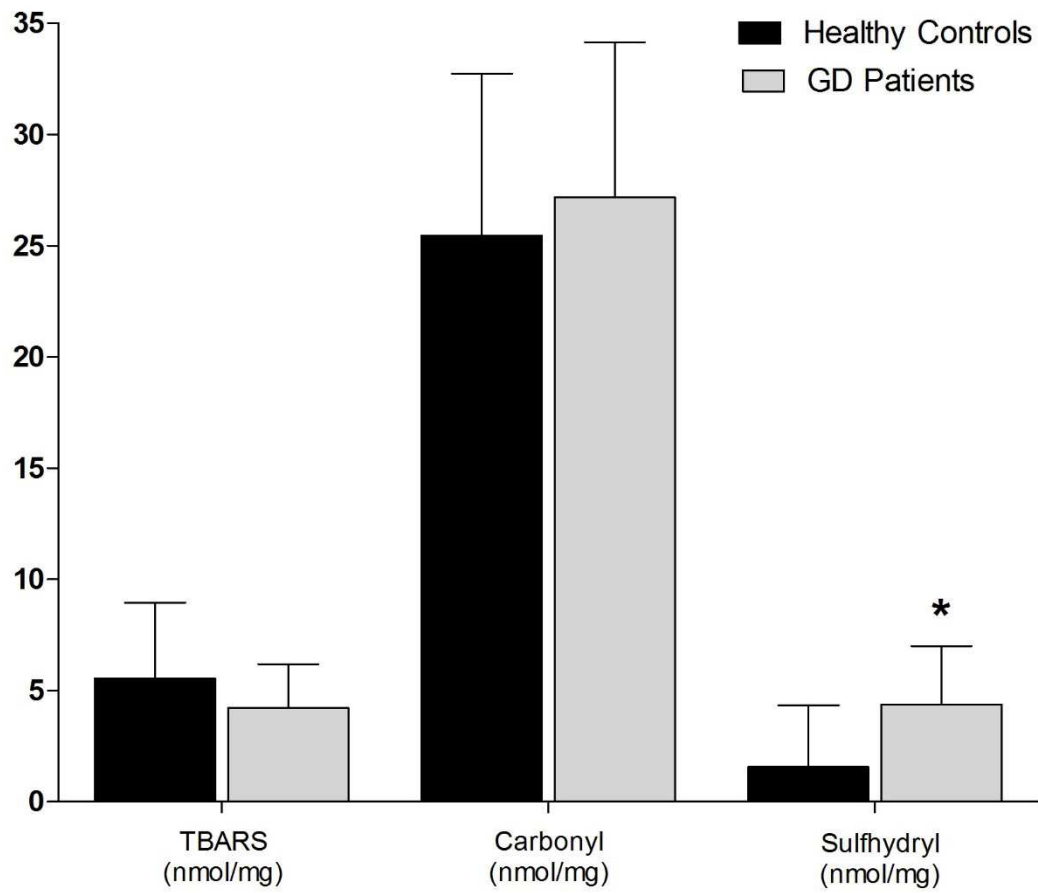
	GD (n=10)	HC (n=11)	p(value)
$\beta$ -glucosidase			
(nmol/h/mg protein)	1.20 $\pm$ 0.80*	15.74 $\pm$ 6.60	0.001
Chitotriosidase			
(nmol/h/mL)	16720,96 $\pm$ 18462.67*	50.23 $\pm$ 44.17	0.019

Abbreviations: GD: Gaucher Disease patients; HC: Healthy Controls. Data are expressed in mean $\pm$ SD. Statistical pvalues were obtained with the Student t test, \*pvalue  $\leq$  0.05 is significant.

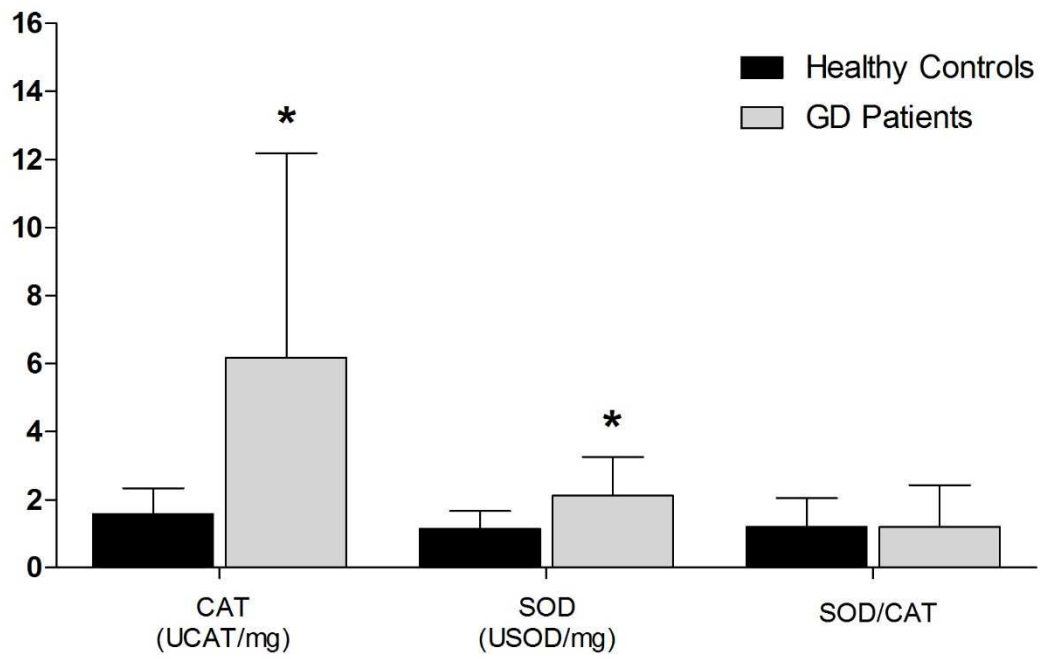
MELLO et al – Figure 1



MELLO et al – Figure 2



MELLO et al – Figure 3



## Capítulo 3.

---

**Resultados adicionais: Correlação entre a medida da atividade da  
Quitotriosidase e a Interleucina 6**

---

## **Materiais e métodos**

### *Amostra*

As amostras de sangue utilizadas como controles saudáveis foram coletadas de doadores de sangue no banco de sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pela equipe responsável pela coleta de sangue. 15 amostras foram coletadas de homens e mulheres em igual distribuição. Estas amostras foram devidamente identificadas com números de forma a preservar a identidade dos doadores, que não tiveram conhecimento dos resultados.

As amostras de leucócitos de pacientes com doença de Gaucher do tipo 1 vieram daqueles pacientes previamente diagnosticados por nosso laboratório. Foram utilizadas 45 amostras de pacientes com DG. O sangue foi coletado pela equipe médica e foi então enviado para o laboratório por uma empresa de transporte especializada em transporte amostras biológicas.

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética da nossa universidade, de acordo com a Declaração Médica Mundial de Helsinki para os princípios éticos em pesquisas clínicas envolvendo seres humanos. Todos os participantes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido antes do início do estudo.

De todos os indivíduos, foram coletados 10mL de sangue em tubos com heparina. O plasma foi separado através de centrifugação à 2500 rpm/10 minutos, alíquotado e congelado a -20°C, para análises posteriores.

### *Grupos analisados*

As amostras foram divididas em 4 diferentes grupos: controles saudáveis (C), pacientes Gaucher sem tratamento (GD), pacientes Gaucher com tempo de tratamento inferior a 10 anos (GD <10) e pacientes Gaucher com tempo de tratamento superior a 10 anos (GD >10), com n=15 para cada grupo.

### *Dosagem de interleucina 6*

A dosagem plasmática de IL-6 foi realizada através do método de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), seguindo as recomendações do fabricante (Mini ELISA Development Kit, PeproTech Inc, USA),

Foram adicionados 100 µL de anticorpo de captura em cada poço e as placas foram incubadas em *overnight* à temperatura ambiente. No dia seguinte, após a lavagem e preparação das placas, foram adicionados 100 µL do padrão ou das amostras em cada poço e as placas foram incubadas por duas horas em temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram aspiradas e lavadas (4x), foram adicionados 100 µL de anticorpo de detecção em cada poço e novamente incubadas em temperatura ambiente por duas horas. Após nova lavagem das placas, foram adicionados 100 µL de avidina peroxidase por poço e uma nova incubação por 30 minutos foi realizada. Por fim, incluíram-se 100 µL de solução de substrato em cada poço e os tubos foram incubados em temperatura ambiente para o desenvolvimento de cor. As leituras das placas foram realizadas em um leitor de ELISA com 405 nm.

### *Ensaio enzimático*

A atividade da enzima quitotriosidase foi medida em plasma, de acordo com a técnica de Hollak 1994, usando o substrato artificial 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-NN'N''-triacetilquitotriosideo. A amostra do ensaio enzimático continha 5  $\mu$ L de plasma acidificado e 100  $\mu$ L do substrato (0,026 mM) dissolvido em tampão citrato100mM-fosfato200mM pH 5,2, num volume total de 105  $\mu$ L. Esta mistura foi incubada durante 15 min a 37°C em incubadora de placas (CT412, Cientec). A reação foi interrompida com 1 mL de tampão glicina-hidróxido sódio 0,5M pH 10,3. Após a incubação uma alíquota de 200  $\mu$ L foi transferida para uma placa preta de 96 poços (Perkin-Elmer, 96F) e a fluorescência foi lida com espectrofluorímetro SpectraMax M5, Molecular Devices (comprimentos de onda de excitação e emissão de 365 e 450nm, respectivamente).

### *Análise Estatística*

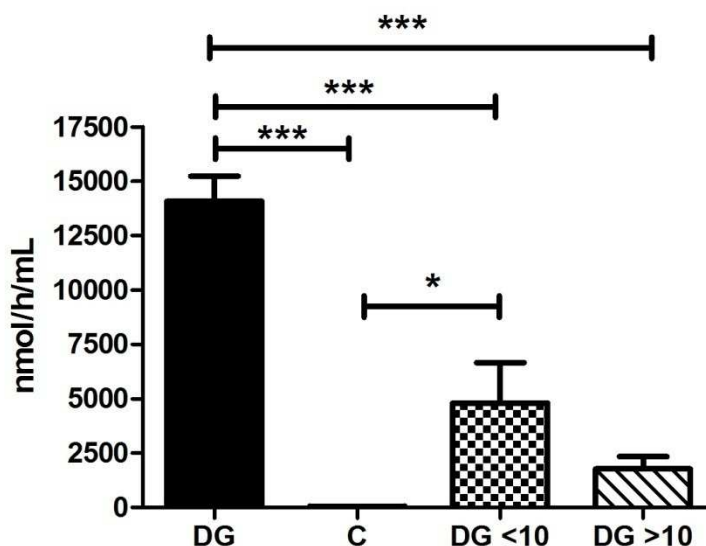
Os dados foram reportados como média  $\pm$  desvio padrão. As dosagens dos quatro grupos, bem como a relação da medida da atividade da QT com a IL-6 nestes grupos, foram comparadas por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tuckey ou Bonferroni, quando significativa ( $p < 0,05$ ) utilizando o programa GraphPad Prism 5.

Para a correlação entre os dois parâmetros (IL-6 e quitotriosidase), foi utilizada o teste de correlação de Spearman ( $p < 0,05$ ) desenvolvido no programa GraphPad Prism 5.



## Resultados

A atividade da enzima quitotriosidase apresentou-se significativamente aumentada em pacientes DG sem tratamento quando comparada aos indivíduos normais (figura 1). Após instituído o tratamento, a QT diminuiu significativamente ( $p < 0,0001$ ) em relação aqueles indivíduos sem tratamento. Até 10 anos de tratamento, a atividade da QT ainda diferia significativamente daquela dos indivíduos normais ( $p < 0,01$ ), mas após este período a atividade enzimática entre os grupos não diferiu, embora visualmente continuava mais elevada.



**Figura 1.** Medida da atividade da enzima quitotriosidase em pacientes com doença de Gaucher sem tratamento por terapia de reposição enzimática (DG), controles saudáveis (C), pacientes com doença de Gaucher em tratamento por até 10 anos (DG <10) e pacientes com doença de Gaucher em tratamento acima de 10 anos (DG >10) (n= 15 por grupo). Os resultados estão expressos com média±desvio padrão dos indivíduos analisados. Diferença significativa entre os grupos: DG e C (\*\*p < 0,0001), DG e DG<10 (\*\*p<0,0001), DG e DG>10 (\*\*p < 0,0001) e G DG<10 e C (\*p<0,01)(ANOVA de uma via seguida por teste de Bonferroni)

De posse do conteúdo da IL-6 (capítulo 1) e da atividade da enzima QT em todos os grupos, verificamos se havia uma correlação entre estes dois parâmetros. Para isto foi utilizada a correlação de Spearman, relacionando cada um dos grupos estudados.

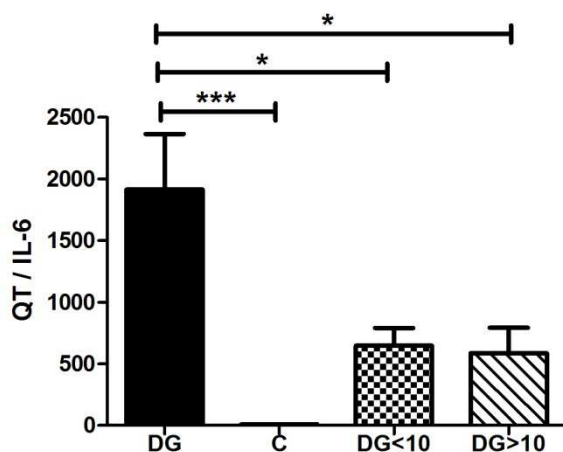
Indivíduos normais não possuem correlação entre a atividade da QT e o conteúdo de IL-6 ( $r = 0,15$   $p < 0,65$ ). O mesmo serve para pacientes com DG

sem tratamento, ou seja, mesmo estes pacientes possuindo um conteúdo significativamente aumentado de IL-6 em relação aos indivíduos normais, e uma atividade da QT também acima do normal, não há uma correlação entre as duas ( $r = 0,06$ ,  $p < 0,86$ ).

Já quando comparamos a atividade da QT e o conteúdo de IL-6 de pacientes com DG em tratamento por reposição enzimática há menos de 10 anos, observamos uma correlação positiva ( $r = 0,81$ ,  $p < 0,01$ ). O mesmo acontece com aqueles pacientes com mais de 10 anos de tratamento ( $r = 0,89$ ,  $p < 0,001$ ).

Na busca de uma ferramenta para o auxílio do acompanhamento de pacientes DG, dividimos a atividade da enzima Quitotriosidase e os níveis de IL-6, em uma razão QT/IL-6. Após analisarmos os dados (figura 2), obtivemos uma diferença significativa entre os grupos DG e C ( $p < 0,0001$ ), entre os grupos DG e DG com menos de 10 anos de tratamento ( $DG < 10 = p < 0,01$ ), e também entre os grupos DG e DG com mais de 10 anos de tratamento ( $DG > 10 = p < 0,01$ ).

Não foi observada diferença significativa entre os dois grupos de pacientes em tratamento, ou seja,  $DG < 10 = DG > 10$ .



**Figura 2.** Relação entre a atividade da enzima Quitotriosidase e os níveis séricos de IL-6 (QT/IL-6). Os resultados estão expressos como média±desvio padrão dos indivíduos analisados. Diferença significativa entre os grupos: DG e C (\*\* $p < 0,0001$ ), DG e DG < 10 (\* $p < 0,01$ ) e DG e DG > 10 (\* $p < 0,01$ ). (ANOVA de uma via seguida de teste de Bonferroni)

## **DISCUSSÃO**

## DISCUSSÃO

Os Erros Inatos do Metabolismo constituem-se em um grupo heterogêneo de doenças genéticas raras, caracterizadas pela presença de mutações patogênicas em genes que codificam proteínas, principalmente enzimas envolvidas em alguma rota metabólica. Essas alterações nas rotas metabólicas podem causar acúmulos anormais de substratos. Esses substratos por sua vez podem acumular no interior das células ou serem desviados para uma rota metabólica alternativa, afim de diminuir a concentração destes substratos, podendo muitas vezes acumular produtos tóxicos ao organismo (Picon et al. 2010; Scolamiero et al. 2015). A acumulação de metabólitos tóxicos é apontada como a principal rota de formação de espécies reativas podendo gerar um quadro de estresse oxidativo (Ribas et al. 2010; Deon et al. 2007).

A Doença de Gaucher é um EIM de herança autossômica recessiva, e também a doença lisossômica de depósito mais freqüente. A DG é causada pela deficiência da atividade da enzima GBA, que é responsável pela degradação da glicosilceramida. A diminuição ou ausência da atividade da GBA, resulta no acúmulo intracelular da glicosilceramida, formando as chamadas Células de Gaucher. As células de Gaucher estão relacionadas com um amplo espectro de sintomas como anormalidades esqueléticas, comprometimento do sistema nervoso, disfunções orgânicas e acúmulo de lipídios complexos nos tecidos (Scriver et al. 2000).

Outra enzima relacionada com a DG é a quitotriosidase, sendo que o aumento na atividade da QT nessa doença é significativo quando comparado à atividade encontrada em indivíduos normais, chegando a 600 vezes. A relação entre o aumento da atividade da enzima QT e a DG ainda é desconhecida,

contudo observou-se que com o tratamento de reposição enzimática (TRE) há um decréscimo nessa atividade, sendo assim o parâmetro mais usado para avaliação da eficácia do tratamento (Rodrigues et al. 2009; Sheth et al. 2010). Contudo esse decréscimo não chega aos níveis de normalidade, estabilizando em um patamar entre o valor estimado para os DG não tratados e os indivíduos saudáveis.

A relação do aumento da atividade da QT com a doença de Gaucher pode ser prejudicada em indivíduos que apresentam mutações no gene *CHIT1* (gene que codifica a enzima QT). Mutações nesse gene podem levar a uma diminuição na atividade da QT, o que não auxiliaria no diagnóstico da DG, já que a atividade desta enzima é um dos principais marcadores auxiliares no diagnóstico da doença (Lee et al. 2007). A QT é considerada parte da imunidade inata e pode apresentar-se elevada em outras doenças como alergias, asma e infecções fúngicas (Ramanathan et al. 2013).

Seguindo a linha de pensamento acima, seria muito importante para os pacientes DG a utilização também de outro biomarcador, no caso destes pacientes apresentarem mutações no gene da QT e/ou apresentarem uma estabilização na atividade da QT devido a instituição do tratamento por reposição enzimática.

Estudos sugerem que a acumulação de glicosilceramidas em macrófagos desencadeia eventos que contribuem para o aumento da produção de monócitos e neutrófilos e proteínas de quimioatração como IL-6, TNF-  $\alpha$  e IL-1 (Pandey & Grabowski 2013; Boot et al. 2010; Mikosch et al. 2008; Elstein et al. 2003). Na DG esse acúmulo pode fazer com que ocorra o recrutamento de neutrófilos e a transformação de monócitos em macrófagos ativados e células

dendríticas, iniciando assim reações inflamatórias nos tecidos viscerais (Pandey & Grabowski 2013). Esse processo ainda não está bem estabelecido na DG.

A modificação do padrão destas proteínas na GD, nos levou a estudar o efeito do tratamento por reposição enzimática nos níveis destes compostos.

A citocina pró-inflamatória interleucina 6 é produzida por uma diversificada gama de células incluindo monócitos, e tem sido implicada na função de modulação dos macrófagos. A IL-6 é capaz de modular a transição da inflamação aguda para crônica, alterando o infiltrado leucocitário a partir de neutrófilos polimorfonucleares de monócitos e macrófagos (Ramanathan et al. 2013). Além da ação pró-inflamatória a IL-6 também pode atuar como uma miocina anti-inflamatória durante o exercício físico (Pedersen et al. 2008).

A IL-6 também é produzida por osteoblastos, mas o mecanismo de produção ainda não está bem elucidado. Concentrações elevadas de IL-6 no plasma de pacientes DG podem ter como reflexos o desenvolvimento de lesões ósseas, sintoma normalmente associado a esta doença (Hughes & Howells 1993). A IL-6 tem efeitos fundamentais sobre o esqueleto, é uma potente estimuladora da reabsorção e diminuição da formação ósseas em culturas calvarianas (Hughes & Howells 1993; Barak et al. 1999). Considerando esses efeitos da IL-6 na estrutura esquelética, os altos níveis dessa citocina em pacientes DG podem contribuir para o déficit na remodelação óssea (Barak et al. 1999). Outros trabalhos na literatura já demonstraram um aumento desta citocina em pacientes DG sem tratamento (Wakusawa et al. 2010; Mikosch et al. 2008; Wajner 2009).

Dados anteriores do nosso grupo (Wajner 2009) assim como os dados encontrados neste trabalho corroboraram com estes trabalhos. Observamos que

pacientes com DG ainda sem tratamento, apresentam um nível de IL-6 duas vezes maior comparado aos indivíduos normais.

Seguindo a linha de pensamento acima, com a introdução do tratamento, era esperado que o nível de IL-6 em pacientes com DG voltaria ao normal ou pelo menos próximo a isto. Pelos resultados, observamos que os níveis de IL-6 diminuíram significativamente chegando próximo ao valor esperado para controles saudáveis, sendo isto o resultado, provavelmente, da diminuição das lesões ósseas destes pacientes. (Allen et al. 1997; Barak et al. 1999). Ao encontro desse resultado espera-se que com o aumento do tempo de tratamento ocorra uma diminuição dos níveis da IL-6, aproximando-se cada vez mais dos níveis normais, sendo um reflexo da diminuição das lesões ósseas. Não observamos diferença significativa entre os pacientes com menor e maior tempo de tratamento, mas demonstramos uma tendência de que quanto maior o tempo de tratamento menor são os níveis séricos de IL-6.

O TNF foi inicialmente identificado em 1968 como uma citocina com efeito antitumoral *in vitro* e *in vivo*. Pesquisas posteriores identificaram 18 diferentes membros da família do TNF, sendo que, estes podem ser identificados em uma variedade de doenças como tumorigenesis, choque séptico, replicação viral, reabsorção óssea, artrite reumatóide, diabetes e doenças inflamatórias crônicas (Gaur & Aggarwal 2003). O TNF- $\alpha$  foi descrito também como causador indireto de resistência a insulina, pois aumenta a liberação de ácidos graxos livres do tecido adiposo (Pedersen & Brandt 2010).

O TNF- $\alpha$  é produzido no tecido muscular, adiposo e linfóide por macrófagos ativados. Dentre as suas funções, encontra-se, mediar interações endoteliais, pela indução da expressão de moléculas de adesão. Ele age

interagindo com receptores das células endoteliais induzindo o aumento da permeabilidade vascular, permitindo assim o acesso de leucócitos aos locais de infecção (Terlikowski 2001; Walsh et al. 1991).

Nossos dados não demonstraram uma diferença significativa entre os níveis séricos de TNF- $\alpha$  de pacientes com DG sem tratamento e aqueles indivíduos normais. Isso nos leva a acreditar que a diminuição na quantidade de tecido adiposo apresentada pelos pacientes DG (Costa & Duarte 2006) pode ter mantido a secreção de TNF- $\alpha$  em níveis normais (Altarescu et al. 2005; Michelakakis et al. 1996; Terlikowski 2001).

Já para pacientes Gaucher em tratamento obtivemos um pequeno aumento nos níveis séricos quando comparados aos pacientes sem tratamento, porém, este aumento não foi significativo demonstrando uma tendência a elevar-se com o tempo de tratamento. Esta resposta vem ao encontro com a resposta clínica dos pacientes, que, com o tratamento por reposição enzimática, apresentam melhora em seu quadro ósseo e visceral. O aumento do TNF poderia induzir um aumento na permeabilidade das membranas do endotélio, como já foi demonstrado (Walsh et al. 1991) facilitando a circulação o que diminuiria o quadro visceral e ósseo (Walsh et al. 1991).

Assim como o TNF- $\alpha$  a interleucina 17a pode acelerar a resposta inflamatória pela estimulação de vários tipos de citocinas inflamatórias. A IL-17a desempenha funções de proteção e defesa do hospedeiro contra certos patógenos nas barreiras epiteliais e mucosas (Ma et al. 2015). Foi descrita com importante citocina inflamatória na rota de infecções bacterianas e fúngicas, e em doenças inflamatórias do intestino, onde os níveis séricos de IL-17a apresentam-se aumentados (Wang et al. 2014). A citocina IL-17a tem sido



associadas a várias doenças autoimunes, incluindo a esclerose múltipla, artrite reumatóide, doença inflamatória do intestino e psoríase (Ma et al. 2015).

Como a IL-17a não possui função bem elucidada no processo inflamatório da DG, optamos por comparar seus níveis nestes pacientes com e sem tratamento. Contudo, não observamos nenhuma diferença significativa, o que mostrou que esta interleucina não parece ser uma boa ferramenta para o acompanhamento dos pacientes DG tipo 1 em tratamento por reposição enzimática. Os trabalhos que descrevem elevações nos níveis da IL-17a, geralmente estão envolvidos com doenças que, na grande maioria, apresentam sintomas intestinais assim como a Doença de Crohn e colite ulcerativa, um sintoma que não é característico de pacientes com DG o que pode explicar o fato desta interleucina não estar elevada nestes pacientes (Sahin et al. 2014; Wang et al. 2014).

O cálcio é um segundo mensageiro intracelular universal bem conhecido, que desempenha um papel regulador nos processos como a condução e transmissão de impulsos nervosos, contração muscular, motilidade, crescimento e diferenciação celular, expressão gênica, correlação entre enzimas de diferentes sistemas, apoptose e necrose. As proteínas S100 constituem uma das famílias de proteínas envolvidas nestas atividades fundamentais, pois são proteínas cálcio moduladoras (Donato 2001; Michelakakis et al. 2007).

Em humanos o aumento dos níveis séricos da S100B está amplamente relacionado com danos cerebrais como traumas e isquemia, doenças neurodegenerativas, neurometabólicas, inflamatórias e doenças psiquiátricas (Michelakakis et al. 2007).

A S100B como descrito na literatura, é utilizada com um marcador de dano neuronal e inflamatório. Pacientes DG tipo 1 apresentam amplo espectro e grau de envolvimento visceral, incluindo organomegalia, anemia, trombocitopenia, dor óssea e doenças ósseas destrutivas, não apresentando acometimento no sistema neuronal. Levando-se isto em consideração, não eram esperadas alterações nos níveis desta proteína.

Em nosso trabalho pacientes DG não apresentaram diferença significativa nos níveis de S100B, quando comparados aos controles saudáveis e aos grupos de pacientes em tratamento por reposição enzimática. Em pacientes com DG tipo 1, a S100B não pode ser considerada uma ferramenta no acompanhamento do tratamento.

Levando em consideração o amplo quadro inflamatório apresentado por pacientes DG devido a presença de células de Gaucher, células estas que são resultado do acúmulo de glicosilceramidas, seria esperada a produção de uma elevada concentração de espécies reativas, principalmente as espécies reativas de oxigênio (EROs) que ganham destaque pela grande reatividade e os danos gerados às biomoléculas.

Radicais livres e EROs são compostos com alto poder oxidativo, que se ligam a uma vasta gama de macromoléculas como DNA, lipídeos e enzimas. Ligam-se, normalmente, para se estabilizar e estabilizar também o elétron desemparelhado (altamente reativo) que está no último orbital atômico da molécula. O balanço entre as espécies reativas e as defesas antioxidantes determina o grau do estresse oxidativo do organismo. O aumento nos níveis de espécies reativas pode resultar em danos a macromoléculas e constituintes celulares. Sinais de estresse oxidativo como envelhecimento e morte celular

significam que rotas redox do metabolismo sofreram alguma modificação ou prejuízo (Villani et al. 2009).

Os lisossomos são muito suscetíveis ao estresse oxidativo, espécies reativas danificam os lisossomos colocando em perigo a sua permeabilidade (Reolon et al. 2009). Ceramidas e glicoesfingolípidos que estão no interior do lisossomo estão envolvidos em vias de transdução de sinal que causam a formação de EROs. Portanto, o desequilíbrio na via dos glicoesfingolípidos característica da DG, pode contribuir para o aumento do nível basal de EROs nas células de Gaucher (Zahran et al. 2015).

Com a presença de células de Gaucher era esperado encontrar algum desbalanço do equilíbrio redox pela produção excessiva de EROs, mas não foi o que nosso trabalho demonstrou. Observamos que houve a produção de EROs porém estas não levaram a um quadro de estresse oxidativo. Isto pode ter ocorrido devido a adaptação das condições basais dos lisossomos para sua sobrevivência. Essa adaptação sugere um controle intracelular, pois foi demonstrado um aumento nos marcadores intracelulares (CAT, SOD e SH), enquanto não houve alterações nos marcadores de membrana celular (TBARS e carbonila), sem causar efeito sobre a peroxidação lipídica e danos as proteínas.

Quitinases são enzimas responsáveis pela hidrólise de quitina e são encontradas em varias espécies de invertebrados. Uma enzima análoga a estas enzimas nos humanos é a quitotriosidase, secretada em grandes quantidades por macrófagos ativados (GIRALDO et al. 2001).

A QT está relacionada com a DG, e acredita-se que o aumento da atividade da QT deve-se à presença das células de Gaucher e o processo inflamatório que estas desencadeiam. Este aumento na atividade da enzima QT

na DG pode chegar a 600 vezes quando comparado à atividade encontrada em indivíduos normais, cuja atividade está dentro da faixa de 32- 180nmol/h/ml em nosso laboratório (Goldim et al. 2012). Esse aumento da atividade em pacientes DG é facilmente identificado e por isso, é considerado um biomarcador para a doença. A relação entre o aumento da atividade da QT e a DG ainda é desconhecida, contudo observou-se que com a TRE há um decréscimo nessa atividade, sendo este considerado o melhor e mais usado parâmetro para avaliação da eficácia do tratamento (Rodrigues et al. 2009; Sheth et al. 2010).

Embora a atividade da QT esteja aumentada na DG e com o tratamento ela diminua, ela, em algum momento do tratamento, estabiliza, nunca chegando a níveis normais. Por esse motivo não sabemos se a dose de enzima artificial usada no tratamento está correta ou deveria ser diminuída ou aumentada.

A IL-6, uma citocina pró-inflamatória, é produzida por muitos tipos de células incluindo macrófagos e tem sido implicada na função de modulação dos macrófagos com o aumento da idade. Esta também é capaz de modular a transição da inflamação aguda para crônica, alterando o infiltrado leucocitário a partir de neutrófilos polimorfonucleares de monócitos e macrófagos (Ramanathan et al. 2013). Pode ser produzida por osteoblastos, mas o mecanismo de produção ainda não está bem elucidado. Por isso, concentrações elevadas de IL-6 no plasma de pacientes DG podem ser relacionadas ao desenvolvimento de lesões ósseas, sintoma normalmente associado a esta doença (Hughes & Howells 1993).

Observamos neste trabalho que os níveis de IL-6 em pacientes DG sem tratamento são significativamente maiores quando comparados aos indivíduos normais, o que poderia estar relacionado com a presença de lesões ósseas.

Observamos também, que, com a instituição do tratamento estes níveis reduzem significativamente, resultado possivelmente da melhora clínica dos pacientes.

Visto que, tanto a QT quanto a IL-6 estão relacionadas com o processo inflamatório, e encontram-se aumentadas na DG, neste trabalho correlacionamos estes dois parâmetros, a fim de encontrar uma nova ferramenta para auxílio no diagnóstico e acompanhamento dos pacientes DG. Esta correlação mostrou-se significativa em pacientes DG em tratamento, demonstrando que quanto maior a diminuição da atividade da QT, devido a eficácia do tratamento, menor os níveis de IL-6 no plasma destes pacientes.

Calculamos também uma relação entre a atividade da QT e os níveis de IL-6. Essa relação mostrou-se significativa quando comparado os grupos DG e C, DG e DG<10 e DG e DG>10, o que pode ser usado como ferramenta no acompanhamento dos pacientes DG, embora não haja diferença entre o tempo de tratamento.

Após analisar as correlações e a relação entre a QT e a IL-6 dos grupos estudados neste trabalho, observamos que a IL-6 funciona de maneira semelhante a QT, ou seja, após um período prolongado de tratamento a IL-6 estabiliza em um patamar superior aos níveis considerados normais, o que não seria ideal para um novo biomarcador. Porém, esse parâmetro pode ser utilizados em pacientes que possuem mutações no gene que codifica a QT, servindo como ferramenta no diagnóstico e acompanhamento destes pacientes. Estes pacientes possuem deficiência na atividade da QT e, quando são indivíduos com doença de Gaucher, a atividade desta enzima não pode ser utilizada como biomarcador em nenhuma fase do tratamento. Com isso, podemos sugerir que a dosagem dos níveis séricos de IL-6 seja inserido nos

protocolos clínicos da doença de Gaucher como biomarcador da eficácia do tratamento.

Sendo assim, os resultados deste trabalho demonstraram que o acúmulo de glicosilceramidas nos lisossomos gerou alterações no organismo dos pacientes com DG como aumento da atividade da QT, aumento nos níveis de citocinas inflamatórias como IL-6 e também um aumento nas defesas enzimáticas e não enzimáticas sem causar efeito sobre a peroxidação lipídica e danos a proteínas.

**CONCLUSÃO**

## CONCLUSÃO

A partir dos resultados encontrados neste estudo com pacientes Gaucher tipo 1 sem tratamento e com tratamento por reposição enzimática inferior e superior a 10 anos, foi possível concluir que:

1. O nível de IL-6 no plasma de pacientes DG foi significativamente maior comparado ao grupo C e pacientes DG<10 e DG>10; demonstrando que a IL-6 pode ser uma boa ferramenta para diferenciar o grupo de pacientes sem tratamento daqueles com tratamento inferior e superior a 10 anos e entre estes e os indivíduos saudáveis.
2. O nível sérico do TNF-a não apresentou diferenças significativas entre os pacientes DG com e sem tratamento e entre estes e os indivíduos saudáveis; demonstrando não ser uma ferramenta para acompanhamento de pacientes DG;
3. A IL-17a não apresentou diferença significativa entre os grupos de pacientes analisados e entre estes e os indivíduos normais, demonstrando não ser uma ferramenta para o diagnóstico e avaliação do tratamento da DG;
4. A proteína S100B não apresentou diferença significativa entre os grupos de pacientes analisados e entre estes e os indivíduos normais, demonstrando não ser uma ferramenta para o diagnóstico e avaliação do tratamento da DG;



5. Pacientes com doença de Gaucher apresentam aumento na produção de espécies reativas, contudo estas não foram capazes de gerar um dano oxidativo, possivelmente por um aumento nas defesas antioxidantes do organismo. Pois:
- a) A maior quantidade de sulfidrilas foi encontrada em pacientes DG comparado aos controles saudáveis, indicando que a ampla atividade do grupo SH pode estar diretamente relacionada ao controle da peroxidação lipídica.
  - b) Não foi encontrada diferença significativa nos níveis plasmáticos de TBARS, marcador de peroxidação lipídica, entre os grupos estudados.
  - c) Não foram encontradas mudanças entre os valores de grupos carbonila, em pacientes GD.
  - d) Observou-se um aumento na quantidade de atividade da enzima antioxidante catalase (CAT) em pacientes em comparação com indivíduos saudáveis.
  - e) Observamos também um aumento dos níveis de SOD em pacientes GD em comparação aos indivíduos saudáveis, o que pode explicar o controle dos níveis de anions superóxido, porque o aumento dos níveis de SOD evitaria uma alteração nos processos de oxidação, tais como danos de proteína.
6. Há uma correlação entre a atividade da enzima quitotriosidase e os níveis de interleucina 6 no plasma de pacientes com doença de Gaucher após instituição do tratamento por reposição enzimática.

7. A relação entre a QT e a IL-6 apresentou diferença significativa entre o grupo DG e os demais grupos. Com isso, a IL-6 mostrou funcionar de forma semelhante a QT podendo ser utilizada como ferramenta para o diagnóstico e acompanhamento da TRE nos pacientes DG, principalmente em pacientes que apresentam deficiência na QT.

Com isso, conclui-se que os processos inflamatórios e oxidativos ocorrem nos pacientes com doença de Gaucher, mas na sua grande maioria não apresentaram-se como boas ferramentas para o acompanhamento destes pacientes durante o tratamento por reposição enzimática, exceto a interleucina 6 que demonstrou ser uma forte candidata a novo biomarcador para a doença podendo ser utilizada concomitantemente a quitotriosidase ou em substituição a essa quando o paciente apresentar deficiência na atividade desta enzima.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen, M.J.J. et al., 1997. Pro-inflammatory cytokines and the pathogenesis of Gaucher's disease: increased release of interleukin-6 and interleukin-10. *QJ Med*, 90(1), pp.19–25.
- Altarescu, G. et al., 2003. The interleukin-6 promoter polymorphism in Gaucher disease: A new modifier gene? *QJM - Monthly Journal of the Association of Physicians*, 96, pp.575–578.
- Altarescu, G. et al., 2005. TNF- $\alpha$  levels and TNF- $\alpha$  gene polymorphism in type I Gaucher disease. *Cytokine*, 31, pp.149–152.
- Barak, V. et al., 1999. Cytokines in Gaucher's disease. *European Cytokine Network*, 10(2), pp.205–10.
- Barschak, A.G. et al., 2006. Evidence that oxidative stress is increased in plasma from patients with maple syrup urine disease. *Metabolic brain disease*, 21(4), pp.279–86.
- Boot, R.G. et al., 2010. Plasma chitotriosidase and CCL18 as surrogate markers for granulomatous macrophages in sarcoidosis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 411(1-2), pp.31–6.
- Van Breemen, M.J. et al., 2009. Different dose-dependent correction of MIP-1 $\beta$  and chitotriosidase during initial enzyme replacement therapy. *Journal of inherited metabolic disease*, 32(2), pp.274–9.
- Cabrera-Salazar, M.A. et al., 2004. Correlation of surrogate markers of Gaucher disease. Implications for long-term follow up of enzyme replacement therapy. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 344(1-2), pp.101–7.
- Cavaillon, J.M., 2005. Molecular mediators: Cytokines. In *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*. pp. 431–460.
- Costa, J. V. & Duarte, J.S., 2006. Tecido adiposo e adipocinas. *Acta Medica Portuguesa*, 19, pp.251–256.
- Cox-Brinkman, J. et al., 2008. Potential efficacy of enzyme replacement and substrate reduction therapy in three siblings with Gaucher disease type III. *Journal of inherited metabolic disease*, 31(6), pp.745–52.
- Danks, D.M., 1988. *The mild form of Menkes disease: progress report on the original case.*
- Deon, M. et al., 2007. Induction of lipid peroxidation and decrease of antioxidant defenses in symptomatic and asymptomatic patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *International journal of developmental neuroscience* :

*the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 25(7), pp.441–4.

- Donato, R., 2001. S100: A multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 33, pp.637–668.
- Elstein, D., Altarescu, G. & Zimran, A., 2003. Platelet Counts and Interleukin-6 (IL-6) Promoter Polymorphism in Patients with Gaucher Disease. *Hematology*, 8(December), pp.367–368.
- Ferreira, A.L.A. & Matsubara, L.S., 1997. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 43, pp.61–68.
- De Fost, M. et al., 2008. Immunoglobulin and free light chain abnormalities in Gaucher disease type I: data from an adult cohort of 63 patients and review of the literature. *Annals of hematology*, 87(6), pp.439–49.
- Fost, M. De et al., 2006. Increased incidence of cancer in adult Gaucher disease in Western Europe i. , 36, pp.53–58.
- Fuseti, F. et al., 2002. Structure of human chitotriosidase. Implications for specific inhibitor design and function of mammalian chitinase-like lectins. *The Journal of biological chemistry*, 277(28), pp.25537–44.
- Futerman, A.H. & van Meer, G., 2004. The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 5(July), pp.554–565.
- Gaur, U. & Aggarwal, B.B., 2003. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochemical pharmacology*, 66(8), pp.1403–8.
- GIRALDO, P. et al., 2001. Chitotriosidase genotype and plasma activity in patients with type 1 Gaucher's disease and their relatives (carriers and non-carriers). *Hematology & Medicine*, 86(september), pp.977–984.
- Giraldo, P. et al., 2006. Short-term effect of miglustat in every day clinical use in treatment-naïve or previously treated patients with type 1 Gaucher's disease. *Haematologica*, 91(5), pp.703–6.
- Goldim, M.P.D.S. et al., 2012. Screening of high-risk Gaucher disease patients in Brazil using miniaturized dried blood spots and leukocyte techniques. *Gene*, 508(2), pp.197–198.
- Halliwell, B. & Whiteman, M., 2004. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British journal of pharmacology*, 142(2), pp.231–55.

- Hollak, C.E. et al., 1997. Elevated levels of M-CSF, sCD14 and IL8 in type 1 Gaucher disease. *Blood cells, molecules & diseases*, 23(2), pp.201–12.
- Hollak, C.E.M. et al., 1994. Marked Elevation of Plasma Chitotriosidase Activity. A Novel Hallmark of Gaucher Disease. *Jornaul Clinical Investigation*, 93(March), pp.1288–1292.
- Hoogeboom, D. & Burgering, B.M.T., 2009. Should I stay or should I go: beta-catenin decides under stress. *Biochimica et biophysica acta*, 1796(2), pp.63–74.
- Hughes, F.J. & Howells, G.L., 1993. Interleukin-6 inhibits bone formation in vitro. *Bone and mineral*, 21(1), pp.21–8.
- El Husny, A.S. & Caldato, M.C.F., 2006. Erros Inatos Do Metabolismo: Revisão De Literatura. *Revista Paraense de Medicina*, 20(2), pp.41–45.
- Jin, W. & Dong, C., 2013. IL-17 cytokines in immunity and inflammation. *Emerging Microbes & Infections*, 2(000), p.e60.
- Kornfeld, S., 1992. Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors. *Annual review of biochemistry*, 61, pp.307–30.
- Kwapiszewski, R. et al., 2011. Substrate inhibition of lysosomal hydrolases:  $\alpha$ -Galactosidase A and  $\beta$ -glucocerebrosidase. *Clinical biochemistry*, 44(10-11), pp.941–3.
- Lee, P. et al., 2007. Human chitotriosidase polymorphisms G354R and A442V associated with reduced enzyme activity. , 39, pp.353–360.
- Locksley, R.M., Killeen, N. & Lenardo, M.J., 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. *Cell*, 104, pp.487–501.
- Ma, Q.-Y. et al., 2015. Interleukin 17A genetic variations and susceptibility to non-small cell lung cancer. *APMIS*, 123(3), pp.194–198.
- Mak, C.M. et al., 2013. Inborn errors of metabolism and expanded newborn screening: review and update. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 50(6), pp.142–62.
- Malaguarnera, L. et al., 2004. Prolactin induces chitotriosidase gene expression in human monocyte-derived macrophages. *Immunology letters*, 94(1-2), pp.57–63.
- Michelakakis, H. et al., 1996. Plasma tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) levels in Gaucher disease. *Biochimica et biophysica acta*, 1317(3), pp.219–22.
- Michelakakis, H. et al., 2007. Serum S100B levels in X-linked adrenoleukodystrophy and Gaucher disease. *Journal of inherited metabolic disease*, 30(5), p.822.

- Mikosch, P. et al., 2008. Changes of bone metabolism in seven patients with gaucher disease treated consecutively with imiglucerase and miglustat. *Calcified Tissue International*, 83, pp.43–54.
- Orchard, P.J. et al., 2011. Chitotriosidase as a biomarker of cerebral adrenoleukodystrophy. *Journal of neuroinflammation*, 8, p.144.
- Pacheco, N. & Uribe, A., 2013. Enzymatic analysis of biomarkers for the monitoring of Gaucher patients in Colombia. *Gene*, 521(1), pp.129–35.
- Pandey, M.K. & Grabowski, G.A., 2013. Immunological cells and functions in Gaucher disease. *Critical reviews in oncogenesis*, 18(3), pp.197–220.
- Pedersen, B.K. & Brandt, C., 2010. The role of exercise-induced myokines in muscle homeostasis and the defense against chronic diseases. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010.
- Pedersen, B.K., Febbraio, M.A. & Introduction, I., 2008. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiological reviews*, 88, pp.1379–1406.
- Pereira, V.G. et al., 2008. Mutational and oxidative stress analysis in patients with mucopolysaccharidosis type I undergoing enzyme replacement therapy. *Clinica Chimica Acta*, 387, pp.75–79.
- Picon, P.D. et al., 2010. Medicamentos de alto custo para doenças raras no Brasil: o exemplo das doenças lisossômicas High cost drugs for rare diseases in Brazil: the case of lysosomal storage disorders. *Ciência e Saúde Coletiva*, 15(supl. 3), pp.3443–3454.
- Platt, F.M., 2014. Sphingolipid lysosomal storage disorders. *Nature*, 510(Table 1), pp.68–75.
- Poll, L.W. et al., 2002. Correlation of bone marrow response with hematological, biochemical, and visceral responses to enzyme replacement therapy of nonneuronopathic (type 1) Gaucher disease in 30 adult patients. *Blood cells, molecules & diseases*, 28(2), pp.209–20.
- Ramanathan, R. et al., 2013. Serum Chitotriosidase, a Putative Marker of Chronically Activated Macrophages, Increases With Normal Aging. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, pp.1–7.
- Reolon, G.K. et al., 2009. Alterations in oxidative markers in the cerebellum and peripheral organs in MPS i Mice. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 29, pp.443–448.
- Ribas, G.S. et al., 2010. Prevention by L-carnitine of DNA damage induced by propionic and L-methylmalonic acids in human peripheral leukocytes in vitro. *Mutation research*, 702(1), pp.123–8.

- Rodrigues, M.D.B. et al., 2009. Chitotriosidase determination in plasma and in dried blood spots: a comparison using two different substrates in a microplate assay. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 406(1-2), pp.86–8.
- Sahin, A. et al., 2014. Serum Interleukin 17 Levels in Patients with Crohn's Disease: Real Life Data. *Disease Markers*, 2014, pp.1–6.
- Saudubray, J.M., Sedel, F. & Walter, J.H., 2006. Clinical approach to treatable inborn metabolic diseases: An introduction. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 29, pp.261–274.
- Scolamiero, E. et al., 2015. Targeted metabolomics in the expanded newborn screening for inborn errors of metabolism. *Mol. BioSyst.*
- Scott, S. a. et al., 2010. Experience with carrier screening and prenatal diagnosis for 16 Ashkenazi Jewish genetic diseases. *Human Mutation*, 31, pp.1240–1250.
- Scriver, C.R., 2008. Garrod's Croonian Lectures (1908) and the charter "Inborn Errors of Metabolism": albinism, alkaptonuria, cystinuria, and pentosuria at age 100 in 2008. *Journal of inherited metabolic disease*, 31(5), pp.580–98.
- Scriver, C.R. et al., 2000. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 4 Volume Set*, McGraw-Hill.
- Sheth, J.J. et al., 2010. Plasma chitotriosidase activity in children with lysosomal storage disorders. *Indian journal of pediatrics*, 77(2), pp.203–5.
- Sies, H., 2015. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox biology*, 4C, pp.180–183.
- Sies, H., 1991. Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klinische Wochenschrift*, 69(21-23), pp.965–8.
- Sitta, A. et al., 2009. L-carnitine blood levels and oxidative stress in treated phenylketonuric patients. *Cellular and molecular neurobiology*, 29(2), pp.211–8.
- Sobreira, E.A.P. & Bruniera, P., 2008. Avaliação de dois anos de tratamento da doença de Gaucher tipo 1 com terapia de reposição enzimática em pacientes do estado de São Paulo , Brasil. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 30(11), pp.193 – 201.
- Sorci, G. et al., 2013. S100B protein in tissue development, repair and regeneration. *World journal of biological chemistry*, 4(1), pp.1–12.
- Stirnemann, J. et al., 2010. Bone events and evolution of biologic markers in Gaucher disease before and during treatment. *Arthritis research & therapy*, 12(4), p.R156.



- Terlikowski, S.J., 2001. Tumour necrosis factor and cancer treatment: a historical review and perspectives. *Roczniki Akademii Medycznej w Białymstoku (1995)*, 46, pp.5–18.
- Villani, G.R.D. et al., 2009. Mucopolysaccharidosis IIIB: oxidative damage and cytotoxic cell involvement in the neuronal pathogenesis. *Brain research*, 1279, pp.99–108.
- Wajner, A. et al., 2007. Comparison between the biochemical properties of plasma chitotriosidase from normal individuals and from patients with Gaucher disease, GM1-gangliosidosis, Krabbe disease and heterozygotes for Gaucher disease. *Clinical biochemistry*, 40(5-6), pp.365–9.
- Wajner, A., 2009. *Estudo das propriedades cinéticas da enzima quitotriosidase humana e dos parâmetros pró-inflamatórios interleucina 6 e fator de necrose tumoral alfa em plasma de pacientes com as doenças de gaucher tipo 1, krabbe e gangliosidose gm1 e de heterozigotos par.* Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Wakusawa, K. et al., 2010. The cytokine and chemokine profiles in rhabdomyolysis in a patient with gaucher disease type II. *Neuropediatrics*, 41(1), pp.39–42.
- Walsh, L.J. et al., 1991. Human dermal mast cells contain and release tumor necrosis factor alpha, which induces endothelial leukocyte adhesion molecule 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(May), pp.4220–4224.
- Wang, Y. et al., 2014. Proinflammatory effects and molecular mechanisms of interleukin-17 in intestinal epithelial cell line HT-29. *World Journal of Gastroenterology*, 20(47), pp.17924–17931.
- Wenger, D. a, Coppola, S. & Liu, S.-L., 2003. Insights into the diagnosis and treatment of lysosomal storage diseases. *Archives of neurology*, 60(3), pp.322–8.
- Ye, H. et al., 2015. Serum S100B levels may be associated with cerebral infarction: a meta-analysis. *Journal of the Neurological Sciences*, 348(1-2), pp.81–88.
- Zahran, A.M. et al., 2015. Oxidative stress, trace elements, and circulating microparticles in patients with Gaucher disease before and after enzyme replacement therapy. *Clinical and applied thrombosis/hemostasis: official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, 21(1), pp.58–65.