



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS**

**TESE DE DOUTORADO**

**Evolução dos sintomas não motores da doença de Parkinson  
em uma coorte de pacientes com doença de Gaucher tipo 1**

**Matheus Vernet Machado Bressan Wilke**

**Orientadora: Profa. Ida Vanessa Doederlein Schwartz**

**Co-orientador: Dr. Fabiano Poswar**

**Porto Alegre**

**2022**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS**

**TESE DE DOUTORADO**

**Evolução dos sintomas não motores da doença de Parkinson  
em uma coorte de pacientes com doença de Gaucher tipo 1**

**Matheus Vernet Machado Bressan Wilke**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Ida Vanessa Doederlein Schwartz**

**Co-orientador: Dr. Fabiano Poswar**

**Porto Alegre**

**2022**



## CIP - Catalogação na Publicação

Vernet Machado Bressan Wilke, Matheus  
Evolução dos sintomas não motores da doença de  
Parkinson em uma coorte de pacientes com doença de  
Gaucher tipo 1 / Matheus Vernet Machado Bressan Wilke.  
-- 2023.  
164 f.  
Orientadora: Ida Vanessa Doederlein Schwartz.

Coorientador: Fabiano Poswar.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de  
Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto  
Alegre, BR-RS, 2023.

1. Doença de Gaucher. 2. Doença de Parkinson . 3.  
Biomarcadores. 4. Lyso-Gbl. 5. Sintomas pré-motores .  
I. Doederlein Schwartz, Ida Vanessa, orient. II.  
Poswar, Fabiano, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## BANCA EXAMINADORA

Dr. Marino Muxfeldt Bianchin (PPGCM)

Dr. Raphael Machado de Castilhos (PPGCM)

Dr<sup>a</sup>. Vânia D'Almeida

Dr<sup>a</sup>. Karina Carvalho Donis



## AGRADECIMENTOS

Os agradecimentos abaixo ganham maior importância por este projeto e esta tese terem sido elaboradas durante a pandemia do SARS-CoV-2. Esse período vai ficar para sempre marcado em nossas vidas como um período de dor coletiva, comprovação da importância da ciência e da importância do senso de comunidade.

Gostaria primeiramente de agradecer ao meu marido Bruno por ser um suporte tão importante na minha vida. Um agradecimento especial aos meus pais, Remo e Maria Eliza, pelo amor incondicional, pelo exemplo e por sermos um time tão especial. Agradeço também a minha avó, Maria de Lourdes, e minha tia, Tânia, que são exemplos de como o estudo e a dedicação são importantes na nossa vida.

Gostaria de agradecer ao meu co-orientador, Dr. Fabiano Poswar, pelo exemplo de tranquilidade e de dedicação, que fazem tanta diferença na rotina. Agradeço à minha orientadora, a Profa. Ida Vanessa Doederlein Schwartz, não somente pela orientação, mas também pela generosidade e zelo comigo, proporcionando-me tantas oportunidades de aprendizagem nos últimos anos como um exemplo de médica e pessoa.

À equipe do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em especial à Devora Randon, Kristiane Michelin e Tássia Tonon por terem me ajudado nas burocracias e na logística das coletas. Agradeço também aos residentes do serviço de Genética Médica pelo apoio nos ambulatórios. A Suélen Basgalupp pela orientação na pesquisa das variantes e para dúvidas teóricas. Ao Dr. Filippo Vairo, também agradeço a parceria e orientação teórica durante minha vida profissional e acadêmica.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em especial ao Prof. Wolnei Caumo, pelos ensinamentos e dicas para deixar o trabalho da melhor forma possível. Aos pacientes, pela paciência e pelo aprendizado! Agradeço também pelo acolhimento, pelo interesse em contribuir de forma voluntária com a ciência e pela troca de experiências em nossos encontros. O aprendizado que tive com vocês foi além do conhecimento acadêmico ou científico.

## RESUMO

**CONTEXTO:** A doença de Gaucher (DG) é um erro inato do metabolismo causado pela atividade deficiente da enzima beta-glucocerebrosidase (GCase), que catalisa a conversão de glicosfingolipídeos (GlcCer) em ceramida e glicose. Já foram descritas mais de 500 variantes no gene que codifica a GCase (*GBA*). Três formas clínicas de DG são convencionalmente classificadas com base no envolvimento neurológico, sendo o tipo 1 (DG1) considerado como a forma não neuropática. A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum, sendo os achados principais dessa doença decorrentes da perda dos neurônios dopaminérgicos e a aparição de inclusões intraneuronais compostas de agregados anormais de proteínas, especialmente alfa-sinucleína ( $\alpha$ SIN), denominadas corpos de Lewy (CL). Os sintomas motores clássicos da DP podem ser precedidos por sintomas não motores (SNM) que incluem: hiposmia, distúrbio comportamental do sono REM, constipação, comprometimento cognitivo e depressão. Estudos populacionais identificaram variantes no *GBA* como o principal fator de risco para a DP idiopática, estando os pacientes com DG incluídos neste grupo. O risco aumentado de DP também foi sugerido em outros distúrbios de armazenamento lisossômico (LSDs), haja visto que a agregação de  $\alpha$ SIN também já foi relatada no cérebro de pacientes e modelos animais de diferentes LSDs, incluindo doença de Fabry, doença de Niemann-Pick, doença de Sandhoff, Doença Tay- de Sachs, entre outras. Faz parte do acompanhamento de pacientes com DG o uso de biomarcadores que não somente auxiliam no diagnóstico, prognóstico e acompanhamento desses pacientes, como também representam etapas da fisiopatologia da doença. Dentre esses biomarcadores, cita-se a lyso-Gb1, formada a partir da desacetilação da glicosilceramida.

**OBJETIVOS:** Avaliar a evolução da prevalência e da gravidade dos SNM da DP em uma coorte de pacientes adultos sul-brasileiros com DG1, já avaliados em 2018. Também tivemos como objetivo avaliar a atividade de outras enzimas lisossômicas ( $\alpha$ -manosidase,  $\beta$ -glucuronidase,  $\beta$ -hexosaminidase) e dos biomarcadores da DG quitotriosidase (ChT) e lyso-Gb1 no líquido cefalorraquidiano (LCR) e em plasma de pacientes com DG1, assim como relacioná-los com parâmetros clínicos e outros exames laboratoriais de seguimento.

**METODOLOGIA:** Trata-se de um estudo transversal aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa local (referência número 200358). Para serem incluídos na análise dos SNM, os pacientes deveriam ter  $\geq 18$  anos,

diagnóstico bioquímico e/ou genético de DG, manifestações clínicas compatíveis com o tipo 1 da doença e já terem realizado avaliação prévia para os SNM em 2018. O recrutamento ocorreu no Centro de Referência para DG do Rio Grande do Sul do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). A cognição foi avaliada pela avaliação cognitiva de Montreal (MoCa); sonolência diurna pela Escala de Epworth (ESS); depressão pelo Inventário de Beck; constipação pela *Unified Multiple System Atrophy Rating Scale*; transtorno de comportamento do sono REM através da triagem de pergunta única. A hiposmia foi avaliada com *Sniffin Sticks* (SST) e os sintomas motores foram avaliados com a parte III da Escala Unificada de Avaliação de Doença de Parkinson. A análise da atividade da beta-glucuronidase, da alfa-manosidase, das hexosaminidases e da ChT foi avaliada conforme previamente publicada na literatura, tendo sua atividade expressa em nmol/h/mL (plasma, CSF) e em nmol/h/mg de proteína (atividade específica para as outras amostras). Os níveis em CSF das enzimas lisossomais supramencionadas e da ChT foram comparados com um grupo controle (leucodistrofia metacromática, MLD). A punção lombar foi realizada após a aplicação do termo de consentimento livre e esclarecido. O procedimento foi realizado por um médico treinado em neurologia clínica e realizado antes da consulta médica de rotina do paciente. A lyso-Gb1 foi quantificada por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa e os resultados foram expressos em nmol/L. Para avaliação dos valores de lyso-Gb1, foram incluídos pacientes com diagnóstico bioquímico e molecular de DG, tanto com DG1 quanto com DG tipos 2 e 3 em acompanhamento no HCPA. **RESULTADOS:** Dezenove pacientes completaram o seguimento (idade média da amostra foi de 44 anos; variação 26-71 anos). O paciente com o maior número de NMS na linha de base (4 incluindo o menor escore SST) foi diagnosticado com DP quatro anos depois. Além de uma melhora na pontuação da ESS, não foi encontrada outra diferença estatisticamente significativa entre o número de NMS avaliados em 2018 e 2021, nem entre pacientes com uma variante L444P (n=5) e o restante da coorte. O LCR foi coletado em cinco pacientes (idade média da amostra foi de 40 anos; variação 30-53 anos). Foi encontrada diferença significativa entre a atividade média da hexosaminidase total (HEX) [média=112.4 nmol/h/mL, DP=57.3 em GD1 versus média=208.2 nmol/h/mL, DP=34.7 no grupo com MLD, p=0.03] e a da beta glucuronidase [média=4.6 nmol/h/mL, DP=34.7 em GD1 versus média=1.1 nmol/h/mL, SD=0.5 no grupo com MLD, p=0.03] no LCR entre os grupos. A ChT média (CSF) foi de 70 nmol/h/mL em pacientes com DG e 142 nmol/h/mL em pacientes com MLD (n=7). Trinta e dois pacientes tratados (vinte e nove GD1 e três) e três pacientes não tratados

(um GD1, um GD3 e um paciente com tipo de DG não especificado) foram incluídos na avaliação da lyso-Gb1. Os níveis de lyso-Gb1 foram significativamente menores em pacientes tratados em relação aos não tratados ( $p=0,002$ ). Ao analisar apenas o grupo GD1 tratado, foi encontrada uma correlação significativa entre lyso-Gb1 e idade ( $p=0.001$ ), quitotriosidase e níveis de IgG ( $p < 0,001$  e  $p=0.03$ , respectivamente). **CONCLUSÕES:** O paciente com maior número de SNM em nossa coorte de 2018 foi o que desenvolveu DP, corroborando a importância deste acompanhamento longitudinal. Hipotetizamos que uma menor atividade de HEX do LCR de pacientes com DG1 possa também contribuir para o aumento do risco de DP encontrado nesses pacientes. Lyso-Gb1 confirmou-se como um biomarcador adequado para discriminar tanto os tipos de DG quanto o status de tratamento, sendo também associado a níveis de IgG em pacientes tratados com DG1.

**Palavras-chave:** Doença de Gaucher; Doença de Parkinson; Sintomas não motores; Lyso-Gb1.

## ABSTRACT

**BACKGROUND:** Gaucher disease (GD) is an inborn error of the metabolism caused by a deficient activity of the enzyme beta-glucocerebrosidase (GCase) that catalyzes the conversion of glycosphingolipids (GlcCer) into ceramide and glucose. More than 500 variants have been described in the gene encoding the GCase (*GBA*). Three clinical forms of GD are conventionally classified based on the neurological involvement, with type 1 (GD1) being considered the non-neuropathic form. Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease with the main clinical findings resulting from the loss of dopaminergic neurons and the development of intraneuronal inclusions formed by abnormal protein aggregates, especially alpha-synuclein ( $\alpha$ SIN), called Lewy bodies (CL). The classic motor symptoms of PD may be preceded by non-motor symptoms (NMS) that include: hyposmia, REM sleep behavior disorder, constipation, cognitive impairment and depression. Population studies have identified *GBA* variants as the main risk factor for idiopathic PD, being GD patients included in this group. The increased risk of PD has also been suggested in other lysosomal storage disorders (LSDs) as  $\alpha$ SIN aggregation has also been reported in the brains of both patients and animal models of different LSDs, including Fabry disease, Niemann-Pick disease, Sandhoff disease, Tay-Sachs disease, among others. The use of biomarkers that not only help in the diagnosis, prognosis and follow-up of these patients, but also represent stages of the pathophysiology of the disease, is part of the monitoring of patients with GD, among these biomarkers there is lyso-Gb1, formed from the deacetylation of glucosylceramide. **OBJECTIVES:** To evaluate the evolution of the prevalence and severity of PD NMS in a cohort of South Brazilian adult patients with GD1, already evaluated in 2018. We also aimed to evaluate the activity of other lysosomal enzymes ( $\alpha$ -mannosidase,  $\beta$ -glucuronidase,  $\beta$ -hexosaminidase) and the GD biomarker chitotriosidase (ChT) and lyso-Gb1 in both cerebrospinal fluid (CSF) and plasma of patients with GD1 and correlate them with clinical parameters and other laboratory tests that are part of the GD follow-up. **METHODOLOGY:** This is a cross-sectional study approved by the local Research Ethics Committee (reference number 200358). To be included in the NMS analysis, patients should be  $\geq 18$  years old, have a biochemical and/or genetic diagnosis of GD and clinical manifestations compatible with type 1 of the disease, and have already undergone a previous assessment for NMS in 2018. Recruitment took place at the Reference Center for GD in Rio Grande do Sul, Hospital de Clínicas de Porto

Alegre (HCPA). Cognition was assessed by the Montreal Cognitive Assessment (MoCa), daytime sleepiness by the Epworth Scale (ESS), depression by the Beck Inventory, constipation by the Unified Multiple System Atrophy Rating Scale, and REM sleep behavior disorder by single-question screening. . Hyposmia was assessed with Sniffin' Sticks (SST) and motor symptoms were assessed with part III of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale. The analysis of beta-glucuronidase, alpha-mannosidase, hexosaminidase, and ChT activity was evaluated as previously published in the literature, with their activity expressed in nmol/h/mL (plasma, CSF) and in nmol/h/mg of protein (specific activity for the other samples). CSF levels of the aforementioned lysosomal enzymes and ChT were compared with a control group (metachromatic leukodystrophy, MLD). Lumbar puncture was performed after application of the free and informed consent form. The procedure was performed by a physician trained in clinical neurology and performed prior to the patient's routine medical appointment. Lyso-Gb1 was quantified by liquid chromatography coupled to mass spectrometry and the results were expressed in nmol/L. To evaluate the lyso-Gb1 values, patients with a biochemical and molecular diagnosis of GD, both with GD1 and GD types 2 and 3, under follow-up at the HCPA, were also included. **RESULTS:** Nineteen patients completed the follow-up (mean age of the sample was 44 years; range: 26-71 years). The patient with the highest number of SMN at baseline (4 including the lowest SST score) was diagnosed with PD four years later. Aside from an improvement in the ESS score, no other statistically significant difference was found between the number of NMS assessed in 2018 and 2021, nor between patients with a L444P variant (n=5) and the rest of the cohort. CSF was collected in five patients (mean age of the sample was 40 years, range 30-53 years). A significant difference was found between the mean total hexosaminidase (HEX) activity (mean=112.4 nmol/h/mL, SD=57.3 in GD1 versus mean=208.2 nmol/h/mL, SD=34.7 in the MLD group, p=0.03 ) and beta glucuronidase (mean=4.6 nmol/h/mL, SD=34.7 in GD1 versus mean=1.1 nmol/h/mL, SD=0.5 in the MLD group, p=0.03) in CSF between groups. Mean ChT (CSF) was 70 nmol/h/mL in patients with GD and 142 nmol/h/mL in patients with MLD (n=7). Thirty-two treated patients (twenty-nine GD1 and three) and three untreated patients (one GD1, one GD3 and one patient with unspecified GD type) were included in the lyso-Gb1 assessment. Lyso-Gb1 levels were significantly lower in treated versus untreated patients (p=0.002). When analyzing only the treated GD1 group, a significant correlation was found between lyso-Gb1 and age (p=0.001), chitotriosidase and IgG levels (p < 0.001 and p=0.03, respectively). **CONCLUSIONS:** The patient with the highest

number of NMS in our 2018 cohort was the one who developed PD, corroborating the importance of this longitudinal follow-up. We hypothesized that lower CSF HEX activity from patients with GD1 may also contribute to the increased risk of PD found in these patients. Lyso-Gb1 was confirmed as a suitable biomarker to discriminate both GD types and treatment status, and was also associated with IgG levels in GD1-treated patients.

**Key words:** Gaucher Disease; Parkinson's Disease; Non Motor Symptoms, lyso-Gb1.

## LISTA DE FIGURAS:

<b>Figura 1 :</b> Fluxograma da estratégia de busca na seleção de informações sobre Doença de Gaucher e Sintomas Não Motores.....	22
<b>Figura 2:</b> Fluxograma da estratégia de busca na seleção de informações sobre Doença de Gaucher e Marcadores Lipídicos.....	23
<b>Figura 3-</b> Figura modificada do Sidransky (2004). Mostrando a rota metabólica da glucocerebrosidase e da glucose esfingosina.....	25
<b>Figura 4-</b> Figura traduzida do Futerman (2006) representando o espectro de fenótipos da Doença de Gaucher.....	27
<b>Figura 5-</b> Linha de tempo da descoberta da Lyso-Gb1 como biomarcador na Doença de Gaucher. Modificado de Revel-Vilk (2020).....	33
<b>Figura 6-</b> Degradação da Glicosilceramida. Modificado de Revel-Vilk(2020).....	35
<b>Figura 7-</b> Traduzida de (BROCKMANN et al., 2011) demonstrando a linha do tempo da associação entre o gene <i>GBA</i> e a Doença de Parkinson.....	45
<b>Figura 8:</b> Hipóteses para a associação entre a glucocerebrosidase e o acúmulo de alfa-sinucleína.....	49
<b>Figura 9 A) e B) -</b> Representação das interações proteicas por meio da ferramenta STRING da Beta glucocerebrosidase ( <i>GBA</i> ) com proteínas relacionadas à Doença de Parkinson (A) e com outras doenças lisossomais (B).....	56
<b>Figura 10-</b> Modificada de Zinram et al 2010. As vias catabólicas de glicoesfingolipídeos selecionadas estão envolvidas em algumas das doenças de armazenamento de glicolipídios. Sólido quadrados representam os caminhos bloqueados causados por deficiências hereditárias específicas de enzimas, que dão origem ao acúmulo de respectivos substratos. ....	59
<b>Figura 11-</b> Progressão da Doença de Parkinson adaptada de AVENALI A figura mostra a fase pré-diagnóstica (fases pré-clínica e prodrômica) e a fase clínica da Doença de Parkinson (DP).(AVENALI et al., 2019).....	63

<b>Figura 12-</b> Resumo das informações sobre risco de Doença de Parkinson em pacientes e familiares de pacientes com Doença de Gaucher.....	71
<b>Figura 13 -</b> Marco conceitual do estudo.....	71

**LISTA DE TABELAS:**

<b>Tabela 1-</b> Exemplo de estudos que analisaram a relação entre a Doença de Parkinson com a Doença de Gaucher e mutações do gene <i>GBA1</i> .....	44
<b>Table 2 -</b> Traduzida e modificada de Han et al 2020 mostrando as pequenas moléculas consideradas terapêuticas para a Doença de Gaucher, o modelo animal no qual foram estudadas e seus efeitos. Gcase Beta-glucuronidase, GlcCer glucosilceramida, GlcSph glucosilesfingosina.....	70

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS:**

ABX : Ambroxol

$\alpha$ SIN: Alfa-sinucleína

BHE: Barreira hemato encefálica

CL: Corpos de Lewy

DG: Doença de Gaucher

DP: Doença de Parkinson

*GBA*: gene que codifica a GCCase

GCCase: beta-gluco cerebrosidase

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

LCR: líquido cefalorraquidiano

LSD: distúrbios de armazenamento lisossômico

Lyso-Gb1: Glicosilesfingosina

MoCa: avaliação cognitiva de Montreal

RE: Retículo endoplasmático

REM: Rapid eye movement

SAP C: Saposina C

SNM: sintomas não motores

SNC: sistema nervoso central

TG: Terapia Gênica

TRE: terapia de reposição enzimática

TRS: terapia de redução de substrato

## SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	18
1. INTRODUÇÃO .....	19
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	21
2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações .....	21
2.2 Capítulo 1- A Doença de Gaucher.....	24
2.3 Capítulo 2 - Lyso-Gb1 como um biomarcador na Doença de Gaucher.....	33
2.4 Capítulo 3- A Descoberta da associação entre a Doença de Gaucher e a Doença de Parkinson.....	42
2.4 Capítulo 4- Hipóteses para a associação entre a Doença de Gaucher e a Doença de Parkinson.....	47
2.5 Capítulo 5 - O papel dos lisossomos na Doença de Parkinson.....	54
2.5 Capítulo 6- Sinais Pré Motores da Doença de Parkinson.....	63
2.6 Capítulo 7- Conclusões e perspectivas da Associação entre as Doenças nos Pacientes .....	68
3. MARCO CONCEITUAL .....	72
4. JUSTIFICATIVA.....	73
5. OBJETIVOS .....	74
6. METODOLOGIA.....	75
7. REFERÊNCIAS .....	79

## SUMÁRIO(cont.)

10. CONCLUSÕES.....	88.
11. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	91
12. PERSPECTIVAS FUTURAS .....	92
13. ANEXOS E APÊNDICES.....	93
13.1 PÔSTERES, PUBLICAÇÕES E PARTICIPAÇÕES EM CONGRESSO.....	99
13.2 DEMAIS PUBLICAÇÕES NO PERÍODO.....	108
13.3 DEMAIS ANEXOS	
APÊNDICE 1 - APROVAÇÃO DO GPPG.....	109
APÊNDICE 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	114
APÊNDICE 3 – ANÁLISE DA FUNÇÃO OLFATIVA.....	115
APÊNDICE 4 – ESCALA DE SONOLÊNCIA DE EPWORTH.....	116
APÊNDICE 5 – AVALIAÇÃO DO SONO REM.....	117
APÊNDICE 6 – AVALIAÇÃO DE CONSTIPAÇÃO.....	118
APÊNDICE 7 – INVENTÓRIO DE DEPRESSÃO DE BECK.....	120
APÊNDICE 8 – MONTREAL COGNITIVE ASSESSMENT.....	121
APÊNDICE 9 – PARTE III UPDRS.....	122
APÊNDICE 10 – STROBE Statement – Checklist para estudos observacionais.....	125

## APRESENTAÇÃO

Esta tese é oriunda do trabalho de doutorado desenvolvido no Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A pesquisa foi desenvolvida no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), com financiamento pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE) do HCPA. Todos os experimentos com seres humanos apresentados neste trabalho foram incluídos no projeto de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA, número 2020-0358.

A presente revisão da literatura será estruturada didaticamente em sete capítulos:

- Capítulo 1: A doença de Gaucher
- Capítulo 2: Lyso-Gb1 como um biomarcador na doença de Gaucher
- Capítulo 3: A descoberta da associação entre a doença de Gaucher e a doença de Parkinson
- Capítulo 4: Hipóteses para a associação entre a doença de Gaucher e a doença de Parkinson
- Capítulo 5: O papel dos lisossomos na doença de Parkinson
- Capítulo 6: Sinais pré-motores da doença de Parkinson
- Capítulo 7: Conclusões e perspectivas da associação entre as doenças nos pacientes

O termo “variantes patogênicas” será utilizado ao longo da tese para denominar tanto variantes patogênicas quanto provavelmente patogênicas, conforme definido pelo *American College of Medical Genetics* (ACMG), para substituir o termo “mutação”, que está em desuso.

## 1 INTRODUÇÃO

A doença de Gaucher (DG, OMIM 230800) é um erro inato do metabolismo causado pela deficiência da enzima lisossomal beta-gluco cerebrosidase (GCCase). A DG é uma das desordens lisossômicas mais prevalentes, com uma incidência mundial de 1 a cada 40.000 nascidos vivos (PASTORES et al., 2018; ZIMRAN et al., 2016; VAIRO et al., 2015). A GCCase é responsável por catalisar a hidrólise da glicosilceramida (GlcCer) em glicose e ceramida. Seu mau funcionamento leva ao acúmulo intracelular de glicocerebrosídeo nos lisossomos dos macrófagos, principalmente no baço, fígado e medula óssea. À medida que o GlcCer se acumula nos macrófagos lisossômicos do sistema reticuloendotelial, ele sofre desacetilação por uma enzima chamada ceramidase ácida para se tornar glicosil esfingosina (lyso-Gb1) [STILES et al. (2021)]. Lyso-Gb1 tem se mostrado um biomarcador útil e confiável para o diagnóstico e o monitoramento de pacientes não tratados com DG [REVEL-VILK; FULLER; ZIMRAN, (2020); COZMA et al. (2020)].

O espectro de gravidade clínica da doença de Gaucher se relaciona, em parte, com o grau de comprometimento da atividade catalítica da enzima GCCase (LU et al., 2010). Três formas clínicas de DG são convencionalmente classificadas com base no envolvimento neurológico. No tipo 1, é considerada a forma não neuropática; no tipo 3, a forma juvenil subaguda neuropática; no tipo 2, a forma aguda neuropática. O gene que codifica a GCCase é chamado de *GBA* (OMIM 606463) e está localizado em uma região rica em genes do cromossomo 1q21. A DG é causada por variantes em ambos os alelos desse gene. Atualmente, mais de 495 variantes patogênicas/provavelmente patogênicas são associadas a esse gene, incluindo inserções, deleções, variantes de ponto, variantes *frameshift* ou recombinação alélica (*The Human Gene Mutation Database*). A variante patogênica mais comum descrita é a c.1226A>G (N370S) (COX et al., 2015).

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum após a doença de Alzheimer (TOMMASO BECCARI et al., 2011). A causa da DP não é completamente conhecida, tendo em vista sua etiologia multifatorial, que envolve o envelhecimento do próprio cérebro, a suscetibilidade genética e fatores ambientais (BEITZ, 2014). O acúmulo de alfa-sinucleína ( $\alpha$ SIN) é considerado o marco central na patogênese da DP. A DP afeta 2% da população acima de 60 anos e 4% da população acima de 80 anos (TOMMASO BECCARI et al.,

2011). O tratamento atual da DP é sintomático, sem efeito na própria neurodegeneração (TOMMASO BECCARI et al., 2011; ELSTEIN et al., 2015).

Os sintomas motores da DP são precedidos por um período prodrômico de até 20 anos. Nesse período, os sintomas considerados como "sintomas não motores" (SNM) podem representar o início de um progresso patológico. Os SNM, considerados como tendo evidências fortes a moderadas, de preceder o início dos sintomas motores da DP, são: hiposmia, distúrbio do sono REM, sonolência diurna, constipação, depressão e ansiedade [MCNEILL et al. (2012); SAUERBIER et al. (2016), GATTO et al. (2016); BROCKMANN; BERG (2014); VAN DIJK et al. (2013)].

As primeiras associações entre a deficiência da enzima GCase e a DP foram descobertas a partir da observação clínica [(TOMMASO BECCARI et al., 2011; ELSTEIN et al., 2015). Embora a DG seja causada por duas variantes patogênicas no *GBA*, não há diferença significativa no risco de DP entre heterozigotos para variantes de *GBA* e os pacientes com DG, como se acreditava [NOYCE; LEES; SCHRAG (2016); ALCALAY et al. (2015)]. Atualmente, o risco de DP em pacientes com DG é estimado em 4,7% aos 60 anos e 9,1% aos 80 anos entre os pacientes com DG (ALCALAY et al., 2015).

Sendo variantes no gene *GBA* o principal fator de risco para a DP, temos como objetivo principal avaliar a evolução dos SNM avaliados previamente em uma coorte de pacientes em 2018 (WILKE et al., 2019). Também correlacionaram-se a prevalência desses sintomas com alguns marcadores de gravidade da DG.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações

A seleção de informações foi realizada por meio de estratégia de busca dos sintomas pré-motores da doença de Parkinson associados à doença de Gaucher. Inicialmente, foram pesquisados no MeSH termos abrangentes para ambas as doenças, com os seguintes resultados:

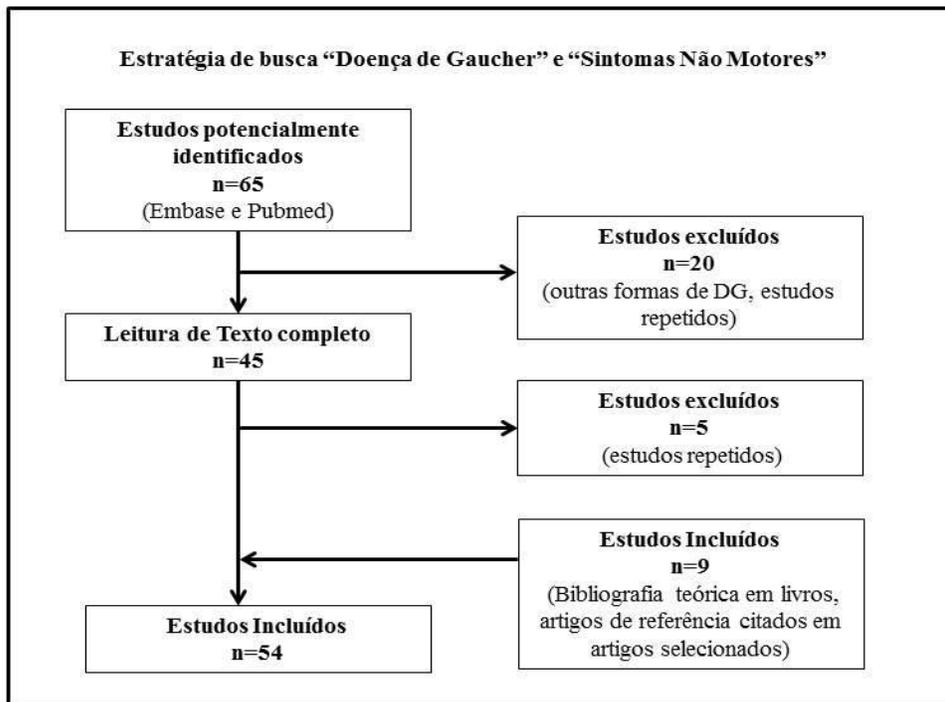
1. Pesquisa no MeSH para termos para *Parkinson Disease: Idiopathic Parkinson's Disease, Lewy Body Parkinson Disease, Lewy Body Parkinson's Disease, Primary Parkinsonism, Parkinsonism, Primary, Paralysis Agitans.*
2. Pesquisa do MeSH para termos para *Gaucher Disease: Gaucher Disease, Glucocerebrosidase Deficiency, Diseases, Glucocerebrosidase Deficiency, Gaucher Syndrome.*

Feita a pesquisa com os termos acima especificados, utilizando-se a Plataforma Embase, haja vista a inclusão de relatos de caso e estudos menores na plataforma, que é de importância em um contexto de doenças raras. Em seguida, foram pesquisados sintomas associados à presença de sintomas associados à fase prodrômica da doença de Parkinson: hiposmia, constipação, depressão, alteração na cognição e alteração do sono REM, associados à doença de Gaucher. Todos os sintomas pré-motores tiveram seus termos pesquisados no MeSH e incluídos na pesquisa seus respectivos sinônimos. Foram utilizados estudos dos anos de 2008 a 2018.

Primeira pesquisa (hiposmia): ('parkinson disease'/exp OR 'parkinson disease') AND ('gaucher disease'/exp OR 'gaucher disease') AND ('hyposmia'/exp OR hyposmia) - Encontrados 12 resultados, utilizando 9 artigos após revisão manual.

Segunda pesquisa (cognição): ('parkinson disease'/exp OR 'parkinson disease') AND ('gaucher disease'/exp OR 'gaucher disease') AND ('cognition'/exp OR cognition OR 'cognitive accessibility'/exp OR 'cognitive accessibility' OR (cognitive AND ('accessibility'/exp OR accessibility))) OR 'cognitive function'/exp OR 'cognitive function' OR (cognitive AND ('function'/exp OR function)) OR 'cognitive task'/exp OR 'cognitive task' OR (cognitive AND ('task'/exp OR task)) OR 'volition'/exp OR volition) AND [2010-2018]/py - Encontrados 65 artigos, sendo 54 utilizados.

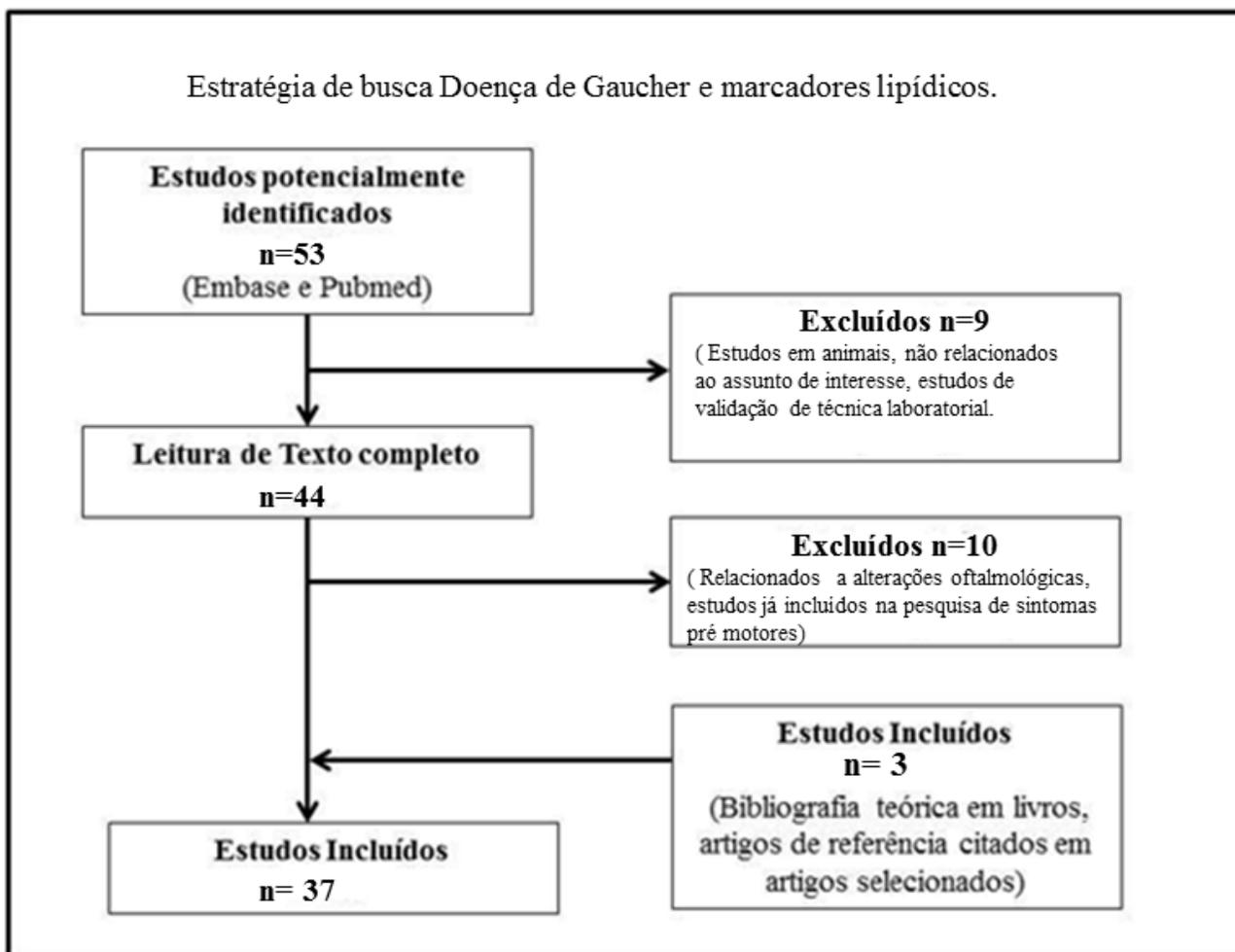
Terceira Pesquisa (demais sintomas pré-motores): ('parkinson disease'/exp OR 'parkinson disease') AND ('gaucher disease'/exp OR 'gaucher disease') AND ('constipation'/exp OR constipation OR 'dyschezia'/exp OR dyschezia OR 'obstipation'/exp OR obstipation OR 'rectal constipation'/exp OR 'rectal constipation' OR (rectal AND ('constipation'/exp OR constipation)) OR 'slow transit constipation'/exp OR 'slow transit constipation' OR (slow AND transit AND ('constipation'/exp OR constipation) AND ('rem phase'/exp OR 'rem phase' OR (rem AND phase) OR 'rem sleep'/exp OR 'rem sleep' OR (rem AND ('sleep'/exp OR sleep)) OR 'activated sleep'/exp OR 'activated sleep' OR (activated AND ('sleep'/exp OR sleep)) OR 'deep sleep or eye movement rapid or dyssomnia' OR (deep AND ('sleep'/exp OR sleep) AND oreye AND ('movement'/exp OR movement) AND rapid AND or dyssomnia) OR 'sleep disorder'/exp OR 'sleep disorder' OR (('sleep'/exp OR sleep) AND ('disorder'/exp OR disorder)) OR 'sleep disturbance'/exp OR 'sleep disturbance' OR (('sleep'/exp OR sleep) AND ('disturbance'/exp OR disturbance) AND [2008-2018] - Utilizados 54 artigos, conforme exemplificado na Figura 1.



**Figura 1:** Fluxograma da estratégia de busca na seleção de informações sobre doença de Gaucher e sintomas não motores.

- Feita posteriormente pesquisa para associação de uso de lipidômica e biomarcadores associados a Doença de Gaucher.
- Feito pesquisa MeSH termos para “Lipidomics” com 3 resultados. Lipidomic; Lipidome; Lipidomes.
- Feito pesquisa MeSH termos para LysoGb1: nenhum termo encontrado.
- Feito pesquisa MeSH para Sphingosyl beta-glucosidase: glucosyl psychosine; glucosylsphingosine; GlcSph; glucopsychosine; glucosyl sphingosine.

Quarta pesquisa (doença de Gaucher e marcadores lipídicos): glucosylsphingosine OR GlcSph OR glucopsychosine OR glucosyl sphingosine AND Gaucher. Selecionados estudos entre 2017 e 2019.



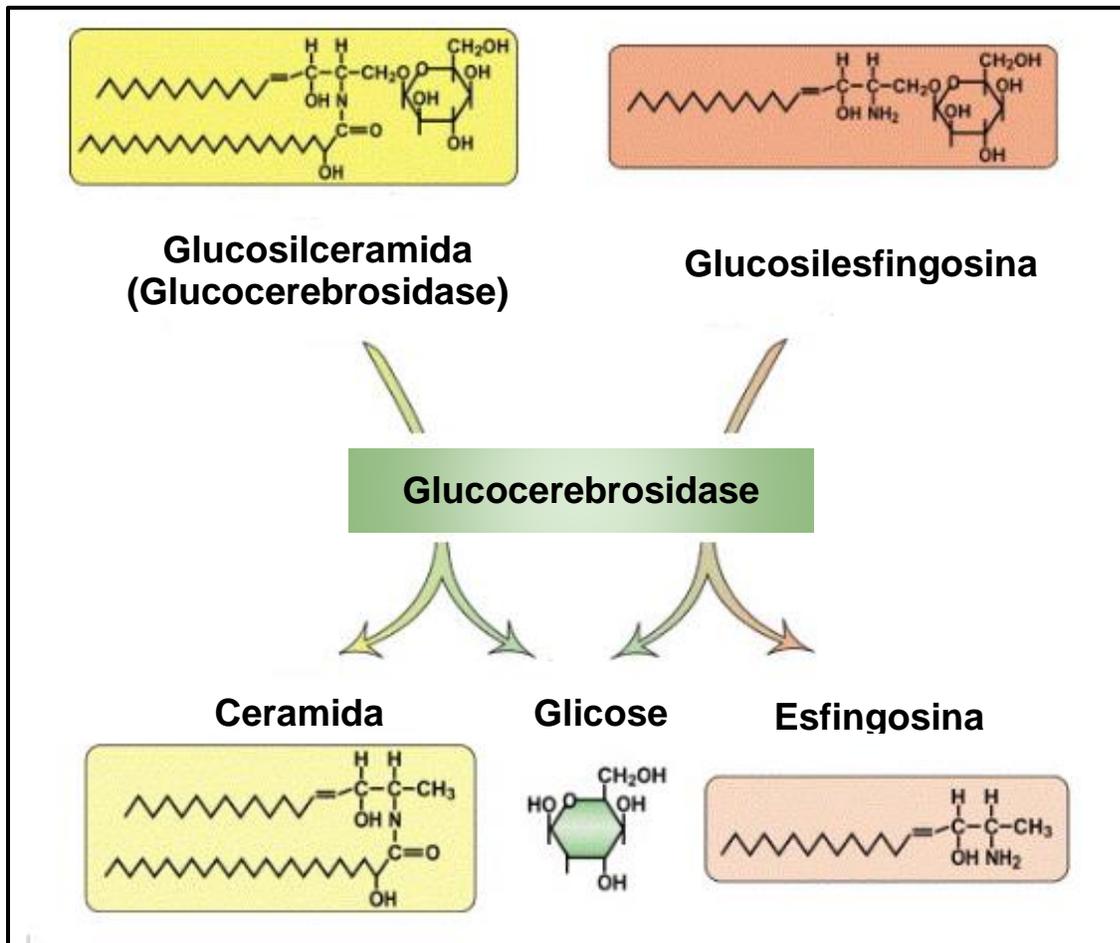
**Figura 2:** Fluxograma da estratégia de busca na seleção de informações sobre doença de Gaucher e marcadores lipídicos.

## **CAPÍTULO 1**

### **2.2.1 A doença de Gaucher**

A Doença de Gaucher (DG) é um erro inato do metabolismo de padrão de herança recessiva que resulta na deficiência da enzima lisossomal beta-glucoerebrosidase ácida (GCCase, EC 3.2.1.45). Essa enzima é envolvida na rota do catabolismo dos glicoesfingolípídeos e é a responsável pela quebra da ligação dos beta-glicocerebrosídeos em glicose e ceramida. A DG é um dos erros inatos mais comuns do metabolismo (EIM). A prevalência de DG varia de 0,70 a 1,75 por 100.000 indivíduos (L et al., 2017). A DG é mais frequente na população de judeus Ashkenazi, com uma prevalência de 1:855, e a frequência de portadores de variantes nessa população é de 1:18 (PASTORES, 2018).

A deficiência da GCCase leva ao acúmulo de glicoesfingolípídeos, principalmente a glucosilceramida, no sistema reticuloendotelial ocasionando acúmulo desse material no baço, no fígado, nos pulmões e na medula óssea. Esses glicolípídeos, são derivados das ceramidas e componentes fundamentais de todas as membranas do corpo conforme exemplificado na figura 1. São encontrados principalmente no tecido nervoso central e exercem importante papel na regulação das interações celulares, e do metabolismo de crescimento e de desenvolvimento desses órgãos (RICHARD et al., 2015).



**Figura 3:** Figura modificada de Sidransky (2004), mostrando a rota metabólica da glucocerebrosidase e da glucosilesfingosina e a importância da glucocerebrosidase nesse processo. A glucocerebrosidase converte glucosilceramida e glucosilesfingosina em ceramida, glicose e esfingosina.

O acúmulo de glicolípídeos ocorre principalmente no interior dos lisossomos de macrófagos que passam a ser denominados, quando isso ocorre, de células de Gaucher (STIRNEMANN et al., 2017; PASTORES, 2018). O material acumulado nas células leva ao mau funcionamento desses órgãos, tanto pela substituição do tecido sadio por células enzimaticamente deficientes quanto pela liberação de fatores inflamatórios, incluindo citocinas, que ocasionam uma cascata de mudanças patológicas.

O estado inflamatório celular, ocasionado pelo acúmulo, leva ao desenvolvimento das várias manifestações da DG: hipertrofia de órgãos linfóides primários e secundários, desenvolvimento de fibrose nos órgãos afetados, alta incidência de gamopatia monoclonal, estado

hipermetabólico e estado inflamatório sistêmico que precede as crises ósseas de alguns pacientes (FUTERMAN et al., 2006).

A GCase é sintetizada nos polirribossomos ligados ao retículo endoplasmático (RE) da célula. Essa enzima, após ser sintetizada, passa para o RE, onde, após glicosilações, é transportada para o complexo de Golgi e deste então para os lisossomos, onde atuarão na hidrólise de glicolípídeos. Como exemplificado a seguir, dependendo do tipo de variante do *GBA*, a GCase resultante pode variar quanto ao seu grau de retenção no RE. O resultado disso é que algumas GCases, devido à sua forma anômala, não conseguem ser transportadas para o seu destino final, estando mais propensas a serem submetidas a degradação via proteossoma associado ao RE.

A GCase é expressa em diferentes níveis em todas as células nucleadas de mamíferos. Sua maior atividade ocorre nos tecidos derivados do ectoderma e sua menor naqueles derivados do mesoderma. A presença de Saposina C (SAP C), um ativador proteico, é essencial para a estabilidade da GCase e sua ação de proteólise do lisossomo (FUTERMAN et al., 2006).

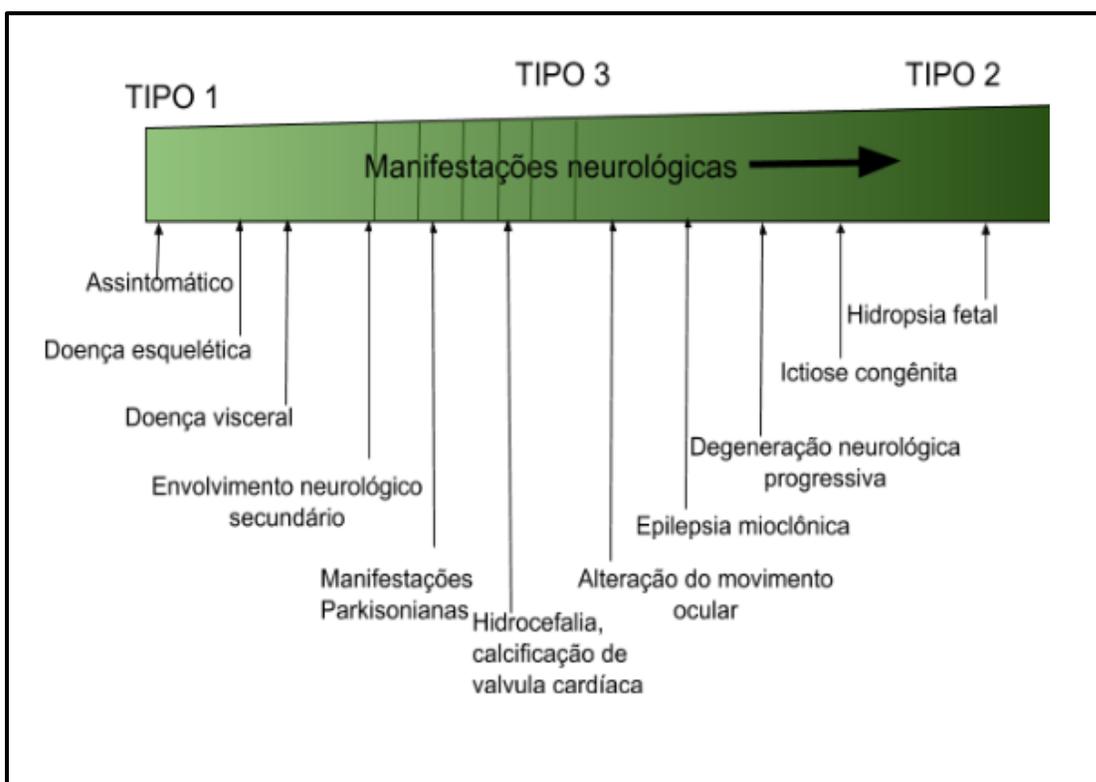
O gene que codifica a glucocerebrosidase ácida é denominado *GBA* (nomenclatura dada pelo termo em inglês "*glucosidase, beta, acid*") e é localizado em uma região rica de genes do cromossomo 1q21. O gene possui 7 kb e 11 exons, e o cDNA desse gene é de aproximadamente 2,5 kb. Um pseudogene, próximo em relação à localização, possui 96% de sua sequência exônica homóloga, o que dificulta a detecção e o sequenciamento de variantes. Entretanto, mais de 400 variantes desse gene já foram descritas, sendo a c.1226A>G (N370S) mais encontrada em judeus Ashkenazi e na população em geral (COX et al., 2015).

Entre os mecanismos de variantes, citam-se variantes de ponto, *frameshifts*, alterações do sítio de *splicing* e alelos recombinantes, que incluem segmentos da sequência do pseudogene (SIDRANSKY et al., 2012). Algumas das variantes mais comuns responsáveis por 70-98% de todos os casos de DG na população geral são: N370S (c.1226A>G), L444P (c.1448 T>C), 84 insG (c.84 dupG), e IVS2+1G>A (c.115+1G>A). (BARKHUIZEN, 2016). Em uma corte brasileira em Tabuleiro do Norte com incidência de 1: 4000 nascidos vivos de DG a variante p.Gly377Ser foi tida como a terceira mais comum nessa população (CHAVES et al., 2015).

A atividade da GCase em pacientes com DG é tipicamente 10-20% da atividade encontrada em um indivíduo normal (MIGDALSKI-RICHARDS et al., 2016). Tais variantes possuem correlação com o fenótipo na maioria dos casos, sendo que homocigotos ou heterocigotos

compostos para N370S exclusivamente desenvolvem o tipo 1 da DG, e os homocigotos para a variante L444P geralmente desenvolvem o tipo 3 da DG (SIDRANSKY et al., 2004). O motivo para tal fenômeno pode ser explicado pelo efeito que a variante tem na estrutura da GCase. A variante N370S não afeta diretamente o sítio catalítico desta enzima, enquanto que a L444P causa mudanças conformacionais do core do domínio II da enzima, o que pode levar à instabilidade da mesma (MIGDALSKI-RICHARDS et al., 2016). Diferentes variantes provocavam diferentes atividades residuais enzimáticas. A variante comum N370S detém 38% de atividade enzimática enquanto que a L444P apenas 13% (CHAVES et al., 2015).

A DG possui fenótipos variáveis e três formas clínicas são convencionalmente separadas com base no envolvimento neurológico, sendo elas: forma não neuropática (tipo 1), forma neuropática aguda (tipo 2) e forma neuropática subaguda (tipo 3).



**Figura 4:** Figura traduzida de Futerman (2006), representando o espectro de fenótipos da doença de Gaucher, com a principal distinção sendo a presença ou ausência de manifestações neurológicas entre a forma mais leve (à esquerda) e a forma mais grave (à direita). Há uma “zona cinzenta”, indicada por linhas verdes, em que não está claro se a neuropatologia é o resultado da deficiência enzimática ou de uma causa secundária.

As formas neuropáticas são caracterizadas por variantes tidas como mais graves ou variantes “nulas” em contraste com o tipo 1 que, em teoria, teria que ter, em pelo menos um alelo,

uma variante com um efeito fenotípico mais leve. Entretanto, o surgimento da doença de Parkinson (DP) em pacientes com DG tipo 1 tem alterado cada vez mais o entendimento na patofisiologia e genética da deficiência de Gcase (ELSTEIN et al., 2015).

A DG tipo 1 (OMIM, #230800) é tida como a mais frequente e é o foco da presente tese. O fenótipo varia de adultos assintomáticos a adolescentes com visceromegalia e doença óssea debilitante. Não ocorre envolvimento neurológico primário nesse subtipo. O início da apresentação dos sintomas geralmente surge na vida adulta, mas podem ser encontrados desde a infância. Pelo acúmulo de glicolípídeos do sistema reticuloendotelial de órgãos como o fígado, o baço e a medula óssea, entre os sintomas do tipo 1 cita-se: hepatoesplenomegalia, trombopenia, anemia e leucopenia. A infiltração das células de Gaucher na medula óssea causa, tanto alterações na linhagem sanguínea, como pancitopenia, quanto dores ósseas causadas pela tumoração celular devido ao acúmulo de células de Gaucher (gaucheromas). Osteólise e osteoporose também são sintomas frequentemente associados (PASTORES, 2018).

O tipo 2 (OMIM, #230900) é o tipo mais grave da DG e é responsável por menos de 1% dos casos. A manifestação ocorre no início da infância com deterioração neurológica progressiva, que pode culminar em morte precoce principalmente por aspiração ou apneia. Entre os sintomas apresentados, cita-se espasticidade progressiva, hiperreflexia e paralisia ocular.

O tipo 3 (OMIM, #231000) leva a sintomas neurológicos subagudos menos severos do que os do tipo 2. O início dos sintomas é mais tardio e a progressão neurológica costuma ser mais lenta. Os sintomas sistêmicos costumam surgir antes da forma neurológica e tendem a ser parecidos com os encontrados na DG tipo 1. Sintomas neurológicos costumam incluir ataxia cerebelar, paraparesia espástica, epilepsia, oftalmoplegia e demência.

## **2.2.2 O tratamento da doença de Gaucher**

### **2.2.2.1 Tratamento específico**

O tratamento para a DG consiste principalmente na terapia de reposição enzimática (TRE). Tal terapia baseia-se no fornecimento de enzima exógena em nível suficiente para superar o bloqueio na rota metabólica da enzima previamente deficiente e assim ajudar no *clearance* de substrato acumulado.

A TRE está disponível desde 1994, através da administração de forma recombinante modificada da GCase, e pode tratar os sintomas hematológicos e viscerais da doença. Essa forma de tratamento, no entanto, não interfere na doença do sistema nervoso central (SNC) por não penetrar na barreira hemato encefálica (BHE) [SARDI et al., 2015]. São as enzimas aprovadas para TRE e seus respectivos laboratórios: imiglucerase (Cerezyme®, Genzyme Corporation); alfavelaglicerase (VPRIV®, Takeda); alfataliglicerase (Elelyso®, Protalix). No Brasil, a alfataliglicerase também é denominada Biomanguinhos Alfataliglucerase, e o representante comercial é a Fundação Oswaldo Cruz.

A imiglucerase é produzida em células de ovário de hamster chinês, projetadas para superexpressar um análogo recombinante da  $\beta$ -glicosidase humana. A alfavelaglicerase é produzida em uma linhagem de fibrossarcoma humano para superexpressar o *GBA* endógeno. A taliglucerase é produzida em células da raiz de cenoura.

Estudos comparando a alfavelaglicerase e a imiglucerase demonstraram que as propriedades enzimáticas são essencialmente idênticas. A eliminação do fármaco é semelhante e os parâmetros cinéticos *in vitro* e a desnaturação do pH também são semelhantes (BURROW et al., 2011).

Em seguimento de 10 anos, foi mostrado que a imiglucerase (ou alglucerase) melhora os níveis de hemoglobina, a contagem plaquetária, a hepato e a esplenomegalia e a crise óssea, além de melhorar a qualidade de vida em geral (BARKHUIZEN et al., 2016; PASTORES, 2018). Apesar do uso por mais tempo da imiglucerase, estudos mostraram que todas as três enzimas recombinantes são similares em termos de eficácia (ELSTEIN et al., 2011). O tratamento com as terapias aprovadas não demonstraram efeito na progressão do parkinsonismo em pacientes que apresentam GD e DP (SARDI et al., 2015).

De forma geral, a TRE é bem tolerada, e, entre os efeitos adversos, cita-se urticária e prurido, controlados de forma satisfatória com antihistamínicos. Há relatos de desenvolvimento de anticorpos em indivíduos em uso de infusões de imiglucerase e alfavelaglicerase com taxas aproximadas de 10-15% e 1% respectivamente (PASTORES, 2018). Em um relato de caso com paciente de DG tipo 3, foi encontrado diferentes efeitos adversos no uso dessas 3 enzimas, demonstrando que elas podem ter um perfil de segurança diferente (VAIRO et al., 2013).

Uma alternativa para a TRE é a terapia de redução de substrato (TRS), que inibe a síntese de glucosilceramida via inibição da glucosilceramida sintase, diminuindo, assim, o acúmulo. A menor quantidade de substrato pode então ser degradada pela enzima mutada se essa ainda tiver alguma ação hidrolítica residual. A TRS é uma opção para pacientes com DG leve a moderada, em que a TRE não é uma opção como em pacientes hiper-alérgicos ou com rede venosa difícil (PASTORES, 2018; WEINREB et al., 2005).

A via de administração da TRS é oral e o principal exemplo é o miglustate (Zavesca®; Actelion Pharmaceuticals, Allschwill, Suíça), que recebeu aprovação para o tratamento da DG tipo 1 em 2002. Intolerância gastrointestinal e tremores são eventos adversos comuns que diminuem a adesão dos pacientes ao tratamento. Apesar de cruzar a barreira hematoencefálica, há estudos que não demonstraram benefício em sintomas neurológicos de pacientes com DG tipo 3, assim como não houve redução da toxicidade induzida pelo acúmulo de  $\alpha$ SIN (BARKHUIZEN et al., 2016). Em 2014, o eliglustate (Cerdelga), um inibidor da glucosilceramida sintase, recebeu aprovação, sendo ele um inibidor de substrato que não cruza a barreira hemato-encefálica e que tem mostrado resultado na estabilização da doença visceral e óssea.

Atualmente, novas terapias têm se mostrado promissoras para tratar não somente os sintomas viscerais e hematológicos, como também os neurológicos. Entre as novas terapias, cita-se o uso de pequenas moléculas de chaperonas feitas para cruzarem a BHE, capazes de se ligarem a glicocerebrosídeos no retículo endoplasmático, ajudando no seu correto dobramento e, subsequentemente, o seu transporte ao lisossomo onde serão degradadas. As chaperonas podem também se ligarem a enzimas mal dobradas, levando-as ao lisossomo em que terão sua ação permitida. As chaperonas são, logo, uma importante promessa para o tratamento das formas neuropáticas da DG (MIGDALSKI-RICHARDS et al., 2016).

Ambas N-butil-desoxinojirimicina (NB-DNJ) e isofagomina foram as primeiras chaperonas que demonstraram aumento da atividade da GCase. Tais chaperonas agem aumentando o tráfego da GCase no retículo endoplasmático até o lisossomo através de ligação específica, porém reversível (LEIDENHEIMER et al., 2018). Tais chaperonas, entretanto, possuem um efeito inibitório na atividade dessa enzima. A isofagomina é efetiva *in vitro* e atualmente está em ensaios clínicos para teste de segurança e eficácia.

O ambroxol (ABX), um expectorante mucolítico, foi também estudado como chaperona. Sua forma de atuação consiste em ligar um pH neutro a enzimas mal dobradas do retículo endoplasmático, facilitando seu transporte até o lisossomo. Nessa organela, devido ao pH mais ácido, a enzima é liberada de sua ligação com a chaperona, podendo exercer sua função. Logo, para tanto, beneficiam-se produtos de variantes que geram uma GCase com alguma atividade intrínseca residual apesar da forma anômala (BARKHUIZEN et al., 2016). O uso do ABX em alguns estudos aumentou significativamente a atividade da GCase e baixou os níveis de glicosfingolípídeos do fluido cerebrospinal, além de melhorar sintomas neurológicos (NARITA et al., 2016; PASTORES, 2018; BALESTRINO, 2018).

Em um estudo, altas doses de ABX foram administradas a 5 indivíduos com DG tipo 3 e manifestações neurológicas debilitantes. A ABX levou a uma melhora clínica em ambos os escores subjetivo-funcionais e escores objetivos, como potenciais evocados visuais e movimentos oculares. O aumento da atividade de GCase em linfócitos e a redução de glicosfingolípídeos no líquido cefalorraquidiano (LCR) também foram demonstrados nesse estudo (NARITA et al., 2016). O estudo piloto realizado em 12 pacientes com DG tipo 1 (com pelo menos um alelo N370S), que não estavam em TRE, demonstrou melhora nos parâmetros como concentração de hemoglobina e tamanho do baço. Porém, nesse mesmo estudo, tais achados foram limitados aos dois pacientes com os menores pesos. Esta baixa taxa de resposta possivelmente foi resultado de níveis subterapêuticos de ABX nos demais pacientes (ZIMRAN et al., 2013).

Além das chaperonas, outra forma de tratamento que está sendo estudada envolve a transferência de um gene funcionante na célula através de um vetor com vista a aumentar a atividade da GCase. Esse tratamento é denominado Terapia Gênica (TG). Em um modelo animal com neurodegeneração induzida pelo acúmulo de alfa-sinucleína, a superexpressão do gene *GBA* diminuiu o acúmulo lipídico celular (BARKHUIZEN et al., 2016). Em um estudo com modelo animal com deleção cérebro-específica do *GBA*, a injeção intraperitoneal com um vetor adenovírus do tipo 9 mostrou melhora da atividade da GCase e das mudanças neuropatológicas, e aumentou a expectativa de vida desses animais em duas vezes (DU S. et al., 2018).

Apesar de promissora, a TG necessita, entretanto, nos casos de acometimento do SNC, chegar ao tecido cerebral, e a injeção direta não é uma opção terapêutica. A infusão endovenosa para cruzar a barreira hematoencefálica ocorre somente em modelos animais neonatos ou muito

jovens, ainda estando longe de constituir uma alternativa terapêutica viável. O efeito da terapia gênica em pacientes com DG e doença de Parkinson será posteriormente discutido nos próximos capítulos.

O acompanhamento dos pacientes com DG do Serviço de Genética Médica (SGM-HCPA) ocorre de forma regular com consultas completas com exames físicos que contemplem a detecção de alterações nos diversos sistemas envolvidos pela doença.

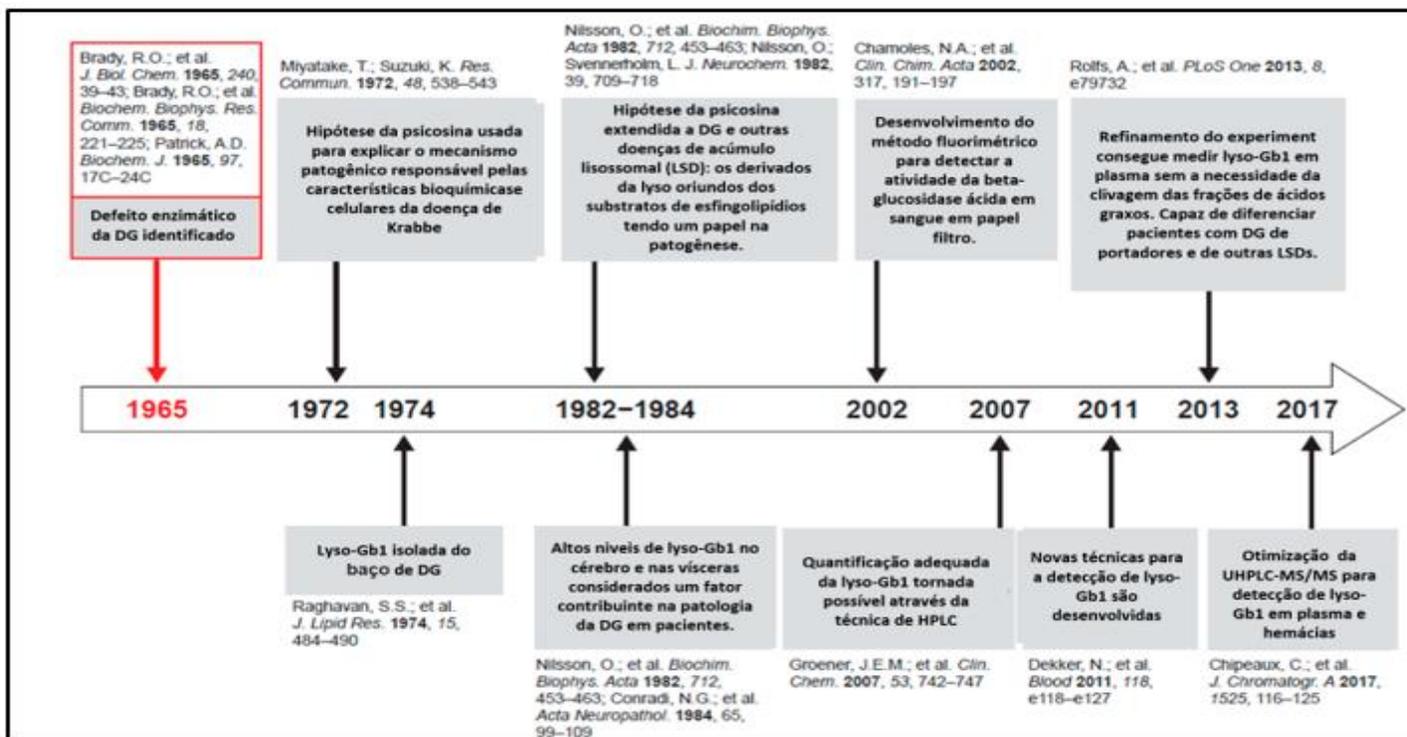
Um dos marcadores plasmáticos para monitorar a resposta ao tratamento e progressão da doença para a DG é a quitotriosidase, descoberta através de observações clínicas. Hibridização *in situ*, histoquímica de medula óssea e biópsias esplênicas de pacientes revelaram que a quitotriosidase é especificamente produzida pelas células de depósito, possuindo uma correlação direta com a quantidade de glicosilceramida acumulada no corpo (FUTERMAN, 2006). Atualmente, considera-se que os níveis de quitotriosidase não refletem somente um dos sintomas da doença, mas sim a quantidade global secretada pelas células fagocíticas sobrecarregadas de acúmulo lipídico em todo corpo (FUTERMAN, 2006).

Atualmente, outros biomarcadores têm se mostrado superiores à quitotriosidase e serão discutidos no próximo capítulo.

## CAPÍTULO 2

### 2.3.1 Lyso-Gb1 como um biomarcador da doença de Gaucher

De acordo com a Food & Drug Administration dos EUA, os biomarcadores são definidos como elementos mensuráveis que podem ser usados como indicadores tanto de processos biológicos normais, quanto patológicos, podendo também mensurar a resposta de uma exposição ou intervenção terapêutica. (GIRALDO; FRUTOS; CEBOLLA, 2018) Um dos desafios no cuidado de pacientes com DG é o uso de biomarcadores como ferramentas validadas que não somente auxiliam no diagnóstico, prognóstico e acompanhamento desses pacientes, mas que também representam parte da fisiopatologia envolvida na doença.



**Figura 5:** Linha de tempo da descoberta da Lyso-Gb1 como biomarcador na doença de Gaucher. Modificado de Revel-Vilk, S. Fuller, M. Zimran, A. **Value of Glucosylsphingosine (Lyso-Gb1) as a Biomarker in Gaucher Disease: A Systematic Literature Review.** 2020, 21, 7159.

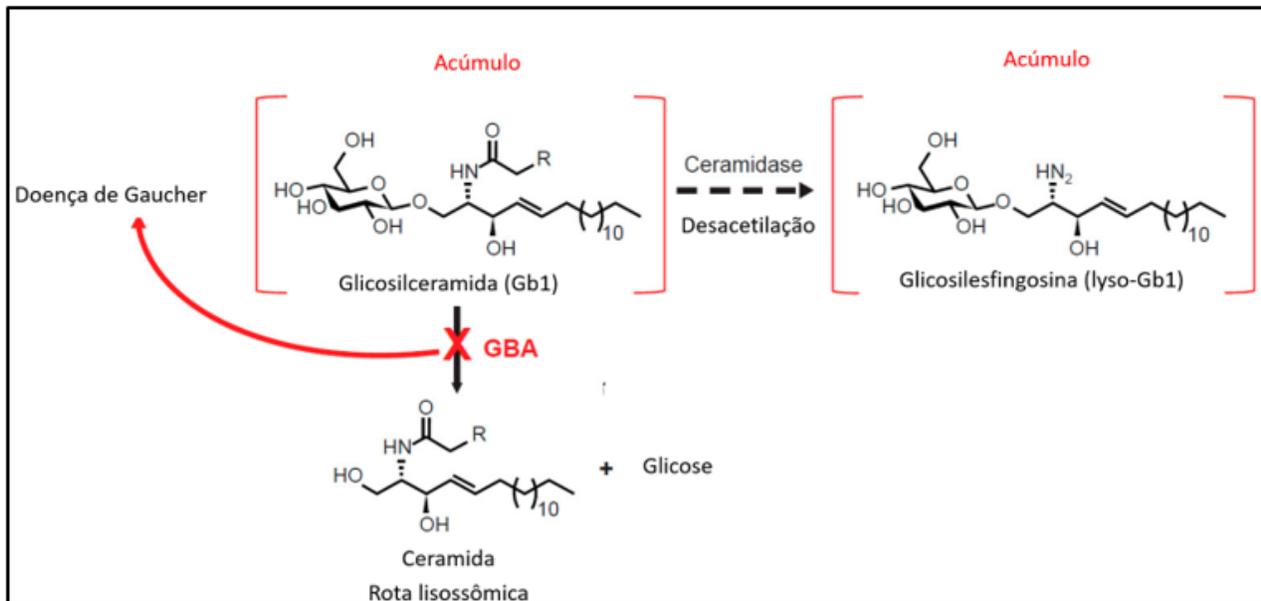
A seleção de biomarcadores candidatos apropriados é dificultada pela complexidade dessa doença, na qual genes modificadores, epigenética e fatores externos dão origem a uma vasta

heterogeneidade clínica e bioquímica. Um dos exemplos dessa dificuldade encontra-se na ausência de correlação fidedigna entre o genótipo e a atividade residual enzimática, tanto para diagnóstico quanto para prognóstico [REVEL-VILK; FULLER; ZIMRAN (2020); HURVITZ et al. (2019)].

### **2.3.2 O que é a lyso-Gb1?**

Os esfingolipídeos representam uma classe de lipídios bioativos que modulam as propriedades biofísicas das membranas biológicas e desempenham um papel crítico na transdução do sinal celular. O metabolismo dos esfingolipídios é altamente compartimentalizado nas localizações subcelulares. No entanto, a maioria das etapas do metabolismo dos esfingolipídios ocorre nos lisossomos (IVANOVA, 2020). A enzima GCCase catalisa a conversão de glicosfingolipídeos (GlcCer) na via de degradação para ceramida e glicose. A deficiência enzimática resulta em um acúmulo intralisossomal de glicosilceramida (Figura 6). À medida que a glicosilceramida se acumula nos macrófagos lisossomais do baço, fígado, medula óssea e ocasionalmente nos pulmões, ela sofre desacilação por uma enzima denominada ceramidase ácida, tornando-se, então, a glicosil esfingosina (também conhecida como GlcSph, Lyso-GL1 ou lyso-Gb1) [REVEL-VILK; FULLER; ZIMRAN (2020); STILES et al., 2021; COZMA et al., 2020; LUKAS et al., 2017].

Esta forma desacilada de GlcCer foi isolada pela primeira vez de baço e cérebro de pacientes adultos com DG e, posteriormente, também foi encontrado em outros tecidos, incluindo os de fetos e camundongos afetados (COZMA et al., 2020). Sendo a lyso-Gb1 mais hidrofílica e anfipática que os GlcCer, sendo considerada um composto, ela possui características físico-químicas que provavelmente permitem a saída desta do sistema lisossomal para o citoplasma e espaço extracelular (REVEL-V LK; FULLER; ZIMRAN, 2020). O acúmulo dessa substância resulta na diminuição da contagem de células sanguíneas e plaquetas além das muitas anormalidades esqueléticas e viscerais descritas anteriormente (LUKAS et al., 2017).



**Figura 6:** Degradação da Glicosilceramida. Modificado de Revel-Vilk, S. Fuller, M. Zimran, A. **Value of Glucosylsphingosine (Lyso-Gb1) as a Biomarker in Gaucher Disease: A Systematic Literature Review.** 2020, 21, 7159.

A lyso-Gb1 está envolvida em papéis patogênicos importantes na DG, como inflamação, comprometimento da divisão citoplasmática, alteração da regulação imunológica e neurotoxicidade (KIM et al., 2022; LUKAS et al., 2017). A ativação diferencial da via da desacilação pode explicar, pelo menos em parte, as inconsistências observadas na correlação do genótipo com o acúmulo de lipídios e o fenótipo dos pacientes com DG, sendo que as concentrações suprafisiológicas de lyso-Gb1 são encontradas em locais anatômicos específicos, tanto em pacientes quanto em modelos animais de DG. Entretanto, níveis normais do plasma desse biomarcador podem não representar o acúmulo da lyso-Gb1 em algumas estruturas anatômicas mais isoladas, como na doença óssea. Em pacientes tratados, também é possível que TRE e TRS tenham efeitos diferentes na dinâmica da lyso-Gb1 no plasma (REVEL-VILK; FULLER; ZIMRAN, 2020). A lyso-Gb1 é altamente abundante no tecido cerebral de pacientes com DG neuronopática, por exemplo, mas não em pacientes com DG não neuronopática, sugerindo um papel na neuropatologia da DG tipos 2 e 3 com neurodegeneração grave (REVEL-VILK; FULLER; ZIMRAN, 2020; LUKAS et al., 2017).

Em um estudo retrospectivo de caso-controle, a lyso-Gb1 plasmática também pareceu refletir a gravidade da variante genética individual (REVEL-VILK; FULLER; ZIMRAN, 2020). O termo “gravidade da variante” tem sido usado na literatura para definir o efeito da variante no fenótipo dos pacientes com DG. São consideradas variantes “graves” (84 GG, V394L, D409H, L444P) e “leves” (N370S, R496H) (VIEIRA; SCHAPIRA, 2021; THALER et al., 2018). Tal terminologia possui críticas, pois, por exemplo, a variante patogênica N370S, considerada “leve”, possui grande heterogeneidade fenotípica: homozigotos podem permanecer assintomáticos por décadas enquanto que outros podem apresentar na infância manifestações clínicas graves, incluindo hepatoesplenomegalia, pancitopenia, etc. (STILES et al., 2021). Em relação a lyso-Gb1 e as variantes em *GBA*, os pacientes em tratamento heterozigotos compostos para a variante L444P demonstram níveis plasmáticos de lyso-Gb1 mais elevados (mediana 184,5 ng/ml) do que heterozigotos compostos para a variante N370S (mediana 143,1 ng/ml) (STILES et al., 2021). Além disso, a medida de lyso-Gb1 também foi menor em homozigotos para N370S (mediana de 143,1 ng/ml) do que em homozigotos para a L444P (184,5 ng/ml) (ROHLFS et al., 2013).

A medida da lyso-Gb1 plasmática tem se mostrado um biomarcador mais sensível e específico do que os outros biomarcadores historicamente mais utilizados na DG, como a quitotriosidase, que será discutida mais adiante. Em modelos murinos de DG tipo 1, a lyso-Gb1 estava elevada no baço, fígado, plasma e tecido ósseo, porém ausente em tecido cerebral. Houve diminuição dos valores após os camundongos serem expostos ao eliglustate, um inibidor potente e seletivo da glicosilceramida sintase, e em camundongos tratados com vetores terapêuticos contendo o gene *GBA*, em relação aos controles. Portanto, a lyso-Gb1 tem se mostrado acessível em uma amostra clínica, quantificável de maneira fácil e confiável, possuindo tanto valor diagnóstico quanto refletindo respostas a intervenções terapêuticas (REVEL-VILK; FULLER; ZIMRAN, 2020).

A lyso-Gb1 é medida tanto em plasma quanto em papel-filtro (PF). A melhoria adicional da técnica foi alcançada pelo desenvolvimento de um método de espectrometria de massa em tandem de cromatografia líquida (LC/MS/MS), usando um padrão Gb1 radiomarcado idêntico. Em comparação com a análise de plasma, a medição de lyso-Gb1 em PF oferece um meio mais conveniente de teste de alto rendimento sem a necessidade de coleta de sangue intravenoso, tendo, também, a vantagem de exigir um volume menor e podendo ser armazenada por mais tempo (REVEL-VILK; FULLER; ZIMRAN, 2020).

### **2.3.3 Valores de referência**

A literatura reporta diferentes pontos de corte para valores de referência de lyso-Gb1 em pacientes com DG e controles. O valor de de 12 ng/mL (25,99 nmol/L) é usualmente definido como ponto de corte para diferenciar pacientes com DG geneticamente definida de probandos saudáveis. Esse valor também permite diferenciar pacientes com DG de outras doenças lisossômicas com 100% de sensibilidade e 100% de especificidade (com exceção de dois casos reportados na literatura com deficiência de prosaposina), independentemente do sexo, usando HPLC-MS/MS (REVEL-VILK; FULLER; ZIMRAN, 2020; MOTTA et al., 2016). Entretanto, em um estudo americano, comparando prospectivamente valores de lyso-Gb1 plasmática em pacientes com DG tipo 1 e controles saudáveis, um ponto de corte de 4 ng/mL foi tido como tendo 100% de sensibilidade e especificidade como ferramenta de diagnóstico usando LC-MS/MSs (MURUGESAN et al., 2016). Esses diferentes valores de corte de diagnóstico para lyso-Gb1 no plasma podem refletir tanto em diferentes populações em estudo quanto nos diferentes meios de medição de lyso-Gb1. No entanto, em todos os estudos, a concentração de lyso-Gb1 permaneceu maior do que a observada em controles saudáveis, independentemente do tipo de amostra, e é superior ao nível de corte diagnóstico de 4 ou 12 ng/mL para lyso-Gb1 no plasma (REVEL-VILK; FULLER; ZIMRAN, 2020).

### **2.3.4 Ressalvas em relação ao uso da Lyso-Gb1**

Vários estudos relatam uma alta variabilidade das medições longitudinais de lyso-Gb1, tendo como hipóteses para tal observação o impacto do ritmo circadiano, efeitos da nutrição e/ou atividade física ou efeitos de condições patológicas coexistentes (REVEL-VILK; FULLER; ZIMRAN, 2020). Assim, a interpretação das concentrações de lyso-Gb1 entre os estudos deve se concentrar nas tendências (queda ou elevação) e não na quantificação absoluta.

### **2.3.5 Comparação da Lyso-Gb1 com a Quitotriosidase e quimiocina (motivo C-C) 18**

A atividade da ChT foi introduzida pela primeira vez como um biomarcador em 1994 e reflete na GD a presença e a quantidade de células de Gaucher, sendo a ChT o primeiro e mais

utilizado biomarcador em pacientes com DG. Desde sua primeira descrição até o presente, muitos estudos foram realizados sobre sua eficácia e limitações como biomarcador. Usualmente, a progressão da doença é monitorada em pacientes através da atividade da quitotriosidase ChT na linha de base, e a cada 3 a 6 meses ou 12 meses para pacientes tratados e não tratados com TRE, respectivamente (STILES et al., 2021). Uma de suas limitações é sua ausência de especificidade. Sua atividade é aumentada no plasma em diferentes processos inflamatórios, como aterosclerose, isquemia cardíaca, malária, câncer,  $\beta$ -talassemia maior, neoplasias mieloproliferativas e outras doenças crônicas que envolvem a ativação de macrófagos, embora estas não atinjam os altos níveis encontrado na DG.

Outro problema que este biomarcador apresenta é a atividade reduzida ou nula devido à presença de alelos nulos no gene *CHIT1* (MIM\*600031). Sabe-se que um em cada vinte indivíduos é totalmente deficiente na atividade de quitotriosidase. Dentre as variantes nulas e/ou pseudo deficiências mais comuns citam-se: NP\_003456: c.220G>A (p. Glu74Lys), c.304G>A (p.Gly102Ser), c.1060G>A (p.Gly354Arg), c.1325C>T (p.Ala442Val), ou outros alelos complexos. Correlações significativas entre as concentrações de lyso-Gb1 e ChT no plasma e eritrócitos foram observadas em vários estudos com valores de coeficiente de Pearson de 0,59 a >0,9, demonstrando que os valores de lyso-Gb1 correlacionam-se inversamente com o hematócrito (REVEL-VILK; FULLER; ZIMRAN, 2020). Em crianças não tratadas, os níveis de lyso-Gb1 foram inversamente correlacionados com a contagem de plaquetas. Nas crianças tratadas, os níveis de lyso-Gb1 foram inversamente correlacionados com os níveis de hemoglobina (HURVITZ et al., 2019).

Outro biomarcador descrito na literatura é o ligante de quimiocina (motivo C-C) 18 (CCL18), substância que também é secretada por macrófagos ativados, incluindo células de Gaucher. Embora a quitotriosidase e o CCL18 estejam elevados em pacientes com DG em relação aos controles saudáveis, e diminuem durante o tratamento específico da doença, eles não são relacionados especificamente à patologia da doença (REVEL-VILK; FULLER; ZIMRAN, 2020). O mesmo pode ser dito da ferritina como biomarcador. Essa proteína, que se liga ao ferro nos tecidos, armazenando-o em uma forma biologicamente disponível para processos celulares vitais, está elevada em até 60% dos pacientes com DG1. Segundo dados coletados no Registro Espanhol de DG, a medida da ferritina plasmática tem sido associada à gravidade desta doença, sendo observada a redução da concentração sérica de ferritina após meses de TRE. Embora a

hiperferritinemia ocorra na maioria dos pacientes com DG1, seu valor como biomarcador da doença é secundário, somente sendo encontrado em associação com a gravidade da doença e aumento de algumas citocinas diferentemente da lyso-Gb1, que representa um dos produtos secundários gerados após o defeito enzimático principal da DG.

### **2.3.6 Associação de valores de lyso-Gb1 com a doença de Parkinson**

Há poucos dados publicados em relação à associação entre lyso-Gb1 e a DP. Um estudo demonstrou que a glicosil esfingosina desencadeia a formação de espécies oligoméricas no formato de folhas-beta de  $\alpha$ -sinucleína *in vitro* (TAGUCHI et al., 2017a). Usando linhagens de camundongos DG/DP para as variantes (N370S, L444P, KO) em *GBA*, o mesmo estudo demonstrou que as variantes em *GBA* predisõem à DP através de um mecanismo de perda de função, e que a lyso-Gb1 se acumula especificamente no cérebro de camundongos DG/DP jovens. Com a idade, os cérebros desses animais exibiam acúmulos de glicosilceramida co-localizados com  $\alpha$ -sinucleína (TAGUCHI et al., 2017b). Os achados sugerem que os metabólitos dos GlcCer, em vez dos GlcCer sozinhos, podem desempenhar um papel integral na influência da agregação patológica da  $\alpha$ SIN, tornando a lyso-Gb1 um potencial mediadores de toxicidade de  $\alpha$ SIN na DP associada ao *GBA*. Em outro estudo usando o conduritol- $\beta$ -epóxido (CBE), um potente inibidor competitivo irreversível seletivo da glicocerebrosidase, foi demonstrado em camundongos o acúmulo de agregados insolúveis de  $\alpha$ -sinucleína na substância negra e níveis alterados de GluCer e lyso-Gb1 após 28 dias de inibição enzimática (ROCHA et al., 2015).

Dado o fato supramencionado de que os valores de lyso-Gb1 parecem ser sítio específico, a quantificação desse biomarcador em LCR tem sido estudada para entender a correlação dessa medida com os processos neurodegenerativos associados com a DG. Outros glicoesfingolipídeos relacionados a DG (por exemplo, glicosilceramida) além da lyso-Gb1 promovem agregação  $\alpha$ -sinucleína em conformação de folhas  $\beta$  *in vitro*, além de aumentarem a conversão de  $\alpha$ -sinucleína em agregados tóxicos de  $\alpha$ -sinucleína em neurônios dopaminérgicos derivados de células tronco pluripotentes induzidas (iPSC) de pacientes com DG em relação a controles (ZUNKE et al., 2018).

Os achados de um ensaio clínico piloto aberto mostraram que a lyso-Gb1 no LCR estava abaixo do limite inferior de quantificação (10,0 pg/mL (21,66 pmol/mL) em todos os controles, mas estava elevada em pacientes com DG neuropática. A lyso-Gb1 também tem se mostrado

responsiva a tratamento mesmo em LCR, em que uma combinação de TRE mais ambroxol reduziu a concentração de lyso-Gb1 no LCR em 26% em relação à linha de base em um estudo piloto multicêntrico aberto de cinco pacientes com DG neuronopática. As concentrações estavam abaixo do limite inferior de quantificação (10,0 pg/mL) em todos os 37 indivíduos de controle (REVEL-VILK; FULLER; ZIMRAN, 2020; NARITA et al., 2016). O ambroxol, comercializado como expectorante comumente usado, tem sido estudado como uma terapia farmacológica ao atuar como chaperona, representando uma nova estratégia para o tratamento das manifestações neurológicas da DG (CHARKHAND et al., 2019). Em um estudo, o tratamento com ambroxol aumentou apenas ligeiramente a atividade de GCase de fibroblastos de pacientes homocigotos para a variante L444P, porém teve interessante efeito ao reduzir a secreção de TGF- $\beta$  em fibroblastos sem a variante, tratados com lyso-Gb1. Da mesma forma, em comparação com pacientes DG2/3 não tratados, o nível plasmático de TGF- $\beta$  foi menor em pacientes DG3 tratados com altas doses de ambroxol por 2 ou mais anos. Segundo o autor, esses achados indicam coletivamente que o ambroxol exerce também um efeito anti-inflamatório, estabilizando a sinalização do TGF- $\beta$  e restaurando o metabolismo da autofagia na DG (KIM et al., 2022).

Valores elevados, além de causar dano pelo seu acúmulo, também causam prejuízo de alguns sistemas por alguma forma de toxicidade. Apesar da TRE, a maioria dos pacientes DG2/3, bem como alguns pacientes DG1, apresentam manifestações atípicas, como linfadenopatia, mieloma múltiplo, linfoma, deterioração neurológica e aumento dos níveis de lyso-Gb1 (KIM et al., 2022). A lyso-Gb1 mostrou-se envolvida na imunidade humoral, promovendo ativação crônica de células B e gamopatia, com este último podendo evoluir para mieloma múltiplo (MM), que tem se mostrado a principal causa de morte relacionada a câncer entre os pacientes com DG. A razão para isso ainda está sendo estudada: sabe-se que tanto o MM quanto a gamopatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS) são caracterizados por expansão clonal de plasmócitos modificados (REVEL-VILK; FULLER; ZIMRAN, 2020; NGUYEN et al., 2020). A associação entre DG e MGUS foi relatada pela primeira vez em 1968 (ZIMRAN; RUCHLEIMER; REVEL-VILK, 2020). Na década de 1980, foi sugerido que a produção de gamopatias policlonais e monoclonais, incluindo MGUS e MM, poderia ser devido à estimulação crônica do sistema imunológico secundária a citocinas inflamatórias como a IL-6, derivada das células de Gaucher (ZIMRAN; RUCHLEIMER; REVEL-VILK, 2020).

As estimativas da prevalência de MGUS variam entre 1% e 39% de todos os pacientes adultos com DG, e a magnitude do risco real de mieloma é entre 5 e 50 vezes maior do que na população geral (ZIMRAN; RUCHLEIMER; REVEL-VILK, 2020). O papel da estimulação dirigida por antígenos é proposto como patogênese da MGUS e do MM. Em um estudo com modelos animais para a DG e com pacientes com DG, foi mostrado que a imunoglobulina clonal mostrou-se reativa a lyso-Gb1 (NAIR et al., 2016). Nos modelos animais *Gba*<sup>-/-</sup>, a injeção de lyso-Gb1 levou a um aumento de células B germinativas no baço (Fas+GL7+), assim como de um aumento de plasmócitos CD38+ e CD138+ na medula óssea desses animais. Tal achado foi corroborado ao submeter os animais *Gba*<sup>-/-</sup>, imunoglobulinas clonais, ao tratamento com eliglustate, mostrando uma redução tanto nos anticorpos anti-lyso-Gb1 quanto nas imunoglobulinas clonais *in vivo* (NAIR et al., 2016). Outra associação entre esse biomarcador e outros sistemas é de que a elevação da lyso-Gb1 também foi associada à densidade mineral óssea reduzida (osteopenia) em pacientes com DG, com hipótese de que o aumento da lyso-Gb1 também prejudicaria a diferenciação dos osteoblastos (BOER et al., 2020). Os resultados dessa associação na coorte de pacientes avaliados na presente tese serão descritos no ARTIGO 1.

### **2.3.7. Conclusões**

A lyso-Gb1 tem se mostrado um importante biomarcador na DG. Entretanto as associações dos níveis de lyso-Gb1 com valor prognóstico, principalmente de eventos clínicos secundários como MM, MGUS e DP ainda requerem mais pesquisas. É importante ressaltar que a quantificação de lyso-Gb1 plasmática apesar de refletir o acúmulo desse substrato pode não representar esse achado nos diferentes compartimentos e tecidos do corpo. Além disso, a quantidade de acúmulo não mostra o grau de inflamação subjacente que poderia estar relacionado a complicações relacionadas ao sistema imunológico ou envolvimento neurológico.

## CAPÍTULO 3

### 2.4 A descoberta da associação entre a doença de Gaucher e a doença de Parkinson

A DP é a segunda doença neurodegenerativa mais comum depois da doença de Alzheimer (DA) (TOMMASO BECCARI et al., 2011). A causa da DP é pouco conhecida, visto sua etiologia multifatorial, que envolve o próprio envelhecimento do cérebro, a susceptibilidade genética e os fatores ambientais. Os achados principais dessa doença decorrem da perda dos neurônios dopaminérgicos e a aparição de inclusões intraneuronais compostas de agregados anormais de proteínas, especialmente alfa-sinucleína ( $\alpha$ SIN), denominadas corpos de Lewy (CL). O acúmulo de  $\alpha$ SIN é considerado o marco central na patogênese da DP. Variantes e polimorfismos do gene *SNCA*, responsável pela proteína, levam a formação e acúmulo direto dessa proteína (SCHAPIRA et al., 2015).

A  $\alpha$ SIN é encontrada nas células da glia, em incursões nucleares e citoplasmáticas de outras células do SNC e em botões sinápticos de neurônios. Sua função permanece desconhecida (PUSCHMANN et al., 2012). A  $\alpha$ -sinucleína é uma proteína solúvel pequena (14 kDa). Em humanos, é codificado pelo gene *SNCA* (OMIM 163890). Nos neurônios, a  $\alpha$ SIN está localizada principalmente na placa pré-sináptica e está envolvida na regulação de sua atividade, incluindo plasticidade, manutenção do *pool* de vesículas sinápticas e seu tráfego (NAVARRO-ROMERO; MONTPEYÓ; MARTINEZ-VICENTE, 2020). A  $\alpha$ SIN possui três domínios funcionais: um domínio N-terminal, um domínio de componente não amilóide (NAC) e uma cauda C-terminal (Uniprot). O domínio central NAC é enriquecido com resíduos hidrofóbicos, sendo considerado propenso à oligomerização, enquanto que o domínio N-terminal é rico em resíduos de lisina, podendo formar  $\alpha$ -hélices anfipáticas importantes para a interação com os lipídios (NAVARRO-ROMERO; MONTEIRO; MARTINEZ-VICENTE, 2020). O acúmulo de agregados de  $\alpha$ SIN possui um efeito tóxico direto sobre a célula. No cérebro de pessoas com sintomas motores de DP, esse acúmulo é encontrado tanto na forma esporádica quanto na forma familiar da doença (FARLOW et al., 2004; TOMMASO BECCARI et al., 2011).

A DP é geneticamente heterogênea, com formas tanto idiopáticas (em que o fator ambiental e a susceptibilidade genética são fatores influenciadores) quanto familiares (KARIMI-MOGHADAM et al., 2018). A forma familiar é rara e representa apenas 10% dos casos (PITCAIRN et al., 2018). Curiosamente, variantes patogênicas em *SNCA* ligadas à DP são encontradas principalmente na região anfipática da  $\alpha$ SIN, onde é tida como local da interação entre os metabólitos dos esfingolipídeos que se acumulam nas LSDs e essa proteína (NAVARRO-ROMERO; MONTEIRO; MARTINEZ-VICENTE, 2020). Tal achado demonstra como os lipídios e as doenças genéticas relacionadas ao seu metabolismo desempenham um papel importante na descoberta da patogênese da DP.

A DP foi primeiramente descrita pelo médico inglês James Parkinson em 1817. Já nessa época foi observado a natureza complexa dessa doença e o fato de que sintomas não motores (SNM) estavam também presentes com os sintomas motores clássicos (SAUERBIER et al., 2016). A DP é classicamente diagnosticada pela manifestação de doença motora, com início assimétrico, e que evolui para um acometimento bilateral. A maioria dos sintomas ocorre pela perda de neurônios da substância negra *pars compacta* e a subsequente perda da entrada de dopamina nas estruturas motoras do corpo estriado, levando a sintomas como tremores, rigidez muscular e bradicinesia. A incidência da DP aumenta significativamente após a quinta década de vida: a DP afeta 2% da população com mais de 60 anos e 4% da população acima dos 80 anos. O tratamento atual da DP é sintomático, sem efeito sobre a neurodegeneração em si (TOMMASO BECCARI et al., 2011; ELSTEIN, 2015).

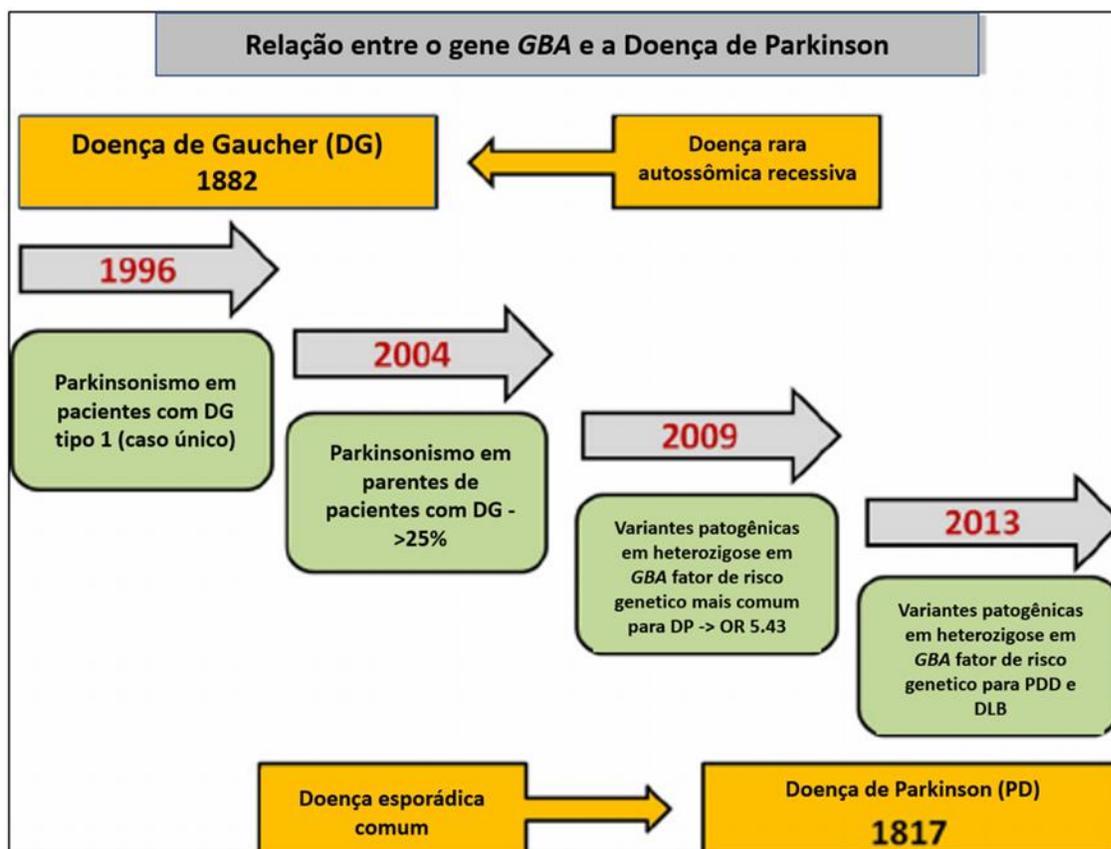
Fonte	Estudo	Conclusão
LWIN A., 2004	Tecido cerebral em pacientes com Doença de Parkinson (n=57) em busca de variantes em <i>GBA</i> .	Variantes em <i>GBA</i> encontradas em 14% das amostras.
AHARON-PERETZ, 2004	Amostras pacientes com doença de Parkinson com descendência Ashkenazi (n=99) x amostra de controles com descendência Ashkenazi (n=1543) para as variantes de <i>GBA</i> mais comuns.	31.3% dos pacientes com doença de Parkinson portavam variantes no <i>GBA</i> contra 6,2% dos indivíduos controle.
BULTRON, 2010	Pacientes com doença de Gaucher (n=444) avaliados para o risco de desenvolver doença de Parkinson	Risco relativo de desenvolver doença de Parkinson precoce de 21,4 vezes maior ao longo da vida do que a população normal.
E; AHV, 2021	Artigo de revisão	O risco relativo de doença de Parkinson seria de 5 e 9%-12%, respectivamente aos 60 e 80 anos em pacientes com doença de Gaucher. Esse risco foi semelhante ao encontrado em pacientes com DP portadores para apenas uma variante patogênica em <i>GBA</i> .

**Tabela 1:** Exemplo de estudos que analisaram a relação entre a doença de Parkinson com a doença de Gaucher e variantes do gene *GBA*.

As primeiras associações entre a deficiência da enzima GCCase e a DP foram descobertas a partir da observação clínica de que pacientes com DG, em vários casos, desenvolveram DP de início precoce e que, em alguns, também havia refratariedade ao tratamento padrão com levodopa (TOMMASO BECCARI et al., 2011; ELSTEIN, 2015). Notou-se, na época da apresentação dos casos, uma dicotomia entre a aparente leve sintomatologia da DG e uma apresentação mais

agressiva da DP. O gene *GBA*, responsável pela doença de Gaucher, foi, após estudos, considerado um fator de risco para a DP a partir da observação de alguns estudos, como os exemplificados abaixo.

A partir desses estudos surgiram hipóteses de que as proteínas transcritas pelo *GBA* e a  $\alpha$ SIN estariam implicadas em uma rota metabólica comum. A observação da ocorrência da DP em alguns pacientes com DG tipo 1, não neuropática, e em seus parentes de primeiro grau, levou a identificação de variantes heterozigotas no *GBA* como sendo um fator de risco genético para a doença de Parkinson idiopática (COX et al., 2015; ELSTEIN et al., 2015; SCHAPIRA et al., 2015). A penetrância dos portadores de variantes s do *GBA* para desenvolver DP foi estimada em 13,7% aos 60 anos e 29,7% aos 80 anos de idade (BEAVAN et al., 2015; ANAHEIM et al., 2012). Outro estudo definiu que, ao contrário do que publicado por Bultron em 2010, os pacientes com DG teriam o mesmo risco relativo de terem DP do que indivíduos com DP portadores de um alelo com variante em *GBA* (DP-*GBA*) (E; AHV, 2021). Menozzi definiu que aos 60 e 80 anos, os riscos de DP em pacientes com DG são de ~5 e 9%-12%, respectivamente, o que é significativamente maior do que os de não portadores (0,7 e 2,1%, respectivamente), mas semelhante aos 1,5-14% e 8-19% de prevalência em DP-*GBA* (E; AHV, 2021).



**Figura 7:** Traduzida de Brockmann et al. (2011), demonstrando a linha do tempo da associação entre o gene *GBA* e a doença de Parkinson.

Sobre a diferença de fenótipo entre pacientes com DP heterozigotos, ou não, para variantes do *GBA*, há divergências de estudos que consideram que, nos heterozigotos, o início da doença é mais precoce e com maior incidência de sintomas neuropsiquiátricos (TOMMASO BECCARI et al., 2011; PITCAIRN et al., 2018) dos que consideram que não há distinção entre as apresentações (SCHAPIRA et al., 2015).

Atualmente, está sendo observado que pacientes com DP heterozigotos para a variante em *GBA* têm maior prevalência e severidade de bradicinesia, complicações motoras induzidas pelo tratamento, hiposmia, disfunção sexual, declínio cognitivo, alucinações, depressão e ansiedade (SARDI et al., 2015; SIDRANSKY et al., 2012; E. S. FAHANAAND et al., 2017). Em um estudo israelense retrospectivo com 19 pacientes com DP e DG, foi tentado caracterizar o fenótipo e a progressão da doença em um *follow-up* de 10 anos. Foi observado nesses pacientes um início mais precoce de DP, com média de início de 49.7 anos. A duração média de tempo de DP entre os 5 pacientes homozigotos para a variante N370S (fenótipo tido como mais leve) falecidos, quando

comparados com os 3 pacientes falecidos com variante N370S/outra, foi de 11,8 anos para o primeiro grupo e 9,6 para o segundo grupo (LOPES et al., 2016).

Informações conflituosas são vistas em relação aos achados em exames de neuroimagem. Em um estudo com pacientes com DP com e sem variantes no gene *GBA*, utilizando tomografia computadorizada por emissão de fóton único para avaliação de neuroimagem, foi observado que portadores da variante do gene *GBA* têm menor captação nas regiões parietais posteriores e occipitais posteriores quando comparadas a pacientes com DP sem variantes. Também foi encontrada maior depleção de sítios de ligação de dopamina do corpo estriado (STANDAERT et al., 2016). Entretanto, outro estudo com imagens de tomografia com emissão de pósitron com fluorodopa e de único fóton com ligantes sensíveis a dopamina, o padrão encontrado foi assimétrico e indistinguível entre os grupos (SCHAPIRA et al., 2015)

Em relação às variantes, tem-se que o risco de DP é diferente dependendo da variante do *GBA* encontrada. O risco é considerado maior, com um *odds-ratio* de 9.92 a 21.29, para algumas variantes como a IVS2+1 G>A e a L444P. A N370S tem um *odds-ratio* de 2.84-4.94 em relação à população geral (BARKHUIZEN et al., 2016).

## **CAPÍTULO 4**

### **2.5 Hipóteses para a associação entre doença de Gaucher e a doença de Parkinson**

O mecanismo pelo qual variantes no *GBA* aumenta o risco de DP ainda não está elucidado, visto que o efeito deletério do gene esperado em homozigotos (levando ao defeito enzimático e assim acúmulo de  $\alpha$ SIN) não justificaria os achados dos mesmos sintomas em pacientes com a variante em somente um alelo (SCHAPIRA et al., 2015)

Devido à semelhança de sintomatologia com a DP idiopática, foram sugeridas explicações para a via em comum dessas doenças que envolveriam acúmulo de  $\alpha$ SIN, defeito mitocondrial, estresse do RE, defeitos na autofagia, entre outros. Entretanto, tais explicações não contemplam o

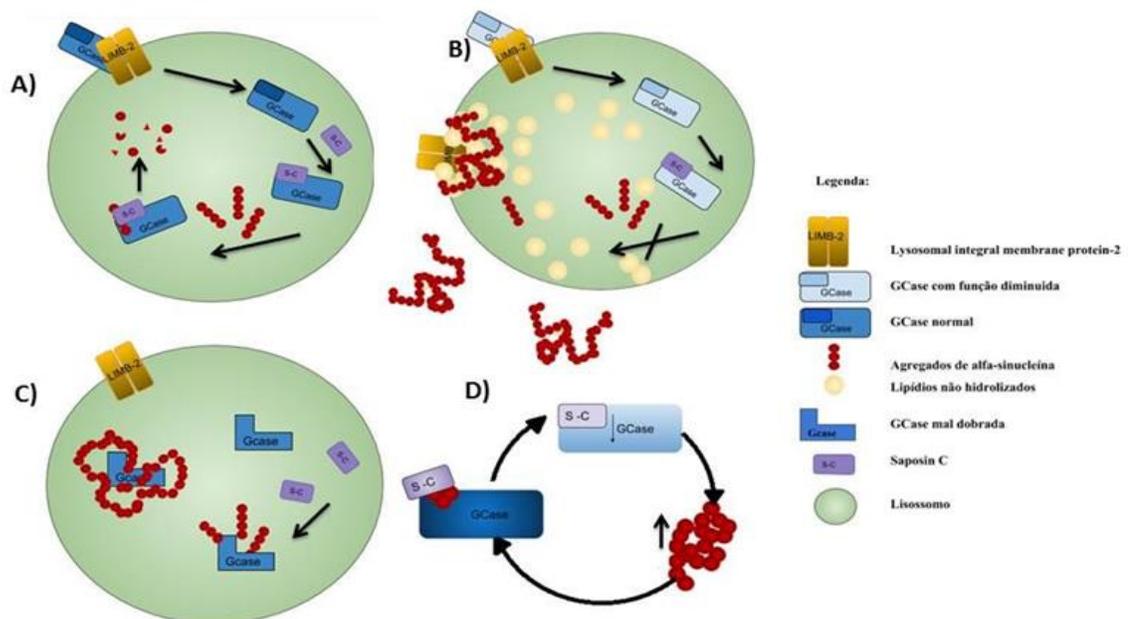
fato de que pacientes com variantes no *GBA* nem sempre desenvolvem DP (MIGDALSKI-RICHARDS et al., 2016).

O organismo humano possui um controle da qualidade das proteínas formadas, feito principalmente pelos lisossomos. Tal controle garante que proteínas mal formadas ou defeituosas não se acumulem ou prejudiquem o organismo. O defeito nesse processo tem forte relação com doenças neurodegenerativas, principalmente a DP e a DA (TOMMASO BECCARI et al., 2011; SARDI et al., 2015; SAUERBIER et al., 2016).

O processo de degradação por autofagia lisossomal é um sistema complexo que ocorre nas três principais vias. São elas: macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas. O processo de macroautofagia é definido como sequestro de regiões completas do citosol incluindo não somente proteínas solúveis como também organelas completas numa vesícula de duas membranas denominadas de autofagossoma. A origem desse autofagossomo é tido como oriundo do RE ou do complexo de Golgi. Como esse vacúolo não possui enzimas, a digestão só ocorre quando este se funde a um lisossomo (KAUSHIK et al., 2018). A microautofagia consiste na invaginação e digestão de pequenas partes do citosol. Participam do *turnover* de proteínas senis em diversos tipos de células. Enquanto que a autofagia mediada por chaperonas é caracterizada pela seletividade, as chaperonas entregam diretamente ao lisossomo as proteínas sinalizadas. Em seguida, o complexo substrato-chaperona é transportado para a superfície lisossomal e interage com o complexo de translocação da proteína de membrana 2, associada ao lisossoma multimérico (LAMP-2A). Após a combinação de substrato com a proteína, está dentro do lúmen lisossomal e é rapidamente degradada, enquanto o complexo de translocação LAMP-2A é desmembrado em monômeros até que o próximo complexo substrato-chaperona se ligue novamente a LAMP-2A. Esse processo de degradação permite a remoção de proteínas específicas sem prejudicar o entorno (NAVARRO et al., 2020).

No sistema nervoso central (SNC), as vias de autofagia são particularmente relevantes, o que é necessário para eliminar proteínas alteradas e organelas danificadas (NAVARRO et al., 2020). A função mais crítica dessa rede de proteostase ocorre no compartimento ER, onde aproximadamente um terço do proteoma da célula é sintetizado, dobrado e processado (STOJKOVSKA et al., 2022).

Independente do processo, todos os substratos são, em último caso, levados até o lisossomo, em que diversas hidrolases rapidamente os degradam. Uma das rotas de degradação da  $\alpha$ SIN, tida como a principal, é pela via mediada por chaperonas. Estudos revelam que uma função defeituosa do lisossomo parece estar envolvida em formas familiares de DP como consequência da degradação deficiente da  $\alpha$ SIN (TOMMASO BECCARI et al., 2011). Considera-se que heterozigotos podem ter 50-60% de atividade residual da GCase, atividade esta suficiente para prevenir manifestação sistêmica da DG, dependendo da variante. Para explicar o risco aumentado de DP nessa população, passou-se a considerar que, em heterozigotos, a proteína oriunda da tradução seria mal dobrada com ganho ou perda de função. Atualmente, tenta-se explicar essa associação por meio de três hipóteses, todas com estudos que as comprovem ou as refutam. As principais teorias são exemplificadas na Figura 8.



**Figura 8: Hipóteses para a associação entre a glucocerebrosidase e o acúmulo de alfa-sinucleína.** A) Função normal do lisossomo com degradação da alfa-sinucleína sem conteúdo lipídico acumulado na organela; B) Teoria da perda de função em que a diminuição da atividade da glucocerebrosidase levaria a uma perturbação da homeostase lipídica e prejuízo do transporte de membrana, levando a déficit do clearance de alfa-sinucleína; C) Teoria do ganho de função em que a glucocerebrosidase mal dobrada levaria a um aumento do acúmulo de alfa-sinucleína; D) Teoria da alça em que a alfa-sinucleína competiria com o sítio de ligação da saposina C, levando a uma diminuição da atividade enzimática, o que acarretaria em um aumento do acúmulo de alfa-sinucleína e assim sucessivamente.

A primeira hipótese é a chamada “hipótese do ganho de função”, em que a GCase mal dobrada interagiria diretamente com a  $\alpha$ SIN, levando a sua agregação e acúmulo. A variante mais encontrada em pacientes com DP esporádica é a N370S, que causa mal dobramento proteico, sendo a variante com maior atividade residual entre todas as variantes do *GBA* (MCNEILL et al., 2012). Tal interação entre GCase e  $\alpha$ SIN já foi demonstrada em lisossomos (um ambiente ácido), inclusive demonstrando que o aumento de GCase mal dobrada levaria ao aumento de  $\alpha$ SIN em modelos animais de 21% a 148% (MIGDALSKI-RICHARDS et al., 2016; SARDI et al. 2015).

A segunda hipótese propõe uma perda de função da GCase ocasionada, por exemplo, pela degradação das enzimas mal dobradas. Tal perda da atividade enzimática levaria a um acúmulo de substrato (glicocerebrosídeos), o que levaria a um desbalanço proteico intracelular. O acúmulo anormal de glicolipídeos levaria a alterações do tráfego e degradação das  $\alpha$ SIN nesse ambiente. Estudos com injeção de Conduritol-B-Epoxide, um inibidor do *GBA*, levaram a um aumento de cerca de 20% de  $\alpha$ SIN em modelos celulares (MIGDALSKI-RICHARDS et al., 2016). Estudos com cérebro de pacientes com DP idiopática mostraram que tanto a expressão quanto a atividade da GCase estavam diminuídas na substância negra e que a redução da atividade da GCase era associada a um acúmulo de inclusões de  $\alpha$ SIN comparado a regiões não afetadas (PITCAIRN et al., 2018). Fala a favor dessa hipótese o achado de que a atividade da GCase no LCR mostrou-se reduzida em pacientes com DP-*GBA*, e particularmente no subgrupo de estágio inicial ( $H & Y \leq 2$ ) e em portadores de variantes diferentes da N370S (PARNETTI et al., 2014).

Em outro estudo, uma redução seletiva na ceramida total (produto da hidrólise da glicosilceramida pela GCCase), mas não na esfingomielina, foi recentemente relatada em estágio inicial de DP do córtex cingulado anterior. A redução de ceramida foi observada justamente em regiões do cérebro que acumulam  $\alpha$ SIN e que possuem deficiência de GCCase. No entanto, esses achados são difíceis de associar a uma diminuição na atividade da GCCase, pois nenhuma diminuição nos níveis de ceramida foi observada em cérebros de camundongos com DG (SARDI et al., 2015).

Uma terceira hipótese sugere uma alça de retroalimentação intracelular, em que uma deficiência da GCCase levaria a um acúmulo de agregados de alfa-sinucleína. Tal acúmulo levaria subsequentemente a uma diminuição da atividade da GCCase, o que levaria, conseqüentemente, a um aumento do número de agregados dessa proteína. Esse fenômeno ocorreria através de uma interação direta entre a glucocerebrosidase e  $\alpha$ SIN em um ambiente ácido, assim como aquele presente nos lisossomos (MIGDALSKI-RICHARDS et al., 2016). Essa teoria é consistente com o achado de que agregados de  $\alpha$ SIN inibem o tráfego de proteínas entre o RE e o complexo de Golgi, exacerbando a alça (PITCAIRN et al., 2018).

Para o melhor entendimento sobre a interação entre a GCCase e a  $\alpha$ SIN, tem-se que levar em consideração o papel da SAP C nesse processo. As saponinas são um conjunto de quatro pequenas glicoproteínas, denominadas saposinas A-D, que atuam como ativadores enzimáticos em múltiplos estágios de degradação dos esfingolípídeos lisossômicos, assim como na digestão lisossomal. A SAP C tem particular relevância para a DG, pois é um ativador necessário para a GCCase, com mecanismo de ação ainda não totalmente elucidado. Acredita-se que a SAP C se associe tanto à GCCase quanto à membrana fosfolipídica, reunindo-as para que a GCCase possa hidrolisar a glicosilceramida endógena. A SAP C também pode ajudar a extrair e solubilizar o substrato lipídico da membrana, tornando-o acessível para a hidrólise (TAMARGO et al., 2012).

A importância da SAP C foi demonstrada em um estudo em que modelos de rato com DG com formas polimórficas da prosaposina, precursor da SAP C, apresentaram uma forma mais agressiva da doença, com comprometimento neurológico e déficits tanto na autofagia quanto na homeostase de proteínas do SNC. Tal forma anômala da prosaposina induziu a um maior acúmulo de proteínas mal dobradas, incluindo  $\alpha$ SIN (SARDI et al., 2015). Segundo outro estudo, a  $\alpha$ SIN em sua forma helicoidal, ligada a membrana, interagiria com a GCCase, diminuindo sua atividade,

e que a SAP C, ao competir pelo sítio de ligação, protegeria essa enzima ao impedir sua interação com o  $\alpha$ SIN. Essa hipótese foi demonstrada *in vitro* em camundongos *knockout* para  $\alpha$ SIN, em que foi observado um aumento de 35% na atividade da glicocerebrosidase, sem afetar o nível geral da enzima (SARDI et al., 2015).

Atualmente, acredita-se que as alterações na GCase, por si só, não são responsáveis pelo acúmulo de  $\alpha$ SIN, havendo outros fatores como alterações genéticas ou modificações na degradação lisossomal. Outra teoria tenta explicar o porquê da DP em pacientes que são heterozigotos para o gene *GBA*. A do estresse do RE sugere que glicocerebrosídeos mal dobrados podem oprimir o sistema ubiquitina-proteossomo (um sistema de sinalização e degradação protéica nessa organela), causando atraso na destruição de proteínas acumuladas, incluindo  $\alpha$ SIN, seu substrato natural de ação (TOMMASO BECCARI et al., 2011). Tal teoria sugere que as proteínas mal dobradas, não conseguindo ser degradadas pelo RE, levariam a um estresse dessa organela, o que teria como consequência um aumento da apoptose (MIGDALSKI-RICHARDS et al., 2016). Um interessante estudo de 2022 indicou, através de estudos *in vitro*, que a GCase se acumula em espécies insolúveis seletivamente após a inibição do tráfego RE-Golgi, induzida por  $\alpha$ -syn, mas não após a indução geral de estresse do ER ou *knockout* de LIMP2 (Lysosomal integral membrane protein-2) (STOJKOVSKA et al., 2022). A análise de microsomas de RE de cérebro de pacientes com DP idiopático indicou que os agregados de GCase também ocorrem no RE *in vivo* (STOJKOVSKA et al., 2022).

A degradação associada ao RE depende da função de parkina, proteína super expressa em situações de estresse dessa organela para impedir a acumulação de substrato e manter intactos os neurônios dopaminérgicos. Sem a superexpressão da parkina, há menos sensibilidade dos inibidores de proteossoma dependentes da atividade do sistema parkina-ubiquitina, tornando-os incapazes de prevenir os efeitos tóxicos da acumulação de  $\alpha$ SIN (ELSTEIN et al., 2015).

Em resumo, o papel das variantes no gene *GBA* na patogenia das sinucleinopatias não é totalmente compreendido. O fato de que alguns pacientes com DG nunca desenvolveram DP é um dos fatores para não se aceitar que somente a perda da função enzimática seja a responsável pelo acúmulo de  $\alpha$ SIN. Muitas variantes encontradas no gene *GBA* são de perda de função e não de ganho, como ocorre na teoria da proteína mal dobrada, também não podendo respaldar essa última teoria como a única correta.

Há estudos que mostram que mesmo os heterozigotos possuem aumento de  $\alpha$ SIN, mesmo sem interferência da atividade da GCase. Uma explicação possível seria a de que variantes da GCases por si só não seriam suficientes para induzir patologias associadas a  $\alpha$ SIN, mas sim ocorreriam quando houvesse perturbação do componente lisossomal da rota de degradação (MIGDALSKI-RICHARDS, 2016). O aprimoramento terapêutico de múltiplas vias de proteostase pode fornecer benefícios ótimos na DP, dados os efeitos deletérios pleiotrópicos do acúmulo de  $\alpha$ -syn em vários locais subcelulares.

As mitocôndrias também parecem ter um papel importante nessa associação entre DG e DP. As mitocôndrias são organelas celulares responsáveis não somente pela produção de energia celular, mas como também pela homeostase do cálcio, pela produção do potencial de membrana, pela apoptose e pela produção de esteróides. Variantes nos genes *PARK2*, *PINK1* e *Parkin* ou *DJ-1*, que afetam a morfologia e a função das mitocôndrias, foram identificadas como causadoras da DP familiar. A homeostase do cálcio também já foi implicada na patogênese da DP (SCHAPIRA et al., 2015).

Atualmente, poucos estudos tentam relacionar variantes do *GBA* com a função mitocondrial. Estudos promovendo a perda da função do *GBA* em modelos celulares demonstraram diminuição na fosforilação da adenosina difosfato (ADP), diminuição do potencial de membrana e aumento na geração de radicais livres. Foi também demonstrado que GCases mal dobradas com ganho de função levaram a uma redução significativa do consumo de oxigênio e produção de adenosina trifosfato (ATP) (MIGDALSKI-RICHARDS et al., 2016). Estes estudos sugerem que tanto perda quanto ganho de função da GCase causam defeitos mitocondriais, colocando essa organela como um importante fator a ser considerado na patofisiologia da DP em pacientes com DG.

A última hipótese que citaremos propõe que os agregados de  $\alpha$ SIN possuem um mecanismo de transmissão celular semelhante aos príons, sendo transmitidos de célula a célula através de exocitose e subsequente endocitose em células vizinhas. Os macrófagos, a célula mais afetada na DG, serviriam de carreador destes agregados (BAE et al., 2014). A  $\alpha$ SIN, tanto intra quanto extracelular, pode acumular-se e espalhar-se em um ambiente rico em lipídios, como encontrado nas células de Gaucher. O acúmulo de  $\alpha$ SIN ao redor das células é considerado tóxico e capaz de aumentar o agregado intracelular através do processo de *seeding*, o que contribui para a formação

de CL (BAE et al., 2014). Essa hipótese, entretanto, não explica o risco aumentado em heterozigotos de DP, tendo em vista a ausência de acúmulo lipídico nos macrófagos desses pacientes. Uma possível explicação é que um segundo insulto, como uma nova variante somática, pode ocorrer em macrófagos isolados, o que acarretaria em um acúmulo de  $\alpha$ SIN e sua posterior propagação (BARKHUIZEN et al., 2016).

## CAPÍTULO 5 - O papel dos lisossomos na doença de Parkinson

### 2.6.1 Introdução

O papel dos lisossomos e a correlação da enzima GCCase com a alfa-sinucleína já foi abordado em capítulos anteriores. Atualmente, tem-se também estudado a correlação de outras enzimas lisossomais com a fisiopatologia da DP, principalmente pela progressiva diminuição da capacidade de processamento lisossomal com o envelhecimento (NAVARRO-ROMERO; MONTEIRO; MARTINEZ-VICENTE, 2020). A conexão entre disfunção lisossomal e neurodegeneração também é demonstrada pela descoberta de que a inibição de enzimas lisossômicas leva ao acúmulo e agregação anormal de proteínas, perda sináptica e morte neuronal tanto *in vitro* quanto *in vivo* (CHU et al., 2009).

A DP tem sido cada vez mais associada ao lisossomo após a descoberta de vários genes autossômicos dominantes e recessivos associados à DP, correlacionados com outros genes importantes para o funcionamento dessa organela. A agregação de  $\alpha$ -sinucleína foi relatada no cérebro de pacientes e modelos animais de diferentes LSDs, incluindo doença de Gaucher, doença de Fabry, doença de Niemann-Pick, doença de Sandhoff, doença de Tay-Sachs, leucodistrofia metacromática,  $\beta$ -galactosialidose e gangliosidose GM2, doença de Krabbe lipofuscinose ceróide neuronal (NAVARRO-ROMERO; MONTPEYÓ; MARTINEZ-VICENTE, 2020).

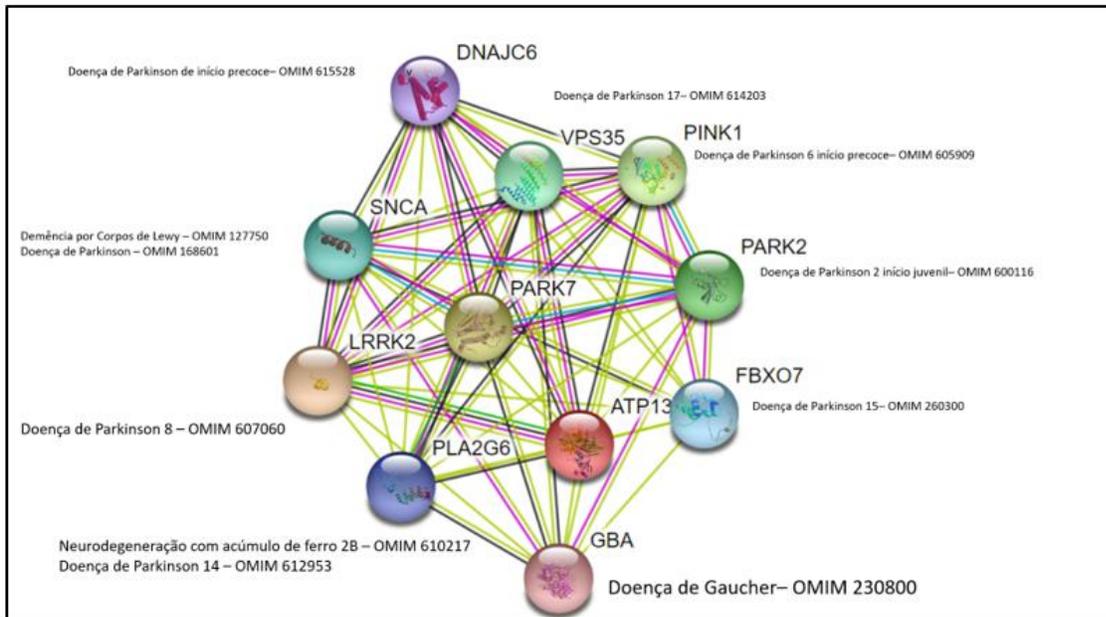
Nas figuras abaixo, por meio da ferramenta *STRING* de interação proteica, vemos a correlação do *GBA* tanto com muitas proteínas associadas à doença de Parkinson em A como também com outras proteínas associadas a doenças lisossomais em B (Figura 9). Além da DP, DA, esclerose lateral amiotrófica (ELA), demência frontotemporal (DFT) e doença de Huntington (HD), também parecem estar, de alguma forma, associadas à disfunção lisossomal (NAVARRO-ROMERO; MONTEIRO; MARTINEZ-VICENTE, 2020). Algumas características da DP são comumente observadas em outras LSDs, como, por exemplo, na gangliosidose GM1, que é um distúrbio de armazenamento lisossômico causado por atividade deficiente da enzima da  $\beta$ -galactosidase, como também podemos ter parkinsonismo e neurodegeneração. A redução na expressão de outras enzimas lisossômicas (como catepsina D, GCCase e  $\alpha$ -galactosidase) também foi observada na substância nigra de pacientes com DP em comparação com controles, particularmente em neurônios contendo inclusões de  $\alpha$ -sinucleína (HUE BECKER et al., 2019). O líquido cefalorraquidiano (LCR) representa um potencial espelho dos complexos eventos

moleculares dinâmicos que ocorrem no cérebro (PARNETTI et al., 2014). Dessa forma, falaremos neste capítulo sobre estudos que relacionam medidas de enzimas lisossomais nessa amostra.

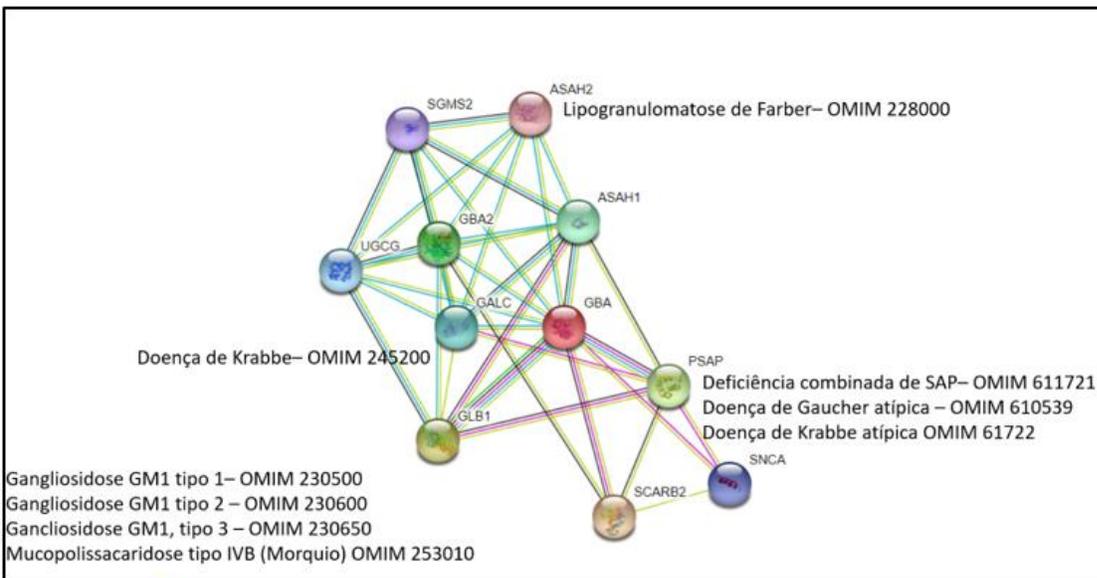
O nível de  $\alpha$ -sinucleína no LCR já foi reportado como diminuído na DP-*GBA* (mediana=1334,10 pg/mL, P=0,005) e em pacientes com DP idiopática (1435,00 pg/mL, P=0,001) em comparação com controles saudáveis (1686,50 pg/mL) (HUH et al., 2021). No mesmo estudo, os níveis de  $\alpha$ -sinucleína não diferiram significativamente entre PD-*GBA* e pacientes com DP idiopática, porém tiveram efeito significativo na idade de início (P=0,005; maior em pacientes com idade de início mais avançada) e sexo (P=0,049; menor em pacientes do sexo masculino) em pacientes com DP (HUH et al., 2020). A demonstração de que a forma oligomerização da  $\alpha$ SIN seria um melhor biomarcador em LCR foi demonstrada em outro estudo, em que os níveis de  $\alpha$ -sinucleína também encontraram-se significativamente reduzidos (P<0,05) em pacientes com DP. Entretanto, os níveis de oligômeros de  $\alpha$ -sinucleína encontravam-se aumentados, com uma razão oligomérica/total de  $\alpha$ -sinucleína mais alta em pacientes com DP quando comparados aos controles (P<0,001) (PARNETTI et al., 2014). Tal achado foi também encontrado em Tokuda et al. (2010), o que vai ao encontro da importância fundamental na patogênese da DP da agregação de  $\alpha$ -syn em formas oligoméricas (TOKUDA et al., 2010). A alfa-sinucleína fosforilada (PS-129) também tem sido considerada um biomarcador promissor para a DP, o que pode contribuir para estudos futuros (WANG et al., 2012). Huh et al. (2020) reportaram uma importante associação inversa entre a razão glucosilceramida/esfingomielina e os níveis de  $\alpha$ -sinucleína no LCR de pacientes com DP, inclusive em DP idiopática, sugerindo que pacientes com DP com alta razão GlcCer/SM poderiam ser candidatos a terapias direcionadas a redução do substrato glicosilceramida (HUH et al., 2021).

Abaixo temos alguns exemplos de doenças lisossomais que já foram associados com a doença de Parkinson.

A)



B)



**Figura 9 (A e B):** Representação das interações proteicas por meio da ferramenta *STRING* da Beta glicocerebrosidase (GBA) com proteínas relacionadas à doença de Parkinson (A) e com outras doenças lisossomais (B). Linhas: azuis claras - interações oriundas de databases; rosas - interações determinadas experimentalmente; verdes - genes próximos preditos de interagirem; vermelhas - fusão de genes; azul escuro - genes co-ocorrentes; amarelas - interação oriunda de análise textual; pretas - genes reportados de ocorrerem em co-expressão.

### 2.6.2 Esfingomielinase ácida

O gene *SMPDI* codifica a enzima lisossomal esfingomielina fosfodiesterase/esfingomielinase ácida (ASMase), que hidrolisa a esfingomielina em ceramida e fosfocolina. A perda de função da ASMase leva ao acúmulo de esfingomielina e sua forma desacetilada liso-esfingomielina dentro do lisossomo em diferentes órgãos. Variantes patogênicas bialélicas neste gene causam as doenças de Niemann-Pick tipos A e B. Os pacientes do tipo A apresentam neurodegeneração progressiva e baixa expectativa de vida, enquanto os pacientes do tipo B geralmente não apresentam sinais de envolvimento do SNC. Portadores de variantes patogênicas em *SMPDI* apresentam risco maior de desenvolver DP que a população normal (NAVARRO-ROMERO; MONTEIRO; MARTINEZ-VICENTE, 2020). Alcalay et al. (2019) demonstraram *in vitro* que as variantes patogênicas p.Leu302Pro e p.Pro330fs prejudicam o tráfego de ASMase para o lisossomo, resultando u em níveis aumentados de  $\alpha$ -sinucleína.

### 2.6.3 Catepsina D

O gene *CTSD* codifica uma enzima lisossomal relevante, a catepsina D. Variantes patogênicas bialélicas nesse gene causam uma doença lisossomal neurodegenerativa grave conhecida como Lipofuscinose ceróide neuronal (LCN). Diminuição na atividade da catepsina D foi relatada no córtex temporal e no córtex frontal de pacientes com DP esporádica em estágio avançado (MOORS et al., 2019). Entretanto, tanto os níveis enzimáticos quanto o acúmulo de  $\alpha$ SIN tecidual possuem resultados conflitantes em outros estudos, tornando incerta a inclusão de variantes nesse gene como alelo de risco (NAVARRO-ROMERO; MONTPEYÓ; MARTINEZ-VICENTE, 2020).

### 2.6.4 Beta-galactosidase

O gene *GLB1* codifica beta-galactosidase, uma hidrolase lisossomal que cliva a beta-galactose terminal de gangliosídeos (GM1) e outros glicoconjugados (REGIER; TIFFT; ROTHERMEL, 1993). Doenças associadas a esse gene incluem a Gangliosidose GM1 tipo I, II e III, e a Mucopolissacaridose tipo IVB (doença de Morquio). Em um estudo sobre biomarcadores

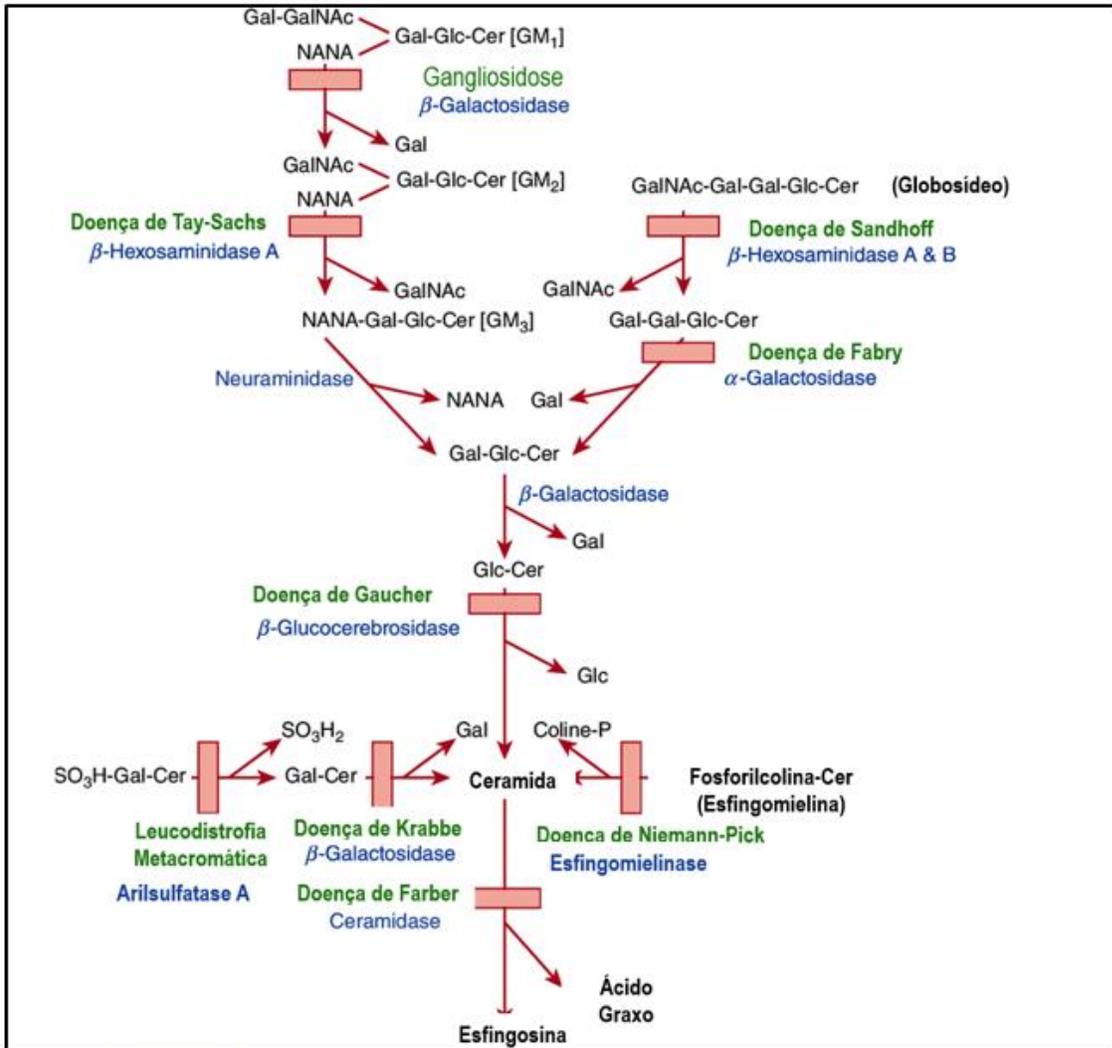
em LCR em pacientes com DP, os níveis de atividade da beta-galactosidase foram significativamente maiores em pacientes com DP em comparação com os controles (VAN DIJK et al., 2013a). Em outro estudo, entretanto, esse nível não difere (BALDUCCI et al., 2007a).

### **2.6.5 Alfa-Manosidase**

O gene *MAN2B1* codifica a enzima lisossomal alfa-manosidase. A falta ou deficiência de uma hidrolase, como a alfa-manosidase lisossomal, resulta no acúmulo multissistêmico de oligossacarídeos não digeridos nos lisossomos (MALM; NILSSEN, 1993). Em um estudo medindo enzimas lisossomais no líquido de pacientes com DP, pareados com controles, foi demonstrada uma redução dessa enzima em pacientes [redução de 3 vezes o valor ( $P < 0.01$ )] (BALDUCCI et al., 2007b). Não foi notada diferença desses valores em plasma. Tal estudo sugere que esses resultados, combinados com a medição do padrão isoenzimático, podem representar uma característica bioquímica do LCR de pacientes com DP (BALDUCCI et al., 2007a).

### **2.6.6 Alfa fucosidase**

O gene *FUCA1* codifica a enzima alfa-L-fucosidase, cuja deficiência leva a uma doença de armazenamento lisossomal, com acúmulo de fucose nos tecidos, denominada fucosidose. Em um estudo de medida de enzimas lisossomais no LCR de pacientes com DP, a atividade da alfa-fucosidase mostrou-se reduzida em pacientes com DP em comparação com os controles (VAN DIJK et al., 2013b). Segundo o mesmo estudo, uma combinação da medida de  $\alpha$ -fucosidase e  $\beta$ -galactosidase, após a normalização para a concentração de proteína totais da amostra, consegue discriminar melhor pacientes com DP de controles com valores de sensibilidade e especificidade de 63% (VAN DIJK et al., 2013a).



**Figura 10:** Modificada de Zimran et al. As vias catabólicas de glicoesfingolípídeos selecionadas estão envolvidas em algumas das doenças de armazenamento de glicolípídios. Sólidos quadrados representam os caminhos bloqueados causados por deficiências hereditárias específicas de enzimas, que dão origem ao acúmulo de respectivos substratos. Modificado de Zimrain (2010) e Elstein (2010).

### 2.6.7.Hexosaminidasas

O gene *HEXA* codifica a enzima beta-hexosaminidase A (HEX A). Os distúrbios HEXA são atualmente melhor considerados como um *continuum* da doença com base na quantidade de atividade residual da enzima conforme o impacto biológico das variantes patogênicas no gene. A HEXA é necessária para a degradação do gangliosídeo GM2 e produção do gangliosídeo GM3. Sua deficiência leva a um acúmulo de gangliosídeo GM2 nos lisossomos do cérebro e das células

nervosas (TORO; SHIRVAN; TIFFT, 1993). O fenótipo clínico clássico é conhecido como doença de Tay-Sachs. O gene *HEXB* codifica a subunidade beta das enzimas beta-hexosaminidase A e beta-hexosaminidase B, sendo esta última envolvida na hidrólise de outros substratos com terminação hexosamina, que não o gangliosídeo GM2. O fenótipo clínico clássico é conhecido como doença de Sandhoff.

Apesar de a  $\alpha$ -Syn interagir com vários glicoesfingolípídeos (incluindo fosfatidilserina e vários gangliosídeos) por meio de um domínio chamado domínio de ligação aos gangliosídeos (GBD), essa proteína parece ter uma preferência marcada pelo GM3, considerado um gangliosídeo cerebral menor cuja expressão aumenta com o envelhecimento.<sup>4</sup> O GM3 é substrato da enzima neuraminidase.<sup>1</sup> Uma diminuição significativa na atividade da neuraminidase na substância negra de duas coortes independentes tecidos cerebrais de pacientes com DP em comparação com controles pareados por idade foi também reportada (BECKER et al., 2019). Esse domínio está localizado entre as posições 34-50 da proteína e variantes patogênicas dentro desse domínio, como p.Glu46Lys, demonstraram afinidade mais forte com GM3 que com a proteína de tipo selvagem (DI PASQUALE et al., 2010).

Muitos desses glicoesfingolípídeos possuem uma rota metabólica comum, na qual defeitos enzimáticos em suas etapas levam a doenças lisossomais conhecidas como exemplificadas na Figura 10. GM1 (substrato da enzima beta-glucosidase) demonstrou acelerar a agregação extracelular de peptídeo  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ ), sugerindo que este determinado gangliosídeo também desempenha um papel fundamental na formação da fibrila amilóide (JO et al., 2000). Tal achado corrobora a demonstração de que GM1 induziu a formação de oligômeros de  $\alpha$ -syn com uma estrutura  $\alpha$ -helicoidal, o que foi também demonstrado em modelo animal (DI PASQUALE et al., 2010; PARNETTI et al., 2014). Os gangliosídeos GM2 (substrato da enzima hexosaminidase A) e GM3 também induziram algumas estruturas  $\alpha$ -helicoidais, mas tiveram efeitos inibitórios fracos na fibrilação  $\alpha$ -syn (DI PASQUALE et al., 2010). Dessa forma, tal gangliosídeo parece exercer um efeito protetor nos processos neurodegenerativos que ocorrem na DP (PARNETTI et al., 2014).

A atividade deficiente das enzimas beta-hexosaminidase A e beta-hexosaminidase B leva ao fenótipo denominado de doença de Sandhoff (DS) (XIAO; TIFFT; TORO, 1993). Consistente com o fenótipo grave, os camundongos SD mostraram acúmulo neuronal extenso de gangliosídeo GM2 em todo o sistema nervoso central e periférico. A conclusão desse estudo foi de que  $\alpha$ - e  $\beta$ -

sinucleínas, além do gangliosídeo GM2, acumulam-se em neurônios de cérebros de camundongos DS (SUZUKI et al., 2003).

Em um estudo que analisou  $\alpha$ -syn, proteína tau fosforilada e enzimas lisossômicas no LCR de 79 pacientes com DP em comparação com 61 controles saudáveis, a atividade da GCase no LCR foi significativamente diminuída e a atividade  $\beta$ -hexosaminidase foi moderadamente reduzida no grupo DP. Segundo o mesmo estudo, como tal aumento também é encontrado no plasma de pacientes com DG, isso seria consistente com a capacidade do LCR de refletir globalmente o ambiente lisossomal. Segundo esse estudo, a diminuição da GCase, juntamente com o aumento da atividade da  $\beta$ -hexosaminidase observada no LCR de pacientes com DP, fortalecem o paralelismo entre DG e DP (PARNETTI et al., 2014).

### 2.6.8 Beta-Glicocerebrosidase

As interações entre a agregação de glicosilceramida e  $\alpha$ sinucleína estão sob intensa investigação e foram abordadas anteriormente nesta tese. Entretanto, a associação dessa enzima como biomarcador de DP em LCR possui interessantes achados na literatura exemplificados a seguir.

Em um estudo medindo os níveis de atividade de 6 enzimas lisossômicas ( $\beta$ -hexosaminidase,  $\alpha$ -fucosidase,  $\beta$ -manosidase,  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glucocerebrosidase e catepsina D) e 1 enzima endossomal (catepsina E) no LCR de 58 pacientes com DP e 52 controles, os níveis de atividade da  $\beta$ -glicocerebrosidase não diferiram significativamente entre pacientes com DP e controles (VAN DIJK et al., 2013a). Entretanto, em outro estudo LCR de 71 pacientes com DP, comparado a 45 controles neurológicos, a atividade da GCase no LCR foi reduzida em pacientes com DP e, particularmente, no subgrupo de estágio inicial da DP ( $H\&Y \leq 2$ ) (PARNETTI et al., 2014). Parnetti et al. (2014) justificou a diferença da medida da GCase entre as coortes pela diferença de tratamento entre os grupos de pacientes com DP (tratada com drogas dopaminérgicas em sua coorte e *naive* na coorte de Van Dijk) e diferença entre controles (pacientes com condições neurológicas menores em sua coorte vs. indivíduos saudáveis na coorte holandesa). O conteúdo de proteína total do LCR também foi apontado como uma diferença entre os grupos, sendo significativamente maior apenas nos pacientes com DP vs. controles na coorte holandesa (PARNETTI et al., 2014).

A diminuição da atividade da GCase, entretanto, já foi demonstrada em estudos em tecido cerebral. Níveis reduzidos de atividade de glucocerebrosidase (medida usando um ensaio fluorescente no cerebelo, córtex frontal, putâmen, amígdala e substância negra de DP-*GBA* vs. controles) foram relatados em todas as áreas cerebrais, com exceção do córtex frontal (GREGG et al., 2012). A maior deficiência foi na substância negra (redução de 58%;  $p < 0,01$ ) (GREGG et al., 2012). Um estudo posterior foi desenhado para estudar as atividades da hidrolase de esfingolípídeos e a expressão de glicosfingolípídeos na DP, em duas coortes independentes de tecidos da substância negra humana. O estudo demonstrou que a DP esporádica está associada a deficiências em múltiplas hidrolases lisossômicas (por exemplo,  $\alpha$ -galactosidase e  $\beta$ -hexosaminidase), além de atividades reduzidas de GCase (HUEBECKER et al., 2019). Huebecker também demonstrou o acúmulo concomitante de substrato glicosfingolípídeo (esfingosina e lyso-Gb1) e reduções significativas nos níveis de gangliosídeos complexos (por exemplo, GM1a) na substância negra desses pacientes (HUEBECKER et al., 2019).

### **2.6.9 Conclusões**

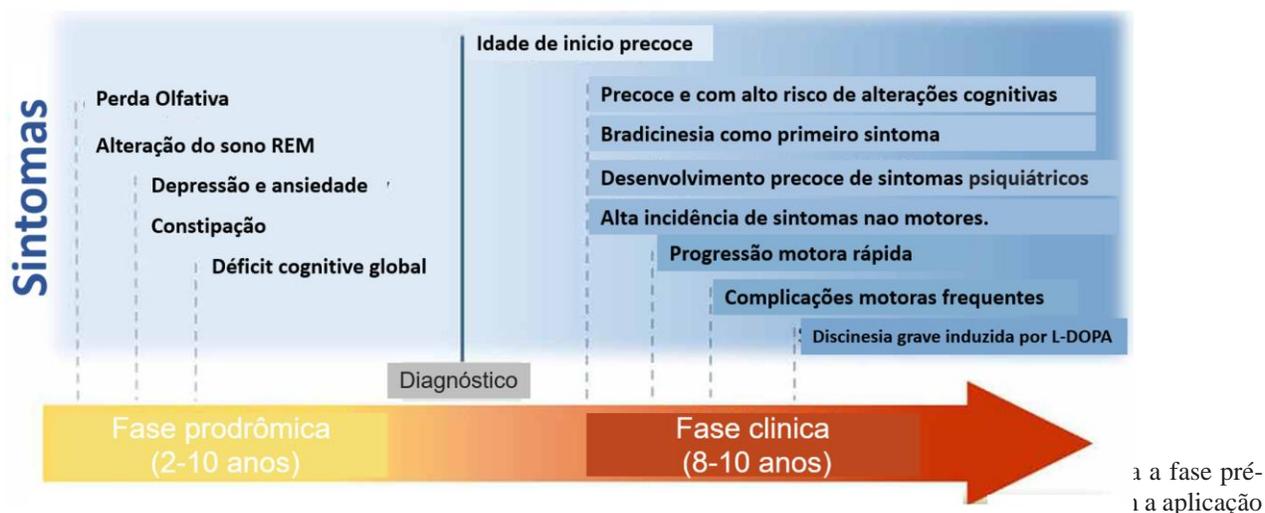
Em conclusão, a atividade de várias enzimas endolisossomal apresenta mudança no LCR de pacientes com DP em comparação com controles saudáveis, corroborando o papel da via endolisossomal na patogênese dessa doença. A utilidade dos níveis de atividade enzimática endolisossomal do LCR como biomarcadores de DP provavelmente terá maior valor ao ser usada uma combinação da atividade dessas enzimas com a quantidade de outros substratos (por exemplo, glicosfingolípídeo e gangliosídeos complexos).

## CAPÍTULO 6

### 2.7 Sinais pré-motores da doença de Parkinson

Por um grande período de tempo, focou-se nos sintomas motores da DP, com os pacientes sofrendo principalmente de rigidez, bradicinesia e tremores. Nas últimas décadas, tem crescido o número de evidências de que a DP é uma doença multissistêmica constituída de vários SNM além dos sintomas clássicos.

Os sintomas considerados motores de DP ocorrem quando mais que 50% dos neurônios dopaminérgicos da substância negra degeneram (MCNEILL et al., 2012). Os sintomas motores podem ser antecidos por um período prodrômico de até 20 anos de duração. Nesse período, os sintomas considerados como SNM podem surgir representando períodos diferentes da mesma história da doença. A maioria dos pacientes com DP há muito tempo, ou com DP severa, apresentam de 6 a 10 SNM (KARIMI-MOGHADAM et al., 2018).



paralela de marcadores de risco e progressão para medir a atividade da doença entre as fases.

Os SNM considerados como tendo evidência forte a moderada de relação com o início de sintomas motores de DP são: hiposmia, desordem do sono REM (*rapid eye movement*), sonolência diurna, constipação, depressão e ansiedade. Os SNM considerados como evidência fraca de associação são: disfunção autonômica, distúrbios de personalidade e comportamentais e sintomas não específicos como fadiga, dor, perda de peso, entre outros (Sauerbier et al., 2016; GATTO et al., 2016). A detecção precoce de sintomas prodrômicos se torna importante quando novas terapias

neuroprotetoras estiverem disponíveis para DP. Atualmente, infelizmente, não há nenhuma (SAUERBIER et al., 2016).

Recentemente, a *International Parkinson and Movement Disorders Society* (IPMDS) criou critérios de pesquisa específicos para sintomas prodrômicos de DP, representando a importância da detecção dos mesmos no contexto dessa doença.

Para entender a progressão dos sintomas da DP, tem-se demonstrado que o depósito de  $\alpha$ SIN não está restrito ao cérebro, podendo ser depositado no bulbo olfatório, no sistema nervoso periférico, no sistema nervoso entérico e até em plexos pélvicos (SWALLOW et al., 2016). A hipótese de que as  $\alpha$ SIN mal dobradas se auto-propagam, célula a célula, via exocitose e endocitose, em regiões do SNC interconectadas, poderia justificar os SNM da DP (PUSCHMANN et al., 2012). Tal propagação teria um padrão previsível, indo do tronco cerebral ao bulbo olfatório, deste para o sistema límbico e, eventualmente, para o neocórtex (SWALLOW et al., 2016). Essa propagação também estaria envolvida na qualidade dos SNM, estando os subtipos de pacientes com alteração do sono e disautonomia relacionados a rota do tronco cerebral, ansiedade, depressão, e sintomas serotoninérgicos relacionados a rota límbica, e cognição e apatia relacionados a um fenótipo cortical (SAUERBIER et al., 2016).

Em um estudo sobre validação dos testes para SNM de DP, da Movement Disorder Society no Canadá, em que foram avaliados hiposmia, constipação, sonolência, hipotensão ortostática, disfunção erétil, depressão, disfunção urinária e motora, foram encontradas sensibilidade de 81,3% e especificidade de 67,9% no surgimento de DP em seguimento de 4 anos. Os critérios foram considerados independentes entre si (FERESHTEHNEJAD et al., 2017). Em outro estudo de 2012, foram estabelecidas a sensibilidade e a especificidade de apenas uma pergunta para avaliação de distúrbios do sono REM em pacientes já diagnosticados com esse distúrbio em polissonografia. Essa simples pergunta tem sensibilidade e especificidade de respectivamente 92,2% e 87,7% (POSTUMA et al., 2012).

Um estudo transversal italiano com 21 pacientes com DG e familiares encontrou a incidência de 42% de SNM de DP que poderiam representar pródromos dessa doença. No estudo, a incidência de DP aumentou em familiares, porém o estudo não especifica a quantidade (TREZZI et al., 2017). Outro estudo alemão, comparando 40 pacientes com DP (20 com variantes do *GBA* e 20 sem), concluiu que os heterozigotos para a variante tinham maior chance de ter demência,

distúrbios neuropsicológicos e disfunção autonômica (SIDRANSKY et al., 2012). Pacientes heterozigotos para variantes no *GBA* também possuem maior frequência de anormalidades retinianas, como afinamento, conforme avaliado por Tomografia de Coerência Óptica (MCNEILL et al., 2013). Iremos detalhar abaixo alguns dos SNM avaliados na presente tese.

### 2.7.1 Hiposmia

O acometimento do bulbo olfatório leva à hiposmia, que é um dos SNM considerados na presente tese. O olfato é necessário para monitorar agentes transportados pelo sistema respiratório, incluindo substâncias tóxicas e até mesmo alimentos estragados. O olfato, além disso, permite qualidade de vida ao aumentar o sabor dos alimentos. Entretanto, a hiposmia é pouco avaliada em consultas médicas. Muitas vezes, os pacientes não relatam em consultas alterações do olfato, devendo essa ser investigada, haja vista sua associação com doenças degenerativas do SNC.

A patologia da DP iniciaria no núcleo olfatório anterior e no bulbo olfatório. Estudos mostraram uma denervação de neurônios dopaminérgicos mais acentuados em pacientes com hiposmia do que comparado a pacientes sem hiposmia (GODOY et al., 2015; CAVACO et al., 2015). Em um estudo com oitenta e quatro participantes (entre pacientes com DG e portadores de variantes no *GBA*), que avaliou pródromos da DP, a hiposmia foi tida como o marcador prodromático mais precoce e sensível (BEAVAN et al., 2015). Não há relatos de hiposmia em pacientes com DG sem DP ou como efeito colateral do tratamento para DG (MCNEILL et al. 2012). A hiposmia também nem sempre constitui um sintoma pré-motor de DP, haja vista que, em coorte de parentes de primeiro grau de pacientes com DP com hiposmia, apenas 10% desenvolveram DP no seguimento (MCNEILL et al., 2012).

A evolução da hipoxemia no seguimento de pacientes com DG e pacientes com DP-*GBA* tem mostrado piora desse sintoma em comparação com não portadores. Curiosamente, um estudo relatou que a hiposmia mais grave, no início do estudo, poderia prever o desenvolvimento de parkinsonismo nesses indivíduos nos anos seguintes (AVENALI et al., 2019; MENOZZI; SCHAPIRA, 2021). Maior gravidade da hiposmia também foi relatada em pacientes com DP portadores de variantes patogênicas (tanto variantes “leves” quanto “graves” em *GBA*), em

comparação a pacientes com DP sem variantes patogênicas em *GBA* (MENOZZI; SCHAPIRA, 2021).

Em um estudo que se compara a evolução de SNM da DP em uma coorte de pacientes portadores de variantes patogênicas em *GBA*, alterações no teste UPSIT (*University of Pennsylvania Smell Identification Test*) na linha de base previu uma maior deterioração nos escores clínicos em 6 anos em indivíduos *GBA*-positivos, entre eles MoCA, MDS-UPDRS III e BDI (AVENALI et al., 2019). Em um outro estudo de seguimento, com dois anos de duração, apenas de pacientes com DG de 2 anos e portadores de variantes em *GBA*, foi notada uma deterioração significativa nos pacientes com DG nos escores RBDQ, UPDRS parte II e UPDRS parte III (BEAVAN et al., 2015).

### **2.7.2 Alteração do sono REM**

Segundo a literatura, devido à sua alta especificidade e longa latência para doença clínica, o distúrbio comportamental do sono REM (RBD) é um dos mais fortes preditores clínicos de doença neurodegenerativa, sendo, além de mais prevalente em DP-*GBA*, um potencial marcador prodromático para terapia preventiva (BEAVAN et al., 2015; MCNEILL et al., 2012). RBD não é apenas considerada prodromática para a DP, mas também para demência por corpos de Lewy (DCL) e atrofia multissistêmica (AMS). Pacientes com RBD apresentam taxas de feno conversão de 80% e latências de até 15 anos antes do início dos sintomas para essas condições (VIEIRA; SCHAPIRA, 2021). Os dados referentes a RBD são controversos. A RBD foi relatada como ocorrendo com mais frequência em DP-*GBA* e DG-PD em comparação a iDP e em pacientes com DP portadores de variantes “graves”, em comparação com pacientes portadores de variantes “leves” (MENOZZI; SCHAPIRA, 2021). Por outro lado, não foram relatadas diferenças em coortes de portadores de variantes em *GBA* ou em pacientes com DG, em comparação com controles saudáveis não portadores para essa condição (MCNEILL et al., 2012).

### **2.7.3 Constipação**

A constipação é um dos SNM mais frequentes no sistema autônomo e dos distúrbios gastrointestinais da DP. Cerca de 50~80% dos pacientes com DP sofrem de constipação (YU et

al., 2018). Em relação à constipação, poucos relatos investigaram sua ocorrência separadamente de outras características autonômicas na DP-GBA, descobrindo que a constipação pode se apresentar com mais frequência nesses pacientes em relação a não portadores (MCNEILL et al., 2012).

#### **2.7.4 Cognição**

Déficits cognitivos sutis são quase universalmente identificados, mesmo no início da DP, após testes neuropsicológicos detalhados. Cerca de 30 a 40% dos pacientes com DP desenvolveram demência clinicamente definida (POEWE, 2008). Esses déficits cognitivos se relacionam à disfunção executiva frontal, com dificuldades tanto na resolução de problemas como no planejamento e organização, déficits visuoespaciais e algum comprometimento de aprendizado e memória.

Estudos baseados na comunidade sugeriram que, após o diagnóstico de DP, os pacientes GBA-PD mostram risco aumentado de declínio cognitivo, e domínios cognitivos específicos parecem ser mais afetados, principalmente na memória visual de curto prazo (MENOZZI; SCHAPIRA, 2021). Quando estratificados por variantes, pacientes com DP portadores de variantes graves ou bialélicas apresentaram pior função cognitiva em comparação aos não portadores, enquanto que portadores de variantes leves ou de risco não demonstraram diferença (MENOZZI; SCHAPIRA, 2021). Um estudo de seguimento de 6 anos de uma coorte de pacientes de DG e portadores de variantes patogênicas apontou que a melhora da cognição, demonstrada por meio da ferramenta *Montreal Cognitive Assessment (MoCa)*, pode ser provavelmente atribuída a um “efeito de treinamento”, pois os participantes repetiram o mesmo teste várias vezes, e isso pode ter limitado a avaliação (AVENALI et al., 2019).

Haja vista os diversos SNM da DP, os estudos apresentados mostram que a avaliação global desses sintomas pode aumentar a especificidade do teste de investigação para a DP em um contexto de ambulatório. Tal medida é de extrema importância para pacientes com DG pelo risco aumentado de desenvolvimento de DP (E; AHV, 2021).

## CAPÍTULO 7

### 2.8 Conclusões e perspectivas da associação entre as doenças nos pacientes

O conceito de biomarcador, segundo o *The National Institute of Health*, é “uma característica que é objetivamente medida e avaliada como um indicador de um processo biológico normal, de um processo biológico patogênico ou de uma resposta farmacológica a uma intervenção terapêutica” (STRIMBU et al., 2010). O desenvolvimento de biomarcadores não somente ajuda a comunidade científica a identificar populações de risco, mas também auxilia no diagnóstico clínico. Os biomarcadores também constituem ferramentas para monitorizar a progressão da doença, o que pode contribuir para uma abordagem terapêutica personalizada do futuro.

A prevalência da DP é esperada para dobrar dentro das próximas duas décadas, devido ao aumento da expectativa de vida da população. A DP tem surgido também como um fardo sócio-econômico e um desafio para as políticas públicas de saúde. De forma geral, não há biomarcadores para marcar a progressão da DP. Os estudos atuais têm focado em demonstrar o acúmulo de ASIN em fluidos corporais como fluido cérebro espinhal, saliva e sangue (KARIMI-MOGHADAM et al., 2018). Os resultados de tais estudos se mostram contraditórios. Atualmente, acredita-se não ser realista o uso de um único biomarcador como critério tanto de diagnóstico quanto de progressão da doença, sendo um grupo de biomarcadores a melhor escolha (SAUERBIER et al., 2016; KARIMI-MOGHADAM et al., 2018). Considerando os biomarcadores como sendo categorizados em 4 principais subgrupos [clínicos (sintomas pré motores), bioquímicos (biópsias, demonstração de acúmulo de  $\alpha$ SIN do sangue LCR, etc.), genéticos (variantes nos genes *GBA*, *PINK1*, *LRRK2*) e de imagem (tomografia com emissão de pósitron, sonografia transcraniana)], uma combinação de mais de um parece ser uma alternativa para o futuro (DELENCLOS et al., 2016).

Atualmente, o uso de drogas dopaminérgicas, visando a melhora dos sintomas motores, mostra-se uma estratégia limitada, haja vista que possuem pouco efeito nos SNM e apresentam efeitos colaterais como discinesias, movimentos coreiformes, distônicos e outros movimentos involuntários. Não há evidência de que nenhum tratamento atual para DG ajude a reduzir o risco para DP. Da mesma forma, não há evidências de que tratamentos para DP deveriam ser adaptados diferentemente para pacientes com DG (MCNEILL et al., 2012). O aumento de atividade

enzimática no SNC de um modelo animal transgênico com genótipo de DG e fenótipo de forma neuropática mostrou a diminuição da agregação de  $\alpha$ SIN e dos déficits funcionais. Dados pré-clínicos de estudos usando chaperonas para DG em modelos de ratos também relataram diminuição da acumulação de  $\alpha$ SIN do SNC (STANDAERT et al., 2016).

A TRE é usada para controle dos sintomas viscerais e hematológicos, pois não cruza a BHE e não afeta as manifestações neurológicas da DG. A TRS também não tem mostrado efeito sobre o parkinsonismo. Em estudo com o uso de miglustate em 2 pacientes com DG e DP concomitantes, não foi documentado efeito na progressão do parkinsonismo nesses pacientes (SIDRANSKY et al., 2012).

A estratégia terapêutica mais importante atualmente seria um tratamento que pudesse prevenir, desacelerar ou reverter a degeneração neural causada pela DP. Haja vista o marcante papel da  $\alpha$ SIN em tal processo, potenciais tratamentos poderiam incluir: agentes que reduzam a expressão de  $\alpha$ SIN *wild type*, medicamentos que promovam a aumento de chaperonas endógenas e que promovam o redobramento ou o *clearance* de proteínas anormais, agentes ou alvos imunes que removam oligômeros ou agregados tóxicos de  $\alpha$ SIN, entre outros (SCHAPIRA et al., 2015).

Novas terapias de pequenas moléculas, incluindo chaperonas competitivas e não competitivas, que aumentam os níveis de glicocerebrosidase, estão sendo desenvolvidas para superar essas limitações. Algumas delas incluem aminoaçúcares, ambroxol, outros inibidores competitivos da glicocerebrosidase e ativadores não inibitórios que não competem pelo sítio ativo. Esses medicamentos, que demonstraram em diferentes modelos de doenças aumentar a atividade da glicocerebrosidase, podem ter potencial como terapia para a doença de Gaucher e a doença de Parkinson associada a variantes em *GBA* (HAN; SAM; SIDRANSKY, 2020). Abaixo, temos alguns exemplos de tratamentos que tiveram seu efeito ou ao reduzir os níveis de  $\alpha$ -sinucleína e/ou de aumentar a atividade da GCase em estudos pré-clínicos usando modelos baseados em células ou animais da doença de Parkinson associada a *GBA*, que também podem ter utilidade para a doença de Parkinson idiopática (HAN; SAM; SIDRANSKY, 2020). Assim, pacientes com maior risco para DP ou em processo provável de neurodegeneração (pacientes com maior número de SNM) podem representar um grupo ideal para novos tratamentos.

Nome da pequena molécula	Modelo de Doença	Variant e em GBA	Modelo (organismo)	Efeito da pequena molécula
<b>Chaperonas Inibitórias</b>				
NN-DNJ	GD 1	N370S	Fibroblastos	Aumento atividade GCase
$\alpha$ -1-C-Nonyl-DIX	GD 1	N370S	Fibroblastos	Aumento atividade GCase
sp2-amino açúcar	GD 1	F213I, N370S	Fibroblasts	Aumento atividade GCase
Isofagomine	GD 1	N370S	Fibroblastos	Aumento atividade GCase
NAdBT-AIJ + coQ	nGD	L444P	Rato	Restaurou disfunção mitocondrial e Raumentou atividade da Gcase
$\alpha$ -1-C-tridecyl-DAB	GD 1	N370S	Fibroblastos	Aumento atividade GCase
Ambroxol	GD 1	N370S, F213I	Fibroblastos e Linfoblastos	Aumentou atividade da Gcase e diminuiu níveis de GlcCer
<b>Chaperonas não inibitórias</b>				
NCGC758	GD 1 GD 2	N370S, L444P, c.84dupG, IVS2+1	Macrófago derivados de iPSCs	Aumentou atividade da Gcase e diminuiu níveis de GlcCer; Reduziu níveis de GlcCer; repuperou producao de ROS*** melhorando quimiotaxis
NCGC758	GD 1	N370S	Macrófago derivados de iPSCs	Induziu autofagia e reduziu secreção de IL-1 $\beta$
NCGC758	nGD	N370S, c.84dupG	Neurônios derivados de iPSCs	Aumento atividade GCase , Reduziu $\alpha$ -Syn
NCGC607	GD, GD com parkinsonism	N370S, c.84dupG, IVS2+1, L444P	Neurônios derivados de iPSCs	Aumento atividade GCase , Reduziu GlcCer e GlcSph e $\alpha$ -Syn
<b>Outros</b>				
LB-250	GD	N370S, L444P	Fibroblastos	Inibiu atividade da histona deacetilase, aumentou atividade da Gcase e de níveis proteicos
S-181	PD-GBA e PD-nao-GBA	c.84dupG, wildtype	Neurônios derivados de iPSCs	Aumentou atividade da Gcase e reduziu os níveis de GlcCer
S-181	GBA1 -PD	D409V	Rato	Reduziu os níveis de GlcCer e GlcSph no cerebro

**Tabela 2:** Traduzida e modificada de Han et al. (2020), mostrando as pequenas moléculas consideradas terapêuticas para a doença de Gaucher, o modelo animal no qual foram estudadas e seus efeitos. GCase Beta-glicuronidase, GlcCer glucosilceramida, GlcSph glucosilesfingosina.

De posse dessas informações, há de ser discutido como a informação do risco aumentado de DP em pacientes com DG deve ser comunicada, haja vista que, na maioria dos casos de DG, os pais do probando são heterozigotos para uma variante em *GBA* e que a DP é tão estigmatizada por não ter tratamento curativo.

O aconselhamento genético é o processo de oferecer a famílias e indivíduos informações sobre a natureza, o padrão de herança e implicações da desordem genética, com intuito de ajudá-los a tomar decisões pessoais e médicas com maior embasamento. O relato de incidência de DP e seus sintomas ocasionados pela variante do *GBA* podem ser fonte de grande preocupação para pacientes com DG e suas famílias. Avaliação clínica, histórico detalhado e evidência de sintomas

de DP ou dificuldades cognitivas devem ser investigados mais a fundo. Quando a patofisiologia por trás da doença for descoberta, e drogas neuroprotetoras se tornarem disponíveis, a identificação precoce desses fatores de risco se tornará importante. Em um estudo sobre aconselhamento genético com população de judeus Ashkenazi (potenciais heterozigotos para variantes do *GBA* devido a dados epidemiológicos), os participantes foram triados para variante do *GBA*. Dos 75 participantes, 86,7% acreditavam que os pacientes deveriam ser informados sobre o risco de DP antes do screening para portadores de variante do *GBA*. Destes, 93,3% também responderam que o conhecimento prévio do risco não teria afetado a decisão de ter feito o screening (MULHERN et al., 2018). Em um outro estudo, foi realizada uma pesquisa online em pacientes com DG. Os resultados do estudo revelaram que, de 125 indivíduos com doença de Gaucher, 80% sabiam previamente sobre a associação com a DP, 83,7% preferiam saber sobre o aumento do risco por um profissional de saúde e 71,0% queriam descobrir no momento diagnóstico da DG (ZARETSKY et al., 2020). Esses resultados sugerem que os profissionais de saúde devem aconselhar os pacientes com doença de Gaucher sobre o aumento do risco de doença de Parkinson, e devem fazê-lo no momento do diagnóstico.

O aconselhamento genético para DP em DG, porém, mostra-se complicado. Muitos pacientes com DG e portadores de variante do *GBA* nunca desenvolverão DP. Porém, acreditamos que desde as primeiras consultas os pacientes e familiares devem ser informados sobre o risco aumentado para que, a partir disso, tenham maior conhecimento sobre sua patologia. Nossas recomendações encontram-se resumidas na Figura 12.

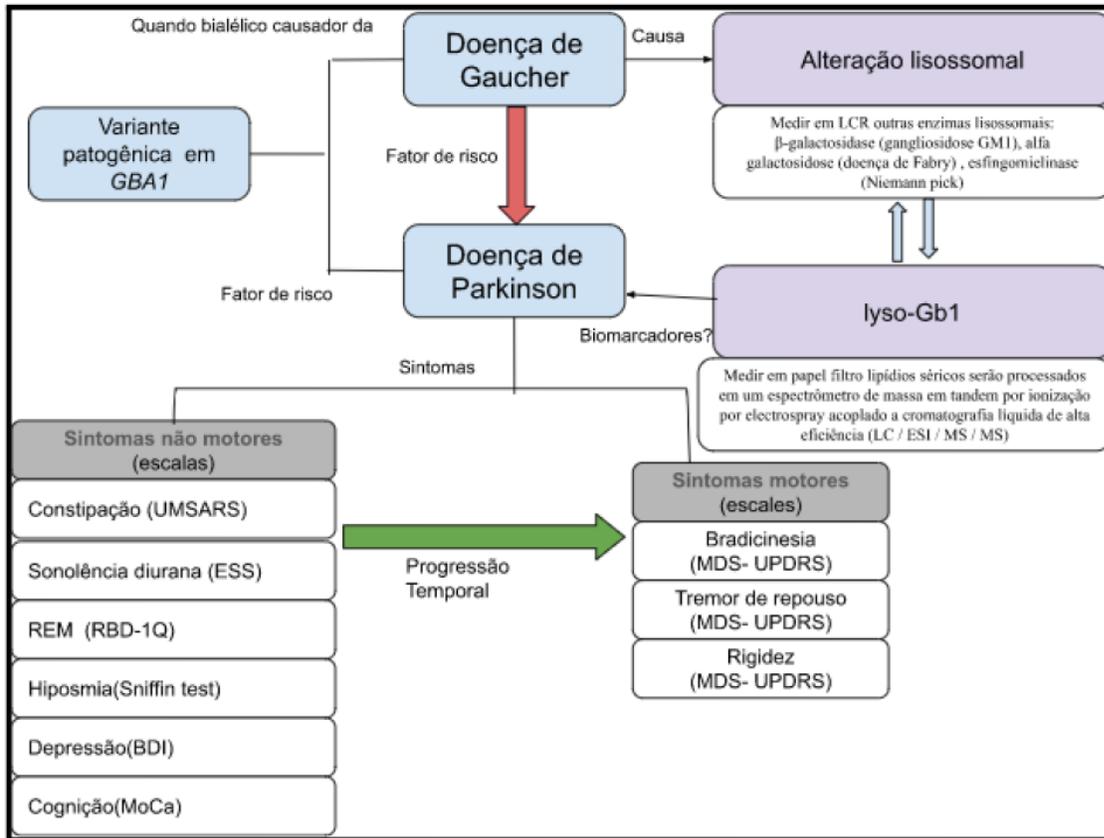
#### ACONSELHAMENTO GENÉTICO

*Antes da triagem para mutações do *GBA1* deixar claro os seguintes aspectos:*

- Na maioria dos casos de DG os pais do probando são heterozigotos;
- Os heterozigotos são assintomáticos e não estão em risco de desenvolverem a doença a DG;
- Portadores de mutação do *GBA1* possuem um risco aumentado de aproximadamente 20 vezes, em relação à população geral, de desenvolver DP.
- Alguns pacientes ou familiares nunca desenvolverão DP.
- Não há tratamento que previna a progressão da DP.
- A DP possui uma progressão sintomática de SNM que podem anteceder os sintomas clássicos de DP.

**Figura 12:** Resumo das informações sobre risco de doença de Parkinson (DP) em pacientes e familiares de pacientes com doença de Gaucher (DG).

### 3 MARCO CONCEITUAL



**Figura 13:** Marco conceitual do estudo. *BDI* Inventário de depressão de Beck, *Epworth* Escala de sonolência de Epworth, *UMSARS* Unified Multiple System Atrophy Rating Scale, *SST Sniffin' Sticks*, *MoCa* Montreal Cognitive Assessment Test, *MDS-UPDRS* Unified Parkinson's Disease Rating Scale. *lyso-Gb1* Glucosilefingosina.

#### 4 JUSTIFICATIVA

O risco relativo de doença de Parkinson seria de 5 e 9%-12%, respectivamente aos 60 e 80 anos em pacientes com doença de Gaucher. Esse risco foi semelhante ao encontrado em pacientes com DP portadores para apenas uma variante patogênica em *GBA* (E; AHV, 2021).

Tais sinais e sintomas podem estar presentes antes do desenvolvimento dos sintomas motores, com estudos sugerindo sensibilidade de 81,3% e especificidade de 67,9% no surgimento de DP em seguimento de 4 anos (FERESHTEHNEJAD et al., 2017). Não há ainda um único biomarcador para a fase pré-clínica da DP, sendo, atualmente, o uso de um grupo de marcadores a melhor escolha para aumentar a sensibilidade da avaliação.

Abordagens baseadas em sistemas como a lipidômica podem ser muito úteis para gerar novas hipóteses no que diz respeito ao mecanismo patogênico em doenças complexas. O presente estudo tem importância ao analisar vias lipídicas em pacientes com DG, auxiliando no entendimento de que outras vias lipídicas também poderiam estar associadas à DP.

Estudos de lipidômica têm mostrado alterações significativas nas principais subclasses de fosfolipídios e esfingolípido em pacientes com variantes em *GBA* (GUEDES et al., 2017). Não temos nenhum estudo com coorte brasileira com essa quantificação. A atividade da enzima lisossômica reflete os processos patológicos que ocorrem no cérebro, sugerindo a utilidade das atividades da enzima lisossômica no LCR como marcadores de diagnóstico de distúrbios neurodegenerativos. Pelo nosso conhecimento, poucos estudos avaliaram o potencial de atividades de enzimas lisossomais no LCR como potencial biomarcador de sinucleinopatias. A compreensão das alterações nos níveis lipídicos poderia elucidar novas vias envolvidas na patogênese da DP e da DG, bem como identificar potenciais biomarcadores para diagnóstico e monitoramento terapêutico.

## **5 OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivos gerais**

1. Avaliar a evolução de sinais e sintomas pré-motores da DP em pacientes com DG sem diagnóstico prévio de DP ou demência em seguimento clínico;
2. Identificar possíveis biomarcadores séricos e em LCR da DP em pacientes com DG.

### **5.2 Objetivos específicos**

5.2.1 Estimar a frequência de sinais e sintomas pré motores da DP em pacientes com DG.

5.2.2 Correlacionar sinais e sintomas pré-motores da DP com:

1. Exames laboratoriais de controle (hemoglobina, plaquetas e quitotriosidase);
2. Escores de gravidade da DG usados de rotina nas consultas como o Zimran (*Zimran Severity Score Index*) e o DS3 (*Disease Severity Score*);
3. Dados clínicos de tempo de tratamento, idade e idade ao diagnóstico.
4. Alteração em outras enzimas lisossômicas do LCR (hexosaminidase, beta-glicuronidase, alfa-manosidase);
5. Alteração do nível de Lyso-Gb1.

## **6 METODOLOGIA**

### **6.1 Tipo e local de estudo**

Trata-se de um estudo transversal, com avaliação clínica e coleta de exames laboratoriais, que será realizado no Centro de Pesquisa Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

### **6.2 Participantes**

O presente estudo foi composto por amostragem de conveniência, com indivíduos que estão em acompanhamento no Ambulatório de Erros Inatos do Metabolismo/Tratamento, pertencente ao Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Visto que a doença de Gaucher é uma doença rara e que não existem estudos prévios na literatura que possam servir de base para o cálculo amostral, estima-se o tamanho da amostra em aproximadamente 25 participantes.

Os participantes foram convidados a participar do estudo, obedecendo aos critérios de inclusão e exclusão. Após a explanação dos objetivos e procedimento da pesquisa, foi apresentado o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), que foi preenchido e assinado para que o indivíduo possa fazer parte do estudo (Anexo I). Caso o indivíduo não consentisse para sua participação nesta pesquisa, ele era retirado automaticamente do estudo, sem prejuízos.

### **6.3 Critérios de inclusão e exclusão**

Foram incluídos todos os indivíduos com diagnóstico de doença de Gaucher atendidos no ambulatório, que compareceram às avaliações, maiores de 18 anos e com o fenótipo de DG tipo 1. Foram excluídos aqueles indivíduos menores de 18 anos e que não apresentarem compreensão mínima para a realização dos testes. A avaliação de lyso-Gb1 foi realizada em todos os indivíduos com doença de Gaucher confirmada em seguimento, independente da idade.

## **6.4 Procedimentos**

Após consentir a participação na pesquisa, o paciente foi avaliado para os sintomas pré-motores da doença de Parkinson, conforme explicado abaixo. Também foi realizada a coleta de líquido e de sangue em papel filtro para avaliação de enzimas lisossomais e de esfingolípídeos, conforme explicitado abaixo.

### **6.4.1 Informações Clínicas**

Foram coletadas informações clínicas, como hábitos de vida, e dados sociodemográficos dos sujeitos participantes com objetivo de identificar possíveis fatores que pudessem estar associados às alterações encontradas nos exames laboratoriais. Essas informações foram preenchidas em uma ficha clínica pré-estabelecida (Anexo 2), sendo os dados coletados através do prontuário ou de entrevista semi-estruturada com o participante.

### **6.4.2 Avaliação dos sintomas não motores**

A cognição foi avaliada pela avaliação cognitiva de Montreal (*MoCa*), sonolência diurna pela Escala de Epworth, depressão pelo Inventário de Beck, constipação pela *Unified Multiple System Atrophy Rating Scale* e transtorno de comportamento do sono *REM* através da triagem de pergunta única. A hiposmia foi avaliada com *Sniffin' Sticks* e os sintomas motores foram avaliados com a parte III da Escala Unificada de Avaliação de Doença de Parkinson (Anexos 3-5).

### **6.4.3 Análise de lipídios em papel filtro:**

A partir de uma extração de plasma coletado em papel filtro, em avaliação ambulatorial, os lipídios séricos foram processados em um espectrômetro de massa em tandem por ionização por *electrospray* acoplado a cromatografia líquida de alta eficiência (LC / ESI / MS / MS) (API3000s, Sciex Inc., Thiexhill, Ontario, Canada), usando métodos semelhantes aos descritos anteriormente em Mielke et al. (2013). A área sob a curva fornecida no aparelho foi utilizada para quantificar cada esfingolípido (ceramida, mono-hexosyl ceramida e lactosilceramida), usando *MultiQuant* (AB Sciex). Foram, assim, examinados vários comprimentos de cadeia de carbono de

cada espécie de esfingolípido, em vez de uma soma de cada espécie total, a fim de determinar associações específicas de cadeia.

#### **6.4.4 Análise de enzimas lisossomais em LCR e em papel filtro e punção lombar**

As amostras foram coletadas em consulta ambulatorial do Centro de Pesquisa Clínica, por profissional treinado conforme protocolo da instituição. Após a coleta, as amostras de LCR foram mantidas a 4°C imediatamente após a punção lombar (LP), centrifugadas a 2000 × g por 10 minutos em temperatura ambiente, e armazenado a -80°C dentro de 1h da coleção. Foram analisadas 4 enzimas: alfa-manosidase, beta-glicuronidase, hexosaminidase A, B e Total. Também foram medidos os valores de quitotriosidase conforme protocolos previamente publicados.

### **6.6 Análise dos dados**

Os dados dos questionários foram comparados com dados prévios coletados na coorte de 2018 (WILKE et al., 2019). A significância estatística dos dados foi analisada por meio do programa SPSS versão 16.0. A distribuição normal das variáveis será testada por meio do teste Kolmogorov-Smirnov. As variáveis categóricas foram representadas com frequências e percentuais. As variáveis contínuas com distribuição normal foram sumarizadas por meio de média e desvio-padrão, e aquelas com distribuição assimétrica foram representadas por meio de mediana e quartis. A análise inferencial foi realizada por meio do teste Qui-quadrado ou Exato de Fisher (no caso de variáveis categóricas) e por meio do teste Correlação de Pearson ou Spearman (no caso de variáveis contínuas). Para todas as análises, foi considerado um intervalo de confiança de 95%, e valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

### **6.7 Aspectos éticos**

Após serem informados sobre a justificativa, os objetivos e os procedimentos da pesquisa, todos os participantes receberam o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Foi assegurado aos sujeitos que participarem da pesquisa o sigilo de sua identidade, bem como o direito de se retirar a qualquer momento, sem nenhum prejuízo. Foi assegurado, ainda, o esclarecimento de dúvidas por parte dos participantes, seja das questões de pesquisa, através do

contato com os pesquisadores, seja das questões éticas a qualquer momento.

Os dados colhidos foram utilizados exclusivamente para a elaboração de material científico e acadêmico (aulas, artigos, pôsteres para congressos, etc.) e serão mantidos sob a guarda fiel do pesquisador responsável por um prazo de 10 anos, depois do qual serão incinerados.

Os sujeitos não receberam qualquer auxílio financeiro para participar da pesquisa, bem como não arcaram com nenhum custo excedente. Sua participação também não acarretou riscos à sua saúde, sendo a coleta de sangue e de líquido cefalorraquidiano, feita por médicos treinados para os devidos fins. Os benefícios consistiram na realização de uma avaliação neurológica detalhada, que permitiu a identificação de alterações que podem corresponder ao início de um processo neurodegenerativo. Os sujeitos poderão ter acesso aos resultados de seus testes a qualquer momento, mediante solicitação.

## 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aharon-Peretz J, Rosenbaum H, Gershoni-Baruch R. **Mutations in the glucocerebrosidase gene and Parkinson's disease in Ashkenazi Jews.** *N Engl J Med.* 2004; 351:1972–1977. [PubMed: 15525722]
2. ALCALAY, R. N. et al. **Glucocerebrosidase activity in Parkinson's disease with and without GBA mutations.** *Brain*, v. 138, n. 9, p. 2648–2658, set. 2015.
3. ALCALAY, R. N. et al. SMPD1 mutations, activity and  $\alpha$ -synuclein accumulation in Parkinson's disease. **Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society**, v. 34, n. 4, p. 526, abr. 2019.
4. Anheim, M., Elbaz, A., Lesage, S., Durr, A., Condroyer, C., Viallet, F., et al. (2012). **Penetrance of parkinson disease in glucocerebrosidase gene mutation carriers.** *Neurology*, 78(6), 417-420. doi:10.1212/WNL.0b013e318245f476 [doi]
5. AVENALI, M. et al. Evolution of prodromal parkinsonian features in a cohort of GBA mutation-positive individuals: a 6-year longitudinal study. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 90, n. 10, p. 1091–1097, 1 out. 2019.
6. Bae, E. J., Yang, N. Y., Song, M., Lee, C. S., Lee, J. S., Jung, B. C., et al. (2014). Glucocerebrosidase depletion enhances cell-to-cell transmission of alpha-synuclein. *Nature Communications*, 5, 4755. doi:10.1038/ncomms5755 [doi]
7. BALDUCCI, C. et al. Lysosomal hydrolases in cerebrospinal fluid from subjects with Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 22, n. 10, p. 1481–1484, 2007a.
8. Balestrino, R., & Schapira, A. H. V. (2018). Glucocerebrosidase and parkinson disease: Molecular, clinical, and therapeutic implications. *The Neuroscientist : A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 24(5), 540-559. doi:10.1177/1073858417748875 [doi]
9. Barkhuizen, M., Anderson, D. G., & Grobler, A. F. (2016). Advances in GBA-associated parkinson's disease--pathology, presentation and therapies. *Neurochemistry International*, 93, 6-25.
10. Beavan, M., McNeill, A., Proukakis, C., Hughes, D. A., Mehta, A., & Schapira, A. H. (2015). Evolution of prodromal clinical markers of parkinson disease in a GBA mutation-positive cohort. *JAMA Neurology*, 72(2), 201-208
11. BEITZ, J. M. Parkinson's disease: a review. **Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)**, v. 6, n. 1, p. 65–74, 1 jan. 2014.
12. BOER, D. E. C. et al. Glucocerebrosidase: Functions in and Beyond the Lysosome. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 3, p. 736, mar. 2020.
13. BROCKMANN, K. et al. GBA-associated PD presents with nonmotor characteristics. **Neurology**, v. 77, n. 3, p. 276–280, 19 jul. 2011.
14. BROCKMANN, K.; BERG, D. The significance of GBA for Parkinson's disease. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 37, n. 4, p. 643–648, 2014.
15. Burrow, Thomas A, and Gregory A Grabowski. "Velaglucerase Alfa in the Treatment of Gaucher Disease Type 1." *Clinical investigation 1.2* (2011): 285–293. Print.
16. Bultron G, Kacena K, Pearson D, et al. The risk of Parkinson's disease in type 1 Gaucher disease. *J Inherit Metab Dis* 2010; 33(2):167e73.

17. Cavaco, S., Goncalves, A., Mendes, A., Vila-Cha, N., Moreira, I., Fernandes, J., et al. (2015). Abnormal olfaction in parkinson's disease is related to faster disease progression. *Behavioural Neurology*, 2015, 976589.
18. Chaves, R. G., Pereira Lda, V., de Araujo, F. T., Rozenberg, R., Carvalho, M. D., Coelho, J. C., et al. (2015). Consanguinity and founder effect for gaucher disease mutation G377S in a population from tabuleiro do norte, northeastern brazil. *Clinical Genetics*, 88(4), 391-395. doi:10.1111/cge.12515 [doi]
19. CHARKHAND, B. et al. Effect of Ambroxol chaperone therapy on Glucosylsphingosine (Lyso-Gb1) levels in two Canadian patients with type 3 Gaucher disease. **Molecular Genetics and Metabolism Reports**, v. 20, p. 100476, 1 set. 2019.
20. CHU, Y. et al. Alterations in lysosomal and proteasomal markers in Parkinson's disease: Relationship to alpha-synuclein inclusions. **Neurobiology of Disease**, v. 35, n. 3, p. 385-398, 1 set. 2009.
21. Cox, T. M., Rosenbloom, B. E., & Barker, R. A. (2015). Gaucher disease and comorbidities: B-cell malignancy and parkinsonism. *American Journal of Hematology*, 90 Suppl 1, S25-8.
22. COZMA, C. et al. Treatment Efficiency in Gaucher Patients Can Reliably Be Monitored by Quantification of Lyso-Gb1 Concentrations in Dried Blood Spots. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 13, p. 4577, jan. 2020.
23. C.Schulte, I. Liepelt-Scarfone, C.E Hagen, A.K Hauser, K. Brockmann, et al. (2016). Coding and non-coding glucocerebrosidase variants have an impact on cognitive decline in Parkinson's disease [abstract]. *Mov Disord.* 2016; 31 (suppl 2).
24. Delenclos, M., Jones, D. R., McLean, P. J., & Uitti, R. J. (2016). Biomarkers in parkinson's disease: Advances and strategies. *Parkinsonism & Related Disorders*, 22 Suppl 1, S106-10. doi:10.1016/j.parkreldis.2015.09.048 [doi]
25. DI PASQUALE, E. et al. Altered Ion Channel Formation by the Parkinson's-Disease-Linked E46K Mutant of  $\alpha$ -Synuclein Is Corrected by GM3 but Not by GM1 Gangliosides. **Journal of Molecular Biology**, v. 397, n. 1, p. 202-218, 19 mar. 2010.
26. Du, S., Ou, H., Cui, R., Jiang, N., Zhang, M., Li, X., et al. (2018). Delivery of glucosylceramidase beta gene using AAV9 vector therapy as a treatment strategy in mouse models of gaucher disease. *Human Gene Therapy*, doi:10.1089/hum.2018.072 [doi]
27. Elstein D, Altarescu G, Maayan H, et al. Booster-effect with velaglucerase alfa in patients with Gaucher disease switched from long-term imiglucerase therapy: early Access Program results from Jerusalem. *Blood Cells Mol Dis.* 2012;48(1):45-50. doi: 10.1016/j.bcmd.2011.09.009.
28. Elstein, D., Alcalay, R., & Zimran, A. (2015). The emergence of parkinson disease among patients with gaucher disease. *Best Practice & Research.Clinical Endocrinology & Metabolism*, 29(2), 249-259. doi:10.1016/j.beem.2014.08.007 [doi]
29. E, M.; AHV, S. Exploring the Genotype-Phenotype Correlation in GBA-Parkinson Disease: Clinical Aspects, Biomarkers, and Potential Modifiers. **Frontiers in neurology**, v. 12, 24 jun. 2021.
30. E. S. Faganaand. L. Pihlstrøm Genetic risk factors for cognitive decline in Parkinson's disease:a review of the literature. *Eur J Neurol.* 2017 Apr;24(4):561-e20. doi: 10.1111

31. Farlow J, Pankratz ND, Wojcieszek J, et al. Parkinson Disease Overview. 2004 May 25 [Updated 2014 Feb 27]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2018. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1223/>
32. Fereshtehnejad, S. M., Montplaisir, J. Y., Pelletier, A., Gagnon, J. F., Berg, D., & Postuma, R. B. (2017). Validation of the MDS research criteria for prodromal parkinson's disease: Longitudinal assessment in a REM sleep behavior disorder (RBD) cohort. *Movement Disorders : Official Journal of the Movement Disorder Society*, 32(6), 865-873.
33. Futerman, Anthony and Ari Zimran. Livro - Gaucher disease [DNLM: 1. Gaucher Disease. WD 205.5.L5 G265 2006]
34. Gatto, E. M., Etcheverry, J. L., Sanguinetti, A., Cesarini, M., Fernandez Escobar, N., & Drelichman, G. (2016). Prodromal clinical markers of parkinson disease in gaucher disease individuals. *European Neurology*, 76(1-2), 19-21. doi:10.1159/000447510 [doi]
35. GIRALDO, P.; FRUTOS, L. L. DE; CEBOLLA, J. J. Biomarker combination is necessary for the assessment of Gaucher disease? **Annals of Translational Medicine**, v. 0, n. 0, p. 81–81, nov. 2018.
36. Godoy, M. D., Voegels, R. L., Pinna Fde, R., Imamura, R., & Farfel, J. M. (2015). Olfaction in neurologic and neurodegenerative diseases: A literature review. *International Archives of Otorhinolaryngology*, 19(2), 176-179.
37. GEGG, M. E. et al. Glucocerebrosidase deficiency in substantia nigra of parkinson disease brains. **Annals of Neurology**, v. 72, n. 3, p. 455–463, set. 2012.
38. HAN, T.-U.; SAM, R.; SIDRANSKY, E. Small Molecule Chaperones for the Treatment of Gaucher Disease and GBA1-Associated Parkinson Disease. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, p. 271, 19 maio 2020.
39. HUEBECKER, M. et al. Reduced sphingolipid hydrolase activities, substrate accumulation and ganglioside decline in Parkinson's disease. **Molecular Neurodegeneration**, v. 14, n. 1, p. 40, 8 nov. 2019.
40. HUH, Y. E. et al.  $\beta$ -Glucocerebrosidase activity in GBA-linked Parkinson disease. **Neurology**, v. 95, n. 6, p. e685–e696, 11 ago. 2020.
41. HUH, Y. E. et al. Glucosylceramide in cerebrospinal fluid of patients with GBA-associated and idiopathic Parkinson's disease enrolled in PPMI. **npj Parkinson's Disease**, v. 7, n. 1, p. 1–7, 22 nov. 2021.
42. HURVITZ, N. et al. Glucosylsphingosine (lyso-Gb1) as a Biomarker for Monitoring Treated and Untreated Children with Gaucher Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 12, p. 3033, jan. 2019.
43. IVANOVA, M. Altered Sphingolipids Metabolism Damaged Mitochondrial Functions: Lessons Learned From Gaucher and Fabry Diseases. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 4, p. 1116, abr. 2020.
44. I. Trezzi, E. Monfrini, G. Buongarzone, E. Cassinerio, I. Motta, F. Nascimbeni, F. Carubbi et al. Parkinsonian Features in a Cohort of Gaucher Disease (GD) Patients and Relatives [abstract]. *Mov. Disord.* 2017; 32 (suppl 2).
45. JO, E. et al.  $\alpha$ -Synuclein Membrane Interactions and Lipid Specificity\*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 44, p. 34328–34334, 3 nov. 2000.
46. L, N. et al. Gaucher disease epidemiology and natural history: a comprehensive review of the literature. **Hematology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 22, n. 2, mar. 2017.

47. Kaushik, Susmita, and Ana Maria Cuervo. “Chaperone-Mediated Autophagy: A Unique Way to Enter the Lysosome World.” *Trends in cell biology* 22.8 (2012): 407–417. PMC. Web. 19 Oct. 2018.
48. Karimi-Moghadam, A., Charsouei, S., Bell, B., & Jabalameli, M. R. (2018). Parkinson disease from mendelian forms to genetic susceptibility: New molecular insights into the neurodegeneration process. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 38(6), 1153-1178. doi:10.1007/s10571-018-0587-4 [doi]
49. KIM, E. N. et al. Identification of a novel therapeutic target underlying atypical manifestation of Gaucher disease. **Clinical and Translational Medicine**, v. 12, n. 5, p. e862, 2022.
50. Leidenheimer, N. J. (2018). Pharmacological chaperones: Beyond conformational disorders. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 245, 135-153. doi:10.1007/164\_2017\_68 [doi]
51. Lopez, G., Kim, J., Wiggs, E., Cintron, D., Groden, C., Tayebi, N., et al. (2016). Clinical course and prognosis in patients with gaucher disease and parkinsonism. *Neurology.Genetics*, 2(2), e57. doi:10.1212/NXG.000000000000057 [doi]
52. LU, J. et al. Decreased glucocerebrosidase activity in Gaucher disease parallels quantitative enzyme loss due to abnormal interaction with TCP1 and c-Cbl. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 50, p. 21665–21670, 14 dez. 2010.
53. LUKAS, J. et al. Glucosylsphingosine Causes Hematological and Visceral Changes in Mice—Evidence for a Pathophysiological Role in Gaucher Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 10, p. 2192, out. 2017.
54. Lwin A, Orvisky E, Goker-Alpan O, LaMarca ME, Sidransky E. Glucocerebrosidase mutations in subjects with parkinsonism. *Mol Genet Metab*. 2004; 81:70–73. [PubMed: 14728994]
55. MALM, D.; NILSSEN, Ø. Alpha-Mannosidosis. Em: ADAM, M. P. et al. (Eds.). **GeneReviews®**. Seattle (WA): University of Washington, Seattle, 1993.
56. McNeill, A., Duran, R., Proukakis, C., Bras, J., Hughes, D., Mehta, A., et al. (2012). Hyposmia and cognitive impairment in gaucher disease patients and carriers. *Movement Disorders : Official Journal of the Movement Disorder Society*, 27(4), 526-532.
57. McNeill, A., Roberti, G., Lascaratos, G., Hughes, D., Mehta, A., Garway-Heath, D. F., et al. (2013). Retinal thinning in gaucher disease patients and carriers: Results of a pilot study. *Molecular Genetics and Metabolism*, 109(2), 221-223.
58. Migdalska-Richards, A., & Schapira, A. H. (2016). The relationship between glucocerebrosidase mutations and parkinson disease. *Journal of Neurochemistry*, 139 Suppl 1, 77-90.
59. MENOZZI, E.; SCHAPIRA, A. H. V. Exploring the Genotype-Phenotype Correlation in GBA-Parkinson Disease: Clinical Aspects, Biomarkers, and Potential Modifiers. **Frontiers in Neurology**, v. 12, p. 694764, 2021.
60. MOORS, T. E. et al. Characterization of Brain Lysosomal Activities in GBA-Related and Sporadic Parkinson’s Disease and Dementia with Lewy Bodies. **Molecular Neurobiology**, v. 56, n. 2, p. 1344–1355, 1 fev. 2019.
61. MOTTA, M. et al. Clinical, biochemical and molecular characterization of prosaposin deficiency. **Clinical Genetics**, v. 90, n. 3, p. 220–229, 2016.
62. Mulhern, M., Bier, L., Alcalay, R. N., & Balwani, M. (2018). Patients' opinions on genetic counseling on the increased risk of parkinson disease among gaucher disease

- carriers. *Journal of Genetic Counseling*, 27(3), 675-680. doi:10.1007/s10897-017-0161-0 [doi]
63. MURUGESAN, V. et al. Glucosylsphingosine is a key biomarker of Gaucher disease. **American Journal of Hematology**, v. 91, n. 11, p. 1082–1089, 2016.
  64. NAVARRO-ROMERO, A.; MONTPEYÓ, M.; MARTINEZ-VICENTE, M. The Emerging Role of the Lysosome in Parkinson's Disease. **Cells**, v. 9, n. 11, p. 2399, 2 nov. 2020.
  65. NAIR, S. et al. Clonal Immunoglobulin against Lysolipids in the Origin of Myeloma. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 6, p. 555–561, 11 fev. 2016.
  66. Narita, A., Shirai, K., Itamura, S., Matsuda, A., Ishihara, A., Matsushita, K., et al. (2016). Ambroxol chaperone therapy for neuronopathic gaucher disease: A pilot study. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 3(3), 200-215. doi:10.1002/acn3.292
  67. NGUYEN, Y. et al. Immunoglobulin Abnormalities in Gaucher Disease: an Analysis of 278 Patients Included in the French Gaucher Disease Registry. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 4, p. 1247, jan. 2020.
  68. Noyce AJ, Lees AJ, Schrag A The prediagnostic phase of Parkinson's disease *J Neurol Neurosurg Psychiatry* Published Online First: 11 January 2016. doi: 10.1136/jnnp-2015-311890
  69. PARNETTI, L. et al. Cerebrospinal Fluid Lysosomal Enzymes and Alpha-Synuclein in Parkinson's Disease. **Movement Disorders**, v. 29, n. 8, p. 1019–1027, jul. 2014.
  70. Pastores GM, Hughes DA. Gaucher Disease. 2000 Jul 27 [Updated 2018 Jun 21]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2018.
  71. Pitcairn, C., Wani, W. Y., & Mazzulli, J. R. (2018). Dysregulation of the autophagic-lysosomal pathway in gaucher and parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, doi:S0969-9961(18)30074-3
  72. POEWE, W. Non-motor symptoms in Parkinson's disease. **European Journal of Neurology**, v. 15, n. s1, p. 14–20, 2008.
  73. Puschmann, A., Bhidayasiri, R., & Weiner, W. J. (2012). Synucleinopathies from bench to bedside. *Parkinsonism & Related Disorders*, 18 Suppl 1, S24-7. doi:10.1016/S1353-8020(11)70010-4 [doi]
  74. REVEL-VILK, S.; FULLER, M.; ZIMRAN, A. Value of Glucosylsphingosine (Lyso-Gb1) as a Biomarker in Gaucher Disease: A Systematic Literature Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 19, p. 7159, jan. 2020.
  75. Richard A. Harvey, Denise R Ferrier. *Bioquímica Ilustrada* (2015). Artmed Editora.
  76. REGIER, D. S.; TIFFT, C. J.; ROTHERMEL, C. E. GLB1-Related Disorders. Em: ADAM, M. P. et al. (Eds.). **GeneReviews®**. Seattle (WA): University of Washington, Seattle, 1993.
  77. ROCHA, E. M. et al. Sustained Systemic Glucocerebrosidase Inhibition Induces Brain  $\alpha$ -Synuclein Aggregation, Microglia and Complement C1q Activation in Mice. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 23, n. 6, p. 550–564, 20 ago. 2015.
  78. ROLFS, A. et al. Glucosylsphingosine Is a Highly Sensitive and Specific Biomarker for Primary Diagnostic and Follow-Up Monitoring in Gaucher Disease in a Non-Jewish, Caucasian Cohort of Gaucher Disease Patients. **PLOS ONE**, v. 8, n. 11, p. e79732, 20 nov. 2013.

79. Ronald B. Postuma, Isabelle Arnulf, Birgit Hogl, Alex Iranzo, Tomoyuki Miyamoto, et al. (2012). A Single-Question Screen for Rapid Eye Movement Sleep Behavior Disorder: A Multicenter Validation Study. *Mov Disord.* 2012 Jun; 27(7): 913–916.
80. Sauerbier, A., Qamar, M. A., Rajah, T., & Chaudhuri, K. R. (2016). New concepts in the pathogenesis and presentation of parkinson's disease. *Clinical Medicine (London, England)*, 16(4), 365-370. doi:10.7861/clinmedicine.16-4-365 [doi]
81. Schapira, A. H. (2015). Glucocerebrosidase and parkinson disease: Recent advances. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 66(Pt A), 37-42. doi:10.1016/j.mcn.2015.03.013 [doi]
82. Sardi, S. P., Cheng, S. H., & Shihabuddin, L. S. (2015). Gaucher-related synucleinopathies: The examination of sporadic neurodegeneration from a rare (disease) angle. *Progress in Neurobiology*, 125, 47-62.
83. Sidransky, E. (2004). *Gaucher disease: Complexity in a "simple" disorder* doi:https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2004.08.015
84. Sidransky, E., & Lopez, G. (2012). The link between the GBA gene and parkinsonism. *The Lancet.Neurology*, 11(11), 986-998.
85. Standaert DG1, Geldmacher DS1. Glucocerebrosidase, Parkinson disease, and the "senses and intellect". *Ann Neurol.* 2016 Nov;80(5):660-661. doi: 10.1002/ana.24808.
86. Stirnemann, J., Belmatoug, N., Camou, F., Serratrice, C., Froissart, R., Caillaud, C., et al. (2017). A review of gaucher disease pathophysiology, clinical presentation and treatments. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2), 10.3390/ijms18020441.
87. STILES, A. R. et al. The role of glucosylsphingosine as an early indicator of disease progression in early symptomatic type 1 Gaucher disease. **Molecular Genetics and Metabolism Reports**, v. 27, p. 100729, 8 fev. 2021.
88. STOJKOVSKA, I. et al. Rescue of  $\alpha$ -synuclein aggregation in Parkinson's patient neurons by synergistic enhancement of ER proteostasis and protein trafficking. **Neuron**, v. 110, n. 3, p. 436- 451.e11, 2 fev. 2022.
89. Strimbu K, Tavel JA. What are Biomarkers? *Current opinion in HIV and AIDS.* 2010;5(6):463-466. doi:10.1097/COH.0b013e32833ed177.
90. SUZUKI, K. et al. Neuronal accumulation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -synucleins in the brain of a GM2 gangliosidosis mouse model. **NeuroReport**, v. 14, n. 4, p. 551–554, 24 mar. 2003.
91. Swallow, D. M., Lawton, M. A., Grosset, K. A., Malek, N., Smith, C. R., Bajaj, N. P., et al. (2016). Variation in recent onset parkinson's disease: Implications for prodromal detection. *Journal of Parkinson's Disease*, 6(2), 289-300.
92. Tamargo, R. J., Velayati, A., Goldin, E., & Sidransky, E. (2012). The role of saposin C in gaucher disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, 106(3), 257-263. doi:10.1016/j.ymgme.2012.04.024 [doi]
93. TAGUCHI, Y. V. et al. Glucosylsphingosine Promotes  $\alpha$ -Synuclein Pathology in Mutant GBA-Associated Parkinson's Disease. **The Journal of Neuroscience**, v. 37, n. 40, p. 9617–9631, 4 out. 2017a.
94. TAGUCHI, Y. V. et al. Glucosylsphingosine Promotes  $\alpha$ -Synuclein Pathology in Mutant GBA-Associated Parkinson's Disease. **The Journal of Neuroscience**, v. 37, n. 40, p. 9617–9631, 4 out. 2017b.

95. THALER, A. et al. Parkinson's disease phenotype is influenced by the severity of the mutations in the GBA gene. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 55, p. 45–49, 1 out. 2018.
96. TOKUDA, T. et al. Detection of elevated levels of  $\alpha$ -synuclein oligomers in CSF from patients with Parkinson disease. **Neurology**, v. 75, n. 20, p. 1766–1772, 16 nov. 2010.
97. Tommaso Beccari et al. (2011) Role of Lysosomal Enzymes in Parkinson's Disease: Lessons from Gaucher Disease. Chapter of the book: Etiology and Pathophysiology of Parkinson's Disease.
98. TORO, C.; SHIRVAN, L.; TIFFT, C. HEXA Disorders. Em: ADAM, M. P. et al. (Eds.). **GeneReviews®**. Seattle (WA): University of Washington, Seattle, 1993.
99. Vairo F, Netto C, Dorneles A, et al. Enzyme Replacement Therapy in a Patient with Gaucher Disease Type III: A Paradigmatic Case Showing Severe Adverse Reactions Started a Long Time After the Beginning of Treatment. **JMD Reports**. 2013;11:1-6. doi:10.1007/8904\_2013\_214.
100. Vairo, F., Sperb-Ludwig, F., Wilke, M., Michellin-Tirelli, K., Netto, C., Neto, E. C., et al. (2015). Brain-derived neurotrophic factor expression increases after enzyme replacement therapy in gaucher disease. **Journal of Neuroimmunology**, 278, 190-193. doi:10.1016/j.jneuroim.2014.11.005 [doi]
101. VAN DIJK, K. D. et al. Changes in endolysosomal enzyme activities in cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 28, n. 6, p. 747–754, 2013.
102. VIEIRA, S. R. L.; SCHAPIRA, A. H. V. Glucocerebrosidase mutations: A paradigm for neurodegeneration pathways. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 175, p. 42–55, 1 nov. 2021.
103. WANG, Y. et al. Phosphorylated  $\alpha$ -synuclein in Parkinson's disease. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 121, p. 121ra20, 15 fev. 2012.
104. WEAVER Velaglucerase alfa in the treatment of Gaucher disease type 1: an update K Nicole Weaver<sup>1</sup>, Gregory A Grabowski<sup>1</sup> & Thomas A Burrow\*,<sup>1</sup> <sup>1</sup> Cincinnati Children's Hospital Medical
105. WEINREB NJ, Barranger JA, Charrow J, Grabowski GA, Mankin HJ, Mistry P. Guidance on the use of miglustat for treating patients with type 1 Gaucher disease. **Am J Hematol**. 2005 Nov;80(3):223-9. doi: 10.1002/ajh.20504. PMID: 16247743.
106. WILKE, M. V. M. B. et al. Evaluation of the frequency of non-motor symptoms of Parkinson's disease in adult patients with Gaucher disease type 1. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 14, p. 103, 10 maio 2019.
107. XIAO, C.; TIFFT, C.; TORO, C. Sandhoff Disease. Em: ADAM, M. P. et al. (Eds.). **GeneReviews®**. Seattle (WA): University of Washington, Seattle, 1993.
108. YU, Q.-J. et al. Parkinson disease with constipation: clinical features and relevant factors. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 567, 12 jan. 2018
109. ZARETSKY, L. et al. Knowledge and attitudes of Parkinson's disease risk in the Gaucher population. **Journal of Genetic Counseling**, v. 29, n. 1, p. 105–111, 2020.
110. ZIMRAN, A.; ELSTEIN, D. Lipid storage diseases. **Williams Hematology**, p. 1065–1071, 1 jan. 2010.
111. Zimran, A., Altarescu, G., & Elstein, D. (2013). Pilot study using ambroxol as a pharmacological chaperone in type 1 gaucher disease. **Blood Cells, Molecules & Diseases**, 50(2), 134-137. doi:10.1016/j.bcmd.2012.09.006 [doi]

112. Zimran A, Elstein D (2016) , Gaucher disease and related lysosomal storage diseases In: Kaushansky K, editor; , Lichtman M, editor; , Prchal J, editor. , et al., eds. Williams Hematology. 9th ed New York, NY: McGraw-Hill; 2016
113. ZIMRAN, A.; RUCHLEMER, R.; REVEL-VILK, S. A patient with Gaucher disease and plasma cell dyscrasia: bidirectional impact. **Hematology**, v. 2020, n. 1, p. 389–394, 4 dez. 2020.
114. ZUNKE F., MOISE A, Nandkishore R. Belur, et al. Reversible Conformational Conversion of  $\alpha$ -Synuclein into Toxic Assemblies by Glucosylceramide. *Neuron*. 2018 Jan 3; 97(1): 92–107.e10. Published online 2017 Dec 28. doi: 10.1016/j.neuron.2017.12.012

## 10 CONCLUSÕES

As conclusões da presente tese serão apresentadas abaixo de acordo com os objetivos específicos.

### OBJETIVOS GERAIS:

#### 1) Avaliar a evolução de sinais e sintomas pré motores da DP em pacientes com DG sem diagnóstico prévio de DP ou demência em seguimento clínico.

Conclusões: Hiposmia mostrou-se o sinal prodromico que melhor predizeu o diagnóstico de DP em nossa coorte. Não houve diferença entre os demais SNM o que pode ter ocorrido por uma menor idade media da nossa coorte em relação a demais coortes descritos. Também possuímos como hipótese a influência da pandemia de SARS-Cov-2 no seguimento, haja visto muitos pacientes tendo modificado seus hábitos de trabalho e tratamento. Na amostra inteira, foi realizado um teste de *Wilcoxon signed-rank* de amostra pareadas às variáveis em *MoCA*, Beck, Epworth (ESS), *UMSARS*, *REM*, *Sniffin'* e Número, calculando o tamanho de efeito correlação Rank-Biserial e seu respectivo intervalo de confiança de 95%. Dezenove pacientes completaram o acompanhamento (idade média da amostra foi de 44 anos (variação 26–71), O único NMS na coorte que mostrou uma diferença significativa da linha de base foi a ESS, que diminuiu após 3 anos (média=9,68 DP=4,5 na linha de base e média=7,36 DP=5,0 no acompanhamento). A ESS também foi o NMS mais frequente encontrado em nossa coorte, tanto na linha de base quanto no acompanhamento.

Uma paciente apresentou o maior número de SNM sendo também a única paciente a apresentar hiposmia (SST=4) na linha de base aos 62 anos. Para descartar outras causas de parkinsonismo foi feito um painel genético para genes relacionados à DP e parkinsonismo mostrando, além das variantes *GBA*, uma VUS em *VPS13C* que não foi considerada relevante para o caso. A paciente vem apresentando boa resposta ao tratamento com levodopa. Nenhum outro paciente da coorte apresentou sinais de parkinsonismo.

## **2) Identificar possíveis biomarcadores séricos e em LCR da DP em pacientes com DG.**

Cinco pacientes (P4, P7, P8, P11, P14) tiveram seu LCR analisado para biomarcadores lisossômicos (idade média da amostra foi de 40 anos, intervalo 30-53) e seis pacientes com LDM foram usados como controles. Em relação aos biomarcadores do LCR, foi encontrada diferença significativa entre os grupos na análise de Beta-glicuronidase e Hexosaminidase total. Os níveis de ChT foram aumentados no grupo MLD (média=142,8 ng/mL/h, SD=101,2 - Intervalo de referência (plasma) 8,8-132 nmol/h/mL sem intervalo de referência disponível no LCR), em comparação com o grupo GD (média=62 ng/mL/h, SD=43). A beta-hexosaminidase B foi aumentada no grupo GD (média=43,4, SD=41 nmol/h/mL; intervalo de referência (plasma) 1000-2857 nmol/h/mL sem intervalo de referência disponível no LCR), em comparação com o MLD grupo (média=20,7, SD=8,7 nmol/h/mL).

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

#### **1. Estimar a frequência de sinais e sintomas pré-motores da DP em pacientes com DG.**

No seguimento, oito pacientes apresentavam pelo menos dois SNM (idade média=52 anos), dos quais dois tiveram aumento no número total de SNM (P9, P18), três tiveram diminuição (P4, P17, P19) e dois permaneceram com o mesmo número de SNM (P10, P15). As informações demográficas e clínicas completas podem ser encontradas na Tabela 2 do ARTIGO 2, assim como o código supramencionado para cada paciente.

#### **2. Correlacionar sinais e sintomas pré-motores da DP com:**

- a. Exames laboratoriais de controle (hemoglobina, plaquetas e quitotriosidase);**
- b. Escores de gravidade da DG usados de rotina nas consultas como o Zimran (Zimran Severity Score Index) e o DS3 (Disease Severity Score);**
- c. Dados clínicos de tempo de tratamento, idade e idade ao diagnóstico.**

Haja vista não ter havido diferença significativa entre os SNM avaliados a partir da *baseline*, não foi feita correlação entre os SNM e demais parâmetros laboratoriais. Tal

avaliação fez parte da linha de base (WILKE et al., 2019) na qual também não foi encontrada nenhuma correlação.

### **3. Alteração em outras enzimas lisossômicas do LCR (Hexosaminidase, beta-glicuronidase, alfa-manosidase).**

Item discutido anteriormente na seção “*Identificar possíveis biomarcadores séricos e em LCR da DP em pacientes com DG*”.

### **4. Alteração do nível de lyso-Gb1.**

Conclusões, os níveis de lyso-Gb1 apresentaram uma correlação com os níveis séricos de IgG o que poderia representar o uso desse biomarcador também para o monitoramento do risco de MGUS e Mieloma Múltiplo nesses pacientes. Os níveis de lyso-Gb1 foram medidos não somente em pacientes com DG1, como também em pacientes com DG3, DG2 e DG2/3, tratados e não tratados conforme descrito no ARTIGO 2. Trinta e dois pacientes tratados (vinte e nove DG1 e três DG3, todos em TRE, exceto um tipo DG em TRS com eliglustate) e três pacientes não tratados (um DG1, um DG3 e um paciente com tipo de DG não identificado) foram incluídos, com idade média de 38 anos, variando de 7 meses a 71 anos. No grupo de pacientes tratados, os níveis de lyso-Gb1 foram significativamente mais baixos em pacientes tratados em comparação com pacientes não tratados ( $p=0,002$ ). No grupo tratado, os níveis de lyso-Gb1 foram em média 193 nmol/L (variando de 23 a 536) para o grupo DG1 sendo significativamente menor ( $p<0,001$ ) do que o grupo tratado DG3 (média 783 nmol/L/ variando de 509 a 1218). Ao analisar apenas o grupo DG1 tratado, foi encontrada uma correlação significativa entre lyso-Gb1 e idade ( $\rho=-0,447$ ,  $p=0,001$ ), quitotriosidase e níveis de IgG ( $p<0,001$  e  $p=0,03$ , respectivamente). Para o mesmo grupo, não foram encontradas diferenças significativas entre os valores de lyso-Gb1 e escores de gravidade, níveis de hb e anos de tratamento, conforme mostrado no *heatmap* da Figura 2 do ARTIGO 2. No grupo tratado com DG3, essas correlações não foram encontradas.

## 11 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo mostra-se importante ao aliar novas descobertas em pesquisa de fatores de risco para doenças neurodegenerativas a um contexto de assistência ambulatorial para pacientes.

Os pacientes com DG e seus familiares, pela variante em *GBA*, possuem um fator de risco para DP já estabelecido. A avaliação ambulatorial dos SNM de DP, assim como da escala motora, mostrou-se de fácil uso no presente estudo, podendo facilmente ser transposto para uma avaliação de rotina.

Notou-se também que, muitas vezes, em consultas ambulatoriais, não é indagado ao paciente as informações sobre seu sono, sua percepção de cheiros e sua sonolência. Essas perguntas podem direcionar a investigação de SNM já estabelecidos na literatura como tendo correlação com o início de doenças neurodegenerativas.

## **12 PERSPECTIVAS FUTURAS**

Estudos sobre o seguimento de pacientes com DG com alterações nos escores de SNM já foram realizados, demonstrando um início mais precoce da DP nesse tipo de coorte (BEAVAN et al., 2015). Cabe a aliança entre pesquisa e assistência possibilitar a descoberta de novas abordagens terapêuticas que possam atuar principalmente nesses pacientes de maior risco.

Estudos futuros podem ser realizados tanto para avaliar a progressão dos SNM quanto para documentar o aparecimento de doenças neurodegenerativas no futuro dessa coorte, podendo ambos ser correlacionados com os dados já coletados transversalmente no presente estudo. Sugere-se adquirir medidas de LCR tanto de pacientes com DG assintomáticos quanto de pacientes com DP-DG para avaliar alterações de biomarcadores entre os grupos que possam representar um processo de alteração do ambiente lisossomal do LCR desses pacientes.

Outro ponto importante que representa um ponto negativo do estudo é o tamanho amostral. Colaboração com outros centros de referência de doenças raras do país pode permitir a avaliação de mais pacientes com DG, tornando mais robustos os achados apresentados do presente estudo.

## 13 ANEXOS E APÊNDICES

### 13.1 PÔSTERES E PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS

#### **IWGGD 2022 Lyso-Gb1 levels in a cohort of Gaucher Disease patients**

Dear Matheus Wilke,

We are pleased to confirm that the following abstract has been accepted to the **IWGGD** 2022 as a poster:

00062

Lyso-Gb1 levels in a cohort of Gaucher Disease patients

Those who will be selected for an oral poster will be receiving notification starting next week.

Instructions with poster format guidelines and logistics information will be sent to you next week (for print and digital).

As the early bird rate registration deadline is fast approaching (April 8th), if you haven't already done so, we invite you to confirm your acceptance to present your research by registering for **IWGGD** 2022 using the link below ASAP.

<https://www.iwggdsymposium.com/registration2022-1>

If you are not registered by April 15th we will assume that you will not attend to present your work and your details will be removed from the programme. If you have already registered to attend, then no need to register again.

We look forward to welcoming you in Leiden soon!

Best regards,

# Lyso-Gb1 levels in a cohort of Gaucher Disease patients

Matheus WILKE<sup>1,2\*</sup>, Fabiano POSWAR<sup>1</sup>, Francynne KUBASKI<sup>3,4</sup>, Gabrielle IOP<sup>3</sup>, Larissa FAQUETI<sup>3</sup>, Roberto GIUGLIANI<sup>1,3,4,5</sup>, Ida SCHWARTZ<sup>1,5,6</sup>



<sup>1</sup> - Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil <sup>2</sup>- Postgraduate Program in Medical Sciences, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil  
<sup>3</sup> - BIODISCOVERY Laboratory, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil. <sup>4</sup> - Postgraduate Program in Genetics and Molecular Biology, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil,  
<sup>5</sup> - Department of Genetics, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil, <sup>6</sup> - BRAIN Laboratory, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

## Introduction

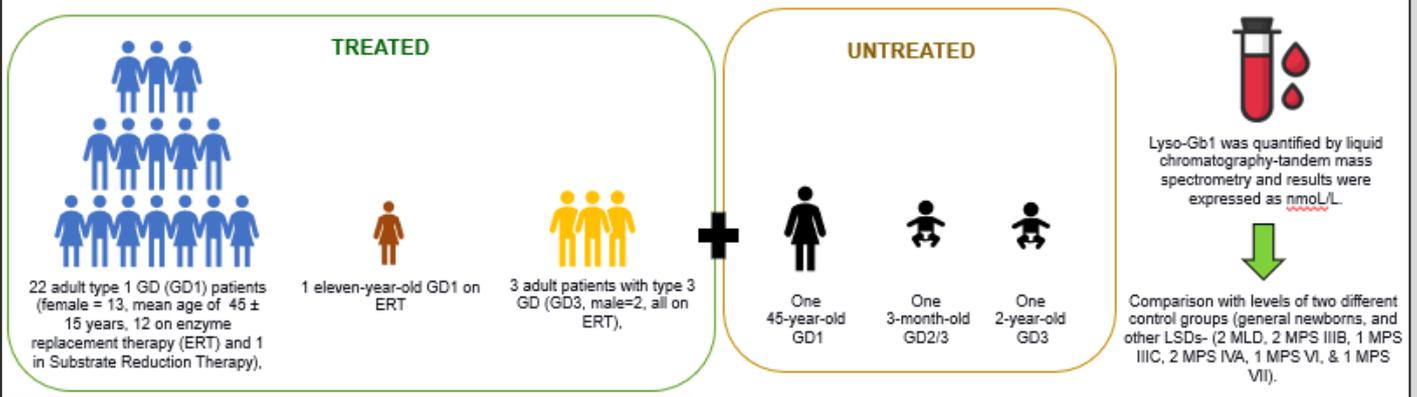
Gaucher Disease (GD) is one of the most common lysosomal storage disorders (LSD) caused by deficient activity of GBA-coded lysosomal glucocerebrosidase. The malfunction of this enzyme leads to the accumulation within lysosomes of its substrate, glucosylceramide (GluCer), whose accumulation within macrophages leads to many of GD's symptoms. Glucosylsphingosine (lyso-Gb1) is a deacylated form of GluCer that has proven to be a highly sensitive and specific biomarker for the follow-up of GD patients

## Objectives

We herein report the lyso-Gb1 levels of a cohort of GD patients to better understand the range of this biomarker in different clinical contexts.

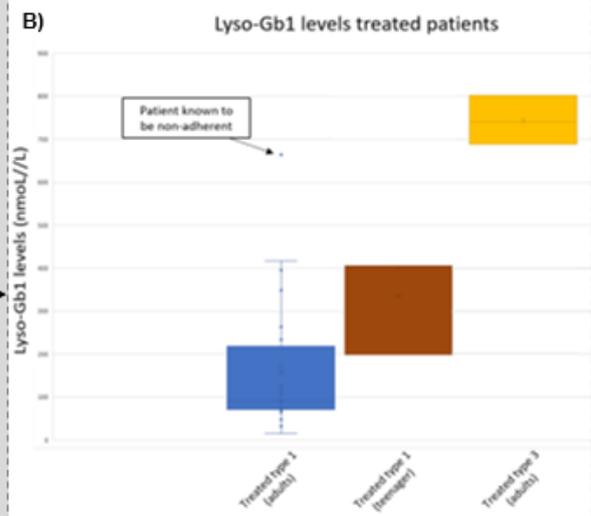
## Methods

GD patients are seen at the GD Reference Center at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brazil  
 n=29

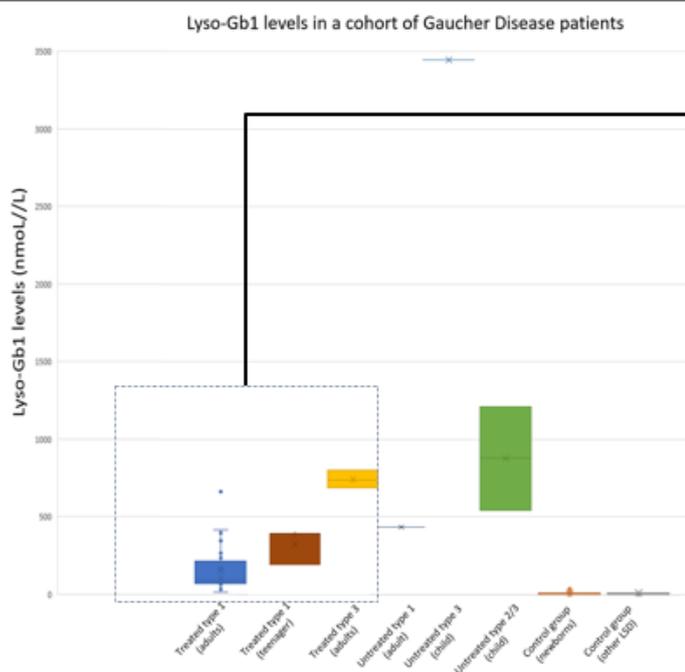


## Results

The lyso-Gb1 values of our sample can be found in Figures 1 A and B. The average of lyso-Gb1 for the treated GD1 was 147 (range:15-793) and for the 11-year-old patient was 394 nmoL/L. The highest lyso-Gb1 value for the treated adult patient with GD1 group belonged to a known non-adherent to treatment patient (Figure 1A). The average value for the treated GD3 was 743 (range 644-837). The values for the untreated GD patients were 395 and 3,447 nmoL/L respectively for GD1, and GD3.



The patient with GD type 2/3 had two measures of lyso-Gb1: 542 and 1,212 nmoL/L respectively one month before and one month after the start of the treatment. The average of lyso-Gb1 for general newborns was 8 (range: 3-12) and for other LSDs was 7 (range: 5-11) (Figure 1A).



## Conclusion

This is the first experience of our center using lyso-Gb1 as a biomarker. Higher levels of lyso-Gb1 were seen in GD2 and both treated and untreated GD3 when compared to GD1.

It was interesting to observe that the highest level of lyso-Gb1 in the treated GD1 sample belonged to a non-adherent to treatment patient.

This study can help to better understand the cut-off lyso-Gb1 values for different clinical contexts and corroborates its use as a biomarker.

Figure 1 A) Levels of lyso-Gb1 in the patient's cohort including treated and untreated patients with Gaucher Disease, and two different control groups (general newborns, and other lysosomal storage

## IWGGD 2022 Lyso-Gb1 levels in a cohort of Gaucher Disease patients

Dear Matheus Wilke,

We are pleased to confirm that the following abstract has been accepted to the IWGGD 2022 as a poster:

00063

From prodromal symptoms to the diagnosis of Parkinson's Disease: a case report of a Gaucher Disease type 1 patient with hyposmia.

Those who will be selected for an oral poster will be receiving notification starting next week.

Instructions with poster format guidelines and logistics information will be sent to you next week (for print and digital).

As the early bird rate registration deadline is fast approaching (April 8th), if you haven't already done so, we invite you to confirm your acceptance to present your research by registering for IWGGD 2022 using the link below ASAP.

<https://www.iwggdsymposium.com/registration2022-1>

If you are not registered by April 15th we will assume that you will not attend to present your work and your details will be removed from the programme. If you have already registered to attend, then no need to register again.

We look forward to welcoming you in Leiden soon!

Best regards,

# From prodromal symptoms to the diagnosis of Parkinson's Disease: a case report of a Gaucher Disease patient with hyposmia. with Gaucher Disease type 1: A case Report



Matheus WILKE (1,2), Fabiano POSWAR(1), Wyllysians BORELLI (3), Artur SCHUH(3), Ida Vanessa SCHWARTZ (1,4,5)

1 - Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil 2 - Postgraduate Program in Medical Sciences, PPGCM, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil 3- Neurology Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil 4 - Department of Genetics, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil 5 - BRAIN Laboratory, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

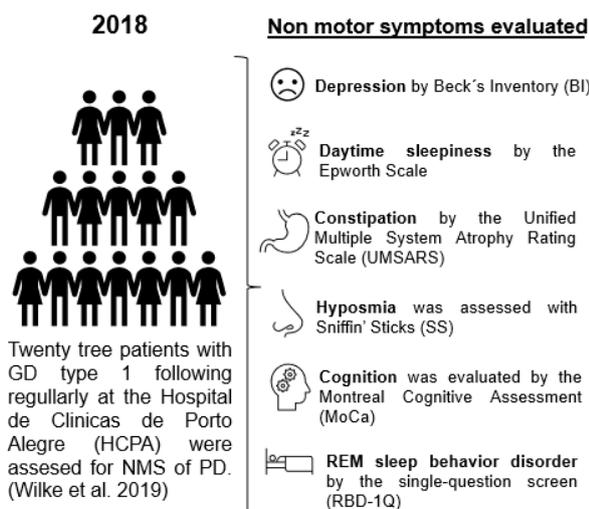
## Introduction

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease. The classic motor symptoms of PD may be preceded by many non-motor symptoms (NMS), such as hyposmia, REM sleep behavior disorder, constipation, cognitive impairment, and depression. Population studies have identified pathogenic variants in *GBA* as the main risk factor for idiopathic PD.

## Objectives

This is a case report aiming to raise awareness for the importance of the evaluation of NMS of PD in adult patients with Gaucher Disease type 1 (GD1).

## Methods



## Results

This is a female patient, currently at the age of 66. The patient started treatment with enzyme replacement therapy at the age of 42 due to anemia, thrombocytopenia, and splenomegaly. Patients' demographics and clinical characteristics can be found in Table 1. Patient scores can be found in Table 2.

In 2021 follow up she was diagnosed with PD due to bradykinesia and tremor.

To rule out other causes of parkinsonism a genetic panel for genes related to PD and parkinsonism was done showing, apart from the *GBA* variants, a *VUS* in *VPS13C* not deemed relevant to the case.

Table 01 – Demographic and clinical characteristics of the patient

Gender	Age (years)	Genotype	SPX	Age at diagnosis (years)	Treatment duration (years)	Current treatment	SSI	DS3	Hb (g/dL)	Plat (x 10 <sup>9</sup> /L)	Current ChT activity (nmol/hr.mL)
F	72	N370S/RecNcil	No	42	20	ERT	0	3.0	12.9	129	630

SPX splenectomy, N no, Y yes, ERT enzyme replacement therapy, SSI Zimran Severity Score Index (mild = 0–10; moderate = 11–19; severe ≥20), DS3 Disease Severity Score (mild = < 3.00; moderate = 3.00–5.99; marked = 6.00–19), Hb hemoglobin, Plat platelet count, ChT chitotriosidase activity (normal range: < 78.5 nmol/hr.mL).

Table 02 – Scores of the scales used to evaluate non-motor symptoms of Parkinson's disease in patients with Gaucher disease type 1 in 2018.

BDI	ESS	UMSARS	SST	MoCa	RBD-1Q
17	4	2	4	22	N

Altered results are presented in red. BDI Beck Depression Inventory (cutoff for depression > 14), ESS Epworth Sleepiness Scale (cutoff for increased daytime sleepiness > 10), UMSARS Unified Multiple System Atrophy Rating Scale (cutoff for constipation ≥2), SST Sniffin' Sticks Test (cutoff for hyposmia < 9/12), MoCa Montreal Cognitive assessment (cutoff for cognitive impairment < 26), RBD-1Q Single-Question Screen for REM Sleep Behavior Disorder (cutoff being a positive answer to the single question), NP not performed,

## Conclusion

The patient with the highest number of NMS in our 2018 cohort was the one that developed PD after 4 years. The PD phenotype is most likely caused by the *GBA* variants as a secondary cause was not found in a parkinsonism gene panel.

Hyposmia appears to be the most specific NMS of PD in our cohort. This is in agreement with a previous study that showed that in a 6 year follow up of a cohort of *GBA* mutation-positive individuals, low baseline UPSIT score (severe microsmia) appears to be a strong predictor for greater deterioration in motor and non-motor markers. (Avenali et al., 2019)

This study corroborates the importance of longitudinal follow-up for these patients.

## Bibliography

Wilke MVMB, Dornelles AD, Schuh AS, Vairo FP, Basgalupp SP, Siebert M, Nalin T, Piltcher OB, Schwartz IVD. Evaluation of the frequency of non-motor symptoms of Parkinson's disease in adult patients with Gaucher disease type 1. *Orphanet J Rare Dis*. 2019 May 10;14(1):103. doi: 10.1186/s13023-019-1079-4. PMID: 31077260; PMCID: PMC6509774. Avenali M, Toffoli M, Mullin S, et al Evolution of prodromal parkinsonian features in a cohort of *GBA* mutation-positive individuals: a 6-year longitudinal study *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 2019;90:1091-1097.

**LACLSLSD Forum - Apresentação de séries de caso.**

# LACLSLSD FORUM

**2021/2022**

Monthly Virtual Session:  
Topics on LSD and Case  
Discussion



## TOPIC: GAUCHER DISEASE

**November 10th, 2021**

**(16:00 to 17:00 UTC)**

**US California 09:00 / Mexico 11:00 / Colombia 11:00 /  
US New York 12:00 / Buenos Aires 13:00 / Brasilia 13:00 /  
London 17:00 / Frankfurt 18:00**

**COORDINATED BY**

***Roberto Giugliani and Filippo Vairo***

### **HIGHLIGHTS ON GAUCHER DISEASE**

***Presented by:***



***Dr. Gregory Pastores***  
(Ireland)

### **GAUCHER CASE SERIES**

***Presented by:***



***Dr. Matheus Wilke***  
(Brazil)

**COMMENTS:**

LACLSLSD Faculty Members

**QUESTIONS & ANSWERS:**

(open to all participants)

## Apresentação oral SLEIMPN punta Cana



**Matheus Wilke :**

The Scientific Committee of the “XII Latin American Congress of Inborn Errors of Metabolism and Newborn Screening” that will be held in Punta Cana – República Dominicana, in May 4-7, 2022 inform you that your abstract PARKINSON DISEASE IN ADULT PATIENTS WITH GAUCHER DISEASE TYPE 1: FREQUENCY OF PRE-MOTOR SYMPTOMS AND LYSOSOMAL ENZYMES PROFILE IN CEREBROSPINAL FLUID AND PLASMA has been selected for **ORAL** PRESENTATION.

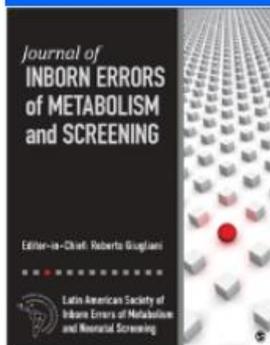
More details about the specific day and room for its exposition will be sent the next month by the Organizing Committee.

You will have 10 minutes for your presentation and 5 minutes for questions.

Attentively

Verónica Cornejo - Gustavo Borrajo

Scientific Committee





## Pediatric Case Reports

# Spontaneous Pubertal Onset in a Male Patient With Mixed Gonadal Dysgenesis With Mosaicism 45,X/46, X, mar (Y)/ 47,X,mar(Y),+mar(Y) - Pediatric Case Report



**Matheus Vernet Machado Bressan Wilke, Eduardo Corrêa Costa, Julio Cesar Loguercio Leite, Iara Regina Siqueira Lucena, Tatiana Prade Hemesath, Clarissa Gutierrez Carvalho, Mariluce Riegel, and Guilherme Guaragna-Filho**

This report describes an adolescent with Mixed Gonadal Dysgenesis and unexpected mosaicism [karyotype 46,X,mar(Y)/47,X,mar(Y),+mar(Y)]. Diagnosis with 1 month of age due to atypical genitalia. He presented a right streak gonad, which was removed due to the risk for germ cell tumor, and a left testis with epididymis barely connected and without *vas deferens*. Left testis maintenance was sufficient for him to undergo spontaneous puberty. The patient was non-responsive to growth hormone. Webbed neck was the only dysmorphic feature. To the best of our knowledge, there were no similar cases reported with spontaneous pubertal progress reported in the literature. *UROLOGY* 158: 204–207, 2021. © 2021 Elsevier Inc.

Mixed gonadal dysgenesis (MGD) is associated with various karyotype mosaicisms.<sup>1</sup> The phenotypic variability of patients carrying a mosaic karyotype that includes a 45,X lineage ranges from Turner syndrome to apparently normal male. With regard to gonadal development, MGD is characterized by asymmetric gonads, commonly a testis and a streak gonad.<sup>2</sup>

The mosaic karyotype 45,X/46,XY may be attributed to a structural abnormality of the Y chromosome. Loss of the Y chromosome during anaphase migration would also result in this karyotype. In the case of mitotic nondisjunction, three cell lines (X, XY, and XYY) are formed, with subsequent loss of the XYY line.<sup>3</sup> The phenotypic consequences of 45,X/46,XY mosaicism were unrelated to the proportions of each cell lineage.<sup>4</sup>

Patients with MGD who are raised as males tend to undergo spontaneous puberty, albeit testosterone sometimes may need to be administered.<sup>2</sup> The main issues presented by these patients are the final penile length and infertility.<sup>5</sup> In this case report, we describe an adolescent with 46,X,mar(Y)/47,X,mar(Y),+mar(Y) mosaicism. The patient underwent spontaneous puberty. The Institutional Review Board approved this case report (2019-0141/09162519.5.0000.5327).

### CASE REPORT

Because of his atypical genitalia, he had been referred to our disorders of sexual development multidisciplinary team. The initial physical examination showed a phallus with wrinkled labioscrotal folds and a probable urogenital sinus. The right gonad was situated intra-abdominally and the left gonad was in the inguinal canal (Stage 3 on the Prader scale). His parents were non-consanguineous. The pregnancy and birth were uneventful.

Cytogenetic analysis revealed a mosaic karyotype with three different cell lines: one with 45 chromosomes and the absence of one sex chromosome (45,X), a second with 46 chromosomes and one marker chromosome (46,X,mar(?)), and a third with 47 chromosomes and two marker chromosomes (47,X,mar(?),+mar(?)). Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analysis identified the Y chromosome as the origin of the marker chromosomes. Therefore, the final karyotype was described as 45,X[80]/46,X,mar(Y)

**Declarations of interest:** none.

*There are no funding or financial sources to declare.*

From the Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil; the Pediatric Surgery Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil; the DSD Program, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil; the Radiology Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil; the Psychology Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil; the Department of Pediatrics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil; and the Post-Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Address correspondence to Eduardo Corrêa Costa, Rua Ramiro Barcelos, 2350, room 600, Pediatric Surgery Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, CEP 90035-903. E-mail: [ecosta@hcpa.edu.br](mailto:ecosta@hcpa.edu.br)

Submitted: May 6, 2021, accepted (with revisions): August 15, 2021

204 <https://doi.org/10.1016/j.urology.2021.08.018>  
0090-4295

© 2021 Elsevier Inc.  
All rights reserved.



CASE REPORT

Open Access



# Exome sequencing can misread high variant allele fraction of somatic variants in *UBA1* as hemizygous in VEXAS syndrome: a case report

Matheus V. M. B. Wilke<sup>1</sup>, Eva Morava-Kozicz<sup>2,3\*</sup>, Matthew J. Koster<sup>4</sup>, Christopher T. Schmitz<sup>1,3</sup>, Shannon Kaye Foster<sup>5</sup>, Mrinal Patnaik<sup>6</sup>, Kenneth J. Warrington<sup>4</sup>, Eric W. Klee<sup>1,2,7</sup> and Filippa Pinto e Vairo<sup>1,2</sup>

## Abstract

**Background:** VEXAS syndrome (vacuoles, E1 enzyme, X-linked, autoinflammatory, somatic syndrome) is a recently described syndrome caused by a somatic missense variant at the methionine-41 (p.(Met41)) position in the ubiquitin-like modifier activating enzyme 1 (*UBA1*) in Xp11.3. Germline pathogenic variants in *UBA1* are associated with a distinct phenotype: a syndrome with severe neurologic features associated with loss of anterior horn cells and infantile death denominated X-Linked Spinal Muscular Atrophy 2 (SMAX2) (OMIM 301,830).

**Case presentation:** We report a male individual with the phenotype of VEXAS syndrome that was initially identified through exome sequencing (ES) as having a hemizygous germline variant in *UBA1* due to high variant allele frequency (VAF). Research Sanger sequencing was able to confirm the absence of the p.(Met41Val) variant in a skin biopsy and in gastric mucosa tissue sample confirming the variant happened as a postzygotic event.

**Conclusions:** The present case exemplifies the diagnostic challenge that was imposed by the high VAF detected by ES that failed to correctly demonstrate that the variant was in a mosaic state. Sequencing of different tissues should be considered when there is conflict between the *UBA1* variant status and the clinical findings.

**Keywords:** VEXAS syndrome, Variant allele frequency, X-Linked spinal muscular atrophy 2, Case report

## Key message

- Exome sequencing can misread high variant allele fraction in *UBA1* as hemizygous in VEXAS syndrome.

## Background

VEXAS syndrome (vacuoles, E1 enzyme, X linked, auto-inflammatory, somatic syndrome) is a recently described syndrome caused by a somatic missense variant at the methionine-41 (p.(Met41)) position in the ubiquitin-like modifier activating enzyme 1 (*UBA1*) in Xp11.3. Ubiquitylation is an important post-translation biological process for hematopoiesis and the regulation of almost all host cellular processes, including host–pathogen interactions, inflammatory signaling, phagosomal maturation, autophagy, and apoptosis [1, 2].

All cases described in the literature corroborate that *UBA1* variants associated with VEXAS syndrome are

\*Correspondence: [Morava-Kozicz.Eva@mayo.edu](mailto:Morava-Kozicz.Eva@mayo.edu)

<sup>2</sup> Department of Clinical Genomics, Mayo Clinic, 200 First St SW, Rochester, MN 55905, USA

Full list of author information is available at the end of the article





RESEARCH

Open Access

# Evaluation of the frequency of non-motor symptoms of Parkinson's disease in adult patients with Gaucher disease type 1



Matheus V. M. B. Wilke<sup>1,2\*</sup>, Alcía D. Domelles<sup>2</sup>, Artur S. Schuh<sup>1,3</sup>, Filippo P. Vairo<sup>2,4,5</sup>, Suelen P. Basgalupp<sup>1,10</sup>, Marina Siebert<sup>6,7,10</sup>, Tatiele Nalin<sup>2</sup>, Otávio B. Piltcher<sup>8</sup> and Ida V. D. Schwartz<sup>1,2,9,10</sup>

## Abstract

Gaucher disease (GD) is caused by deficiency of beta-glucocerebrosidase (GCase) due to biallelic variations in the *GBA1* gene. Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative condition. The classic motor symptoms of PD may be preceded by many non-motor symptoms (NMS), which include hyposmia, rapid eye movement (REM) sleep behavior disorder, constipation, cognitive impairment, and depression. Population studies have identified mutations in *GBA1* as the main risk factor for idiopathic PD. The present study sought to evaluate the prevalence of NMS in a cohort of patients with GD type 1 from Southern Brazil.

**Methodology:** This is an observational, cross-sectional study, with a convenience sampling strategy. Cognition was evaluated by the Montreal Cognitive assessment (MoCa), daytime sleepiness by the Epworth Scale, depression by the Beck Inventory, constipation by the Unified Multiple System Atrophy Rating Scale, and REM sleep behavior disorder by the Single-Question Screen; hyposmia by the Sniffin' Sticks. Motor symptoms were assessed with part III of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale. All patients were also genotyped for the *GBA1* 3'-UTR SNP (rs708606).

**Results:** Twenty-three patients (female = 13; on enzyme replacement therapy = 21, substrate reduction therapy = 2) with a mean age of  $41.45 \pm 15.3$  years (range, 22–67) were included. Eight patients were found to be heterozygous for the 3'-UTR SNP (rs708606). Fourteen patients (8 over age 40 years) presented at least one NMS; daytime sleepiness was the most frequent ( $n = 10$ ). Two patients (aged 63 and 64, respectively) also presented motor symptoms, probably drug-related.

**Conclusions:** NMS were prevalent in this cohort. We highlight the importance of a multidisciplinary follow-up focusing on earlier diagnosis of PD, especially for patients with GD type 1 over the age of 40.

**Keywords:** Gaucher disease, Parkinson's disease, Non-motor symptoms

## Introduction

Gaucher disease (GD, OMIM 230800) is caused by deficient activity of beta-glucocerebrosidase (GCase) due to biallelic pathogenic variants in the *GBA1* gene located at chromosome 1q21. GD is one of the most common lysosomal disorders, with an estimated worldwide incidence of 1 case per 57,000 live births [1, 2]. Three clinical forms of GD are conventionally classified based on the

neurological involvement. Type 1 is considered non-neuronopathic, whereas types 2 and 3 are considered the neuronopathic forms [3]. More than 400 mutations in the *GBA1* have been described, with c.1226A > G (N370S) being the most frequent in the GD type 1 population [4].

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative condition, affecting 2% of the population over age 60 years and 4% of the population over age 80 [5]. The motor symptoms of PD are preceded by a prodromal period of up to 20 years. The so-called non-motor symptoms (NMS) that occur during this prodrome, such as hyposmia, rapid eye movement (REM)

\* Correspondence: [mtwilke@gmail.com](mailto:mtwilke@gmail.com)

<sup>1</sup>Postgraduate Program in Medical Sciences, Faculdade de Medicina,

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup>Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre,

RS, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2019 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.



CASE REPORT

Open Access



# Two different presentations of de novo variants of *CSNK2B*: two case reports

Matheus V. M. B. Wilke<sup>1,2</sup>, Bibiana M. Oliveira<sup>1,3,4</sup>, Alessandra Pereira<sup>5</sup>, Maria Juliana R. Doriqui<sup>6</sup>, Fernando Kok<sup>4</sup> and Carolina F. M. Souza<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background:** Poirier–Bienvenu neurodevelopmental syndrome is a neurologic disorder caused by mutations in the *CSNK2B* gene. It is mostly characterized by early-onset seizures, hypotonia, and mild dysmorphic features. Craniodigital syndrome is a recently described disorder also related to *CSNK2B*, with a single report in the literature.

**Objective:** To report two unrelated cases of children harboring *CSNK2B* variants (NM\_001320.6) who presented with distinct diseases.

**Case report:** Case 1 is a 7-month-old, Caucasian, female patient with chief complaints of severe hypotonia and drug-refractory myoclonic epilepsy, with a likely pathogenic de novo variant c.494A>G (p.His165Arg). Case 2 is a 5-year-old male, Latino patient with craniodigital intellectual disability syndrome subjacent to a de novo, likely pathogenic variant c.94G>T (p.Asp32Tyr). His dysmorphic features included facial dysmorphisms, supernumerary nipples, and left-hand postaxial polydactyly.

**Conclusion:** This report suggest that the *CSNK2B* gene may be involved in the physiopathology of neurodevelopmental disorders and variable dysmorphic features.

**Keywords:** Epilepsy, Hypotonia, Dysmorphic features, Case report

## Introduction

Poirier–Bienvenu neurodevelopmental syndrome (POBINDS; OMIM #618732) is a recently described disorder characterized by hypotonia, seizures, and developmental delay [1]. POBINDS is caused by mutations in the *CSNK2B* gene (located at 6p21.33), which encodes the beta subunit (CK2 $\beta$ ) of the casein kinase 2 enzyme (CK2). It has been reported that the *CSNK2B* gene is neither susceptible to missense mutations ( $Z = 3.83$ ) nor loss of function (pLi 0.92; observed/expected = 0.08; 95% confidence interval 0.03–0.38). In fact, all cases reported have been subjacent to de novo mutations and caused variants that lead to loss of function [2].

Dysmorphic features other than those originally reported have recently been associated with craniodigital syndrome (CDS), a condition that can be distinguished from POBINDS [3]. However, these dysmorphic features are not fully characterized [4].

This work aims to detail the clinical manifestations of patients with two *CSNK2B* variants presenting with distinct phenotypes, one with the phenotype closer to POBINDS and another with the phenotype closer to CDS. To the best of our knowledge, only two cases have described patients with similar dysmorphic features. We also discuss possible pathogenic mechanisms based on a literature review, emphasizing the necessity to better elucidate the clinical phenotype spectrum related to the *CSNK2B* gene.

\*Correspondence: cfsouza@hcpa.edu.br

<sup>1</sup> Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350 – 3<sup>a</sup> andar, Porto Alegre, RS 90035-007, Brazil  
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2021. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.



dose-related reduction of  $\alpha$ -galactosidase (to 39% of untreated  $\alpha$ -galactosidase in 40  $\mu$ M drug; <1% of control at 100 mM). These studies also showed reduction of heat- and pH-labile lysosomal enzyme hexosaminidase. However, more stable lysosomal hexosaminidase B,  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glucuronidase were only moderately reduced by chloroquine; cytosolic lactate dehydrogenase and malate dehydrogenase were unchanged. The specificity of chloroquine for a number of lysosomal enzymes was observed in a pattern comparable to rates of enzyme inactivation under conditions of pH neutralization. Of activities studied,  $\alpha$ -galactosidase was most sensitive. These observations suggest that the chloroquine-induced phenocopy is the relative neutralization of lysosomes and accumulation of  $\alpha$ -galactosidase substrates. It further warns against concomitant use of chloroquine-like medications in lysosomal diseases.

doi:10.1016/j.ymgme.2020.12.274

## 269

### Newborn screening for metachromatic leukodystrophy in Northern Germany- a prospective study

Thomas Wiesinger<sup>a</sup>, Markus Schwarz<sup>a</sup>, Petra Oliva<sup>a</sup>, Thomas P. Mechtler<sup>a</sup>, Berthold Streubel<sup>b</sup>, Charlotte Chanson<sup>c</sup>, Mirko M. Essing<sup>c</sup>, Simona Murko<sup>d</sup>, Annette Bley<sup>d</sup>, Rene Santer<sup>d</sup>, David C. Kasper<sup>a</sup>,  
<sup>a</sup>ARCHIMEDlife, Vienna, Austria, <sup>b</sup>Medical University of Vienna, Vienna, Austria, <sup>c</sup>Orchard Therapeutics (Europe) Ltd., London, United Kingdom, <sup>d</sup>University Medical Center Hamburg Eppendorf, Hamburg, Germany

Metachromatic leukodystrophy (MLD) is a rare, fatal autosomal-recessive genetic disorder caused by insufficient activity of the enzyme arylsulfatase A (ARSA) that results in intra-lysosomal accumulation of the ARSA substrate galactosylceramide 1<sup>3</sup>-sulfate (sulfatide), inevitably leading to progressive demyelination and neurodegeneration in the CNS and PNS. There are three variants of MLD commonly described in the literature based on the age at which symptoms appear: late-infantile MLD, juvenile MLD, and adult MLD. All forms of MLD share the same underlying pathophysiology and are progressive; and ultimately affect both intellectual and motor functions. Children affected by MLD display progressive neurologic symptoms, including ataxia, seizures, and quadriplegia, culminating in severe disability and early death. MLD diagnosis is often delayed or missed. The true incidence rate of MLD is unknown but is estimated to be between 1 in 40,000 and 1 in 160,000 live births. We have initiated a prospective newborn screening study with implementation of MLD into the current newborn screening panel (covering 15 different diseases) for all newborns in the German

## 270

### Informing patients with rare diseases about COVID-19: Creation of the "Beto and the Coronavirus" booklet

Matheus V. Wilke, Carolina Fischinger Moura de Souza, Roberto Giugliani, Ida V. Schwartz, Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Brazil, Porto Alegre, Brazil

#### Introduction

SARS-CoV-2 infection presents a higher risk of morbidity and mortality in patients with chronic diseases. The care of patients with rare diseases, needed to be adapted after the start of the pandemic. Among the IEM, Mucopolysaccharidoses (MPS), Fabry Disease and Gaucher Disease are examples that also require frequent hospital visits for enzymatic replacement therapy (ERT) weekly or biweekly. Due to the pandemic, many infusions had to be reallocated to the patients' cities of origin or had their doses adjusted to reduce hospital exposure. Thinking about how to communicate simply the new flowchart of care and treatment, in addition to addressing general issues regarding the pandemic, our group created 'Beto and the Coronavirus' information booklet for patients.

#### Objectives

To report the creation of simple and playful educational material on the main care that a patient with a rare disease should have both at home and in the hospital.

#### Methodology

The booklet was developed from the 'Flowchart of therapeutic decision for patients with the lysosomal disease (DL) during the COVID-19 pandemic of the Brazilian Society of Medical Genetics and Genomics'. The illustrations were made by our team. The dissemination took place through the *Instituto Genética para Todos*, having been translated into 3 languages.

#### Practice changes

The booklet made it possible to understand the new service and treatment flowcharts thoroughly. It also allowed it to be discussed with younger patients the role of personal protective equipment by both the team and the patient himself. The main character, Beto, also has MPS and needs to make ERT which generates a greater identification of patients with the booklet.

#### Final considerations

The pandemic has brought about wide-ranging modifications, including the treatment and follow-up of patients with rare diseases. Clear, simple, and playful communication allows for a greater understanding of the current situation.

doi:10.1016/j.ymgme.2020.12.276



Saxony. The total birth rate in this area is approximately 55,000 live births per year. A tiered screening approach is being applied where sulfatides levels are measured in dried blood spots, followed by ARSA activity and finally genetic confirmatory testing (ARSA, *SUMF1*, and *PSAP* genes). For the initial validation, 200–300 samples are being analyzed to establish all necessary assay performance characteristics. Cut-off determination for primary diagnostics will be established in a pre-pilot study with circa 5000 samples. Planned study duration is an initial 12 months with extension for another one to two years.

doi:10.1016/j.ymgme.2020.12.275

## 271

### Lyso-Gb1 levels in sisters with Gaucher disease type 1: A case report

Matheus V. Wilke<sup>a</sup>, Francyne Kubaski<sup>a</sup>, Livia Paskulin<sup>b</sup>, Roberto Giugliani<sup>a</sup>, Ida V.D. Schwartz<sup>a</sup>, <sup>a</sup>Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil, Porto Alegre, Brazil, <sup>b</sup>GENEX Institute, Porto Alegre, Brazil

#### Introduction

Gaucher Disease (GD) is caused by deficient activity of *GBA*-coded lysosomal glucocerebrosidase. The accumulation within lysosomes of

its substrate, glucosylceramide (GluCer) leads to many of GD's symptoms. Glucosylsphingosine (lyso-Gb1) is a deacylated form of GluCer that has proven to be a good GD biomarker. We herein report two GD type 1 sisters with the E349K/S366N genotype in the *GBA* gene, who present with different levels of lyso-Gb1.

#### Patients and methods

This is a retrospective study based on the medical file review. Both patients are seen at the GD Reference Center at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil, negative for the chitotriosidase gene (*CHIT1*) null variant, and are heterozygotes for the *HFE1* pathogenic variant c.187C>G.

#### Results

**Patient1:** a 47-year-old female diagnosed at the age of 42 years (2011). The patient receives imiglucerase 30UI/kg/biweekly since 2013 after a 1-year attempt of miglustat 300 mg/day (2012–2013) discontinued due to gastrointestinal problems and slight clinical improvement. Laboratory parameters of dez/18: lyso-Gb1 24 nmol/L (reference range < 12 nmol/L), ferritin = 524.4 ng/mL (reference range = 10 to 120 ng/mL) and chitotriosidase 643 nmol/h/mL (reference range = 8.8–132). Her Disease Severity Scoring System (DS3) was 1.8. Bone marrow burden score (BMB): 3/16 (2015). **Patient2:** a 50-year-old female diagnosed at the age of 45 years (2013), sister of patient 1. The patient receives taliglucerase alfa 15UI/kg/biweekly (since late 2017); her previous treatment was miglustat 300 mg/day (2014–2017) which was switched due to no clinical response. Laboratory level of dez/18: lyso-Gb1 124 nmol/L, ferritin = 1053 ng/mL, chitotriosidase 1133 nmol/h/mL. DS3:0 and BMB: 14/16 (early 2017 while still on miglustat).

#### Conclusion

It appears to have a positive correlation between lyso-Gb1 time/dosage of ERT. Lyso-Gb1 appears to have correlation with other GD biomarkers. This is the first experience of our center using lyso-Gb1 as a biomarker.

doi:10.1016/j.ymgme.2020.12.277

provide a larger window for the enzyme to stay active while in circulation prior to being taken up into the target tissues. To establish proof-of-concept, we engineered stabilized versions of hGLA and delivered them through AAV-based gene therapy with the goal to develop a one-time effective gene therapy for Fabry disease. To enhance stability, we focused the protein engineering on stabilizing the hGLA homodimer. Several engineered hGLA showed improved enzyme stability and half-life under plasma-like neutral pH conditions as well as in the lysosome after cellular uptake in vitro. Top candidates were delivered to *Gla* knockout mice via low dose AAV mediated gene delivery using a pantropic capsid and ubiquitous promoter. We demonstrated that one engineered hGLA had similar enzyme activity levels than wildtype hGLA with enhanced globotriaosylsphingosine (lyso-Gb<sub>3</sub>) substrate reduction in plasma as well as globotriaosylceramide (GL-3) storage reduction in disease-relevant tissues at doses that were subtherapeutic with wildtype hGLA. Collectively, our data shows that our stabilized hGLA is more potent and we provide the first of its kind proof-of-concept for an enhanced AAV-based gene therapy at low doses of vector suggesting a safe and translational approach for Fabry disease.

doi:10.1016/j.ymgme.2020.12.278

## 273

### Exploration of the role of whole exome sequencing variants in *GBA1*-associated Parkinson disease

Elizabeth Geena Woo, Frank Donovan, Barbara Stubblefield, Settara Chandrasekharappa, Grisel Lopez, Ellen Sidransky, Nahid Tayebi, National Human Genome Research Institute, Bethesda, MD, United States

Gaucher disease (GD) is a rare autosomal lysosomal disorder



Received: 19 October 2020 | Revised: 18 December 2020 | Accepted: 6 January 2021

DOI: 10.1002/ajmg.c.31883

## RESEARCH ARTICLE

AMERICAN JOURNAL OF  
medical genetics  
Seminars in Medical Genetics  
WILEY

# SARS-CoV-2 pandemic in the Brazilian community of rare diseases: A patient reported survey

Ida Vanessa Doederlein Schwartz<sup>1,2</sup>  | Dévora Natalia Randon<sup>3,4</sup> |  
Natan Monsores<sup>5</sup> | Carolina Fischinger Moura de Souza<sup>1</sup> |  
Dafne Dain Gandelman Horovitz<sup>6</sup> | Matheus Vernet Machado Bressan Wilke<sup>1,7</sup> |  
Decio Brunoni<sup>8</sup>

<sup>1</sup>Medical Genetics Service and Clinical Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

<sup>2</sup>Genetics Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>3</sup>Postgraduate Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>4</sup>Experimental Research Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

<sup>5</sup>Postgraduate Program in Bioethics, Department of Public Health, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil

<sup>6</sup>Medical Genetics Department/Reference Center for Rare Diseases—National Institute of Women, Children and Adolescents Health Fernandes Figueira, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>7</sup>Postgraduate Program in Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>8</sup>Center for Biological and Health Sciences, Graduate Program on Developmental Disorder, Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, Brazil

### Correspondence

Ida Vanessa Doederlein Schwartz, Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Ramiro Barcelos, 2350, 90035-003, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.  
Email: ischwartz@hcpa.edu.br

### Funding information

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brazil – (CAPES) - Finance Code 001, and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brazil (CNPq).

### Abstract

The COVID-19 pandemic has led to a reorganization of health systems to prioritize the fight against the virus. The adoption of social distancing interfered with the flow of existing policies, and may thus negatively affect the most vulnerable groups, such as the rare disease community. Aiming at characterizing the perception of the impact of COVID-19 on the health care of the Brazilian rare disease community, an online questionnaire addressed to patients with rare diseases and their caregivers was disseminated in the Brazilian territory between June 1st to July 5th, 2020. The questions dealt with the sanitary measures adopted; access to medical services; and mental suffering during the pandemic. The survey was answered by 1,466 participants (<18 yo = 53.3%) representing 192 rare diseases. Regarding physical distancing, 1,372 (93.6%) participants did not leave their residence, or did so only when essential; 1,321 (90.1%) always wore masks when leaving home. 1,042 (71.1%) and 995 (67.9%) participants, respectively, referred medical genetics appointments and rehabilitation therapies were postponed/canceled. Telemedicine was experienced by 1,026 (70%), and 68.3% agreed this is a good strategy for health care. Patients with Inborn Errors of Metabolism (IEM,  $n = 624$ , 42.5%) appear to have more access to information and ability to overcome difficulties, and feel less threatened, lonely and depressed than the non-IEM group ( $p < .05$ ). There was an increment of the rare disease patients' vulnerability in the pandemic scenario. The cooperation of patients/caregivers along with adaptation of the health system is crucial and may be so even post-pandemic.

### KEYWORDS

Brazil, coronavirus, COVID-19, genetic disorders, rare diseases



## RESEARCH REPORT



WILEY

# Measurement of sulfatides in the amniotic fluid supernatant: A useful tool in the prenatal diagnosis of metachromatic leukodystrophy

Francyne Kubaski<sup>1,2,3</sup> | Zackary M. Herbst<sup>4</sup> | Maira Graeff Burin<sup>2</sup> |  
Kristiane Michelin-Tirelli<sup>2</sup> | Franciele B. Trapp<sup>2</sup> | Rejane Gus<sup>2</sup> |  
Alice B. O. Netto<sup>1,2</sup> | Ana Carolina Brusius-Facchin<sup>2</sup> | Sandra Leistner-Segal<sup>2,5</sup> |  
Maria Teresa Sanseverino<sup>2,6</sup> | Carolina Moura Fischinger de Souza<sup>2</sup> |  
Matheus V. M. B. Wilke<sup>2,5</sup> | Thiago Oliveira<sup>2</sup> | Jose A. A. Magalhães<sup>7</sup> |  
Roberto Giugliani<sup>1,2,3,5,8</sup> 

<sup>1</sup>PPGBM, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

<sup>2</sup>Medical Genetics Service, HCPA, Porto Alegre, Brazil

<sup>3</sup>INAGEMP, Porto Alegre, Brazil

<sup>4</sup>Department of Chemistry, University of Washington, Seattle, Washington, USA

<sup>5</sup>PPGCM, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

<sup>6</sup>Escola de Medicina, PUCRS, Porto Alegre, Brazil

<sup>7</sup>Fetal Medicine Unit, HCPA, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

<sup>8</sup>Department of Genetics, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

## Correspondence

Roberto Giugliani, Medical Genetics Service, HCPA, 2350 Ramiro Barcelos, Porto Alegre, RS, 90035-903, Brazil.  
Email: rgiugliani@hcpa.edu.br

## Funding information

CNPq, Grant/Award Number: 405495-2018-8; INAGEMP; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

**Communicating Editor:** Jörn Oliver Sass

## Abstract

Metachromatic leukodystrophy (MLD) is an autosomal recessive lysosomal disorder caused by deficiency of arylsulfatase A (ARSA), leading to an accumulation of sulfatides. Sulfatides have been quantified in urine, dried blood spots (DBS), and tissues of patients with MLD. Newborn screening (NBS) for MLD has already been proposed based on a two-tier approach with the quantification of sulfatides in DBS followed by the quantification of ARSA by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS). Prenatal screening for MLD is also crucial, and sulfatide quantification in amniotic fluid (AF) can aid diagnosis. The prenatal study was initiated due to a family history of MLD at 19 weeks of gestation. ARSA was quantified in cultured amniocytes. C16:0 sulfatide was quantified by LC-MS/MS in the supernatant of AF. Molecular analysis of the ARSA gene was performed in cultured amniocytes. ARSA was deficient in fetal cells, and C16:0 sulfatides were significantly elevated in comparison to age-matched controls (3-fold higher). Genetic studies identified the c.465+1G>A variant in homozygosis in the ARSA gene. Our study shows that sulfatides can be quantified in the supernatant of AF of MLD fetuses, and it could potentially aid in a faster and more accurate diagnosis of MLD patients.

## KEYWORDS

arylsulfatase A, metachromatic leukodystrophy, prenatal analysis, sulfatides, tandem mass spectrometry

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2022 The Authors. *JIMD Reports* published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of SSIEM.



# Expanding the phenotype of *DNAJC30*-associated Leigh syndrome

Marta Zawadzka<sup>1</sup> | Magdalena Krygier<sup>1</sup> | Małgorzata Pawłowicz<sup>2,3</sup> |  
Matheus Vernet Machado Bressan Wilke<sup>4</sup> | Karolina Rutkowska<sup>5</sup> | Naig Gueguen<sup>6</sup> |  
Valerie Desquirit-Dumas<sup>6</sup> | Eric W. Klee<sup>4</sup> | Lisa A. Schimmenti<sup>7</sup> |  
Jarosław Sławek<sup>8,9</sup> | Vincent Procaccio<sup>6</sup> | Rafał Płoski<sup>5</sup> |  
Maria Mazurkiewicz-Betdzińska<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Developmental Neurology, Medical University of Gdansk, Gdansk, Poland

<sup>2</sup>Department of Clinical Pediatrics, Medical Faculty of Collegium Medicum, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Olsztyn, Poland

<sup>3</sup>Department of Pediatric Neurogenetics and Rare Diseases, Prof. dr Stanisław Popowski Regional Specialized Children's Hospital, Olsztyn, Poland

<sup>4</sup>Center for Individualized Medicine, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota, USA

<sup>5</sup>Department of Medical Genetics, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland

<sup>6</sup>Centre Hospitalier Universitaire, Département de Biochimie et Génétique, Angers, France; UMR CNRS 6214-INSERM 1083, Université d'Angers, Angers, France

<sup>7</sup>Department of Clinical Genomics, Ophthalmology, Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, Biochemistry and Molecular Biology, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota, USA

<sup>8</sup>Department of Neurological and Psychiatric Nursing, Faculty of Health Sciences, Medical University of Gdansk, Gdansk, Poland

<sup>9</sup>Neurology Department, St Adalbert Hospital, Copernicus PL, Gdansk, Poland

## Correspondence

Magdalena Krygier, Department of Developmental Neurology, Medical University of Gdansk, Dębinki 7, 80-952 Gdansk, Poland.  
Email: [magdalena.krygier@gumed.edu.pl](mailto:magdalena.krygier@gumed.edu.pl)

## Abstract

Leigh syndrome (LS) is a progressive neurodegenerative disease, characterized by extensive clinical, biochemical, and genetic heterogeneity. Recently, biallelic variants in *DNAJC30* gene, encoding a protein crucial for the repair of mitochondrial complex I subunits, have been associated with Leber hereditary optic neuropathy and LS. It was suggested that clinical heterogeneity of *DNAJC30*-associated mitochondrial disease may be attributed to digenic inheritance. We describe three Polish patients, a 9-year-old boy, and female and male siblings, aged 17 and 11 years, with clinical and biochemical manifestations of LS. Exome sequencing (ES) identified a homozygous pathogenic variant in *DNAJC30* c.152A>G, p.(Tyr51Cys) in the 9-year-old boy. In the siblings, ES identified two *DNAJC30* variants: c.152A>G, p.(Tyr51Cys) and c.130\_131del, p.(Ser44ValfsTer8) in a compound heterozygous state. In addition, both siblings carried a novel heterozygous c.484G>T, p.(Val162Leu) variant in *NDUFS8* gene. This report provides further evidence for the association of *DNAJC30* variants with LS. *DNAJC30*-associated LS is characterized by variable age at onset, movement disorder phenotype and normal or moderately elevated blood lactate level. Identification of a candidate heterozygous variant in *NDUFS8* supports the hypothesis of digenic inheritance. Importantly, *DNAJC30* pathogenic variants should be suspected in patients with LS irrespective of optic nerve involvement.

## KEYWORDS

basal ganglia, *DNAJC30*, dystonia, dystonic gait, Leigh syndrome, mitochondrial disease, neurodegenerative disease, optic neuropathy, spasticity

## 1 | INTRODUCTION

Leigh syndrome (LS, OMIM: 256000) is a progressive neurodegenerative disease, characterized by symmetric necrotic basal ganglia and brain stem lesions that arise from defective mitochondrial function. LS

Marta Zawadzka and Magdalena Krygier should be considered joint first author.

non-  
pe 1.

novo  
022).

eases  
etab.  
ACID:

zilian  
187C:

: fluid  
JIMD

nadal  
eopt

uiret-  
ińska  
2022

high  
case

## ANEXOS E APÊNDICES

### APÊNDICE 1: APROVAÇÃO DO GPPG



HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
Grupo de Pesquisa e Pós Graduação

Carta de Aprovação

**Projeto**

2020/0358

**Pesquisadores:**

**IDA VANESSA DOEDERLEIN SCHWARTZ**

ARTUR FRANCISCO  
SCHUMACHER SCHUH

ROBERTO GIUGLIANI

MATHEUS VERNET MACHADO  
BRESSAN WILKE

FABIANO DE OLIVEIRA POSWAR

FRANCYNE KUBASKI

KRISTIANE MICHELIN TIRELLI

MAIRA GRAEFF BURIN

**Número de Participantes:** 30

**Título:** EVOLUÇÃO DE SINTOMAS PRÉ MOTORES E DE BIOMARCADORES DA DOENÇA DE PARKINSON EM UMA COORTE DE PACIENTES ADULTOS COM DOENÇA DE GAUCHER TIPO 1.

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.

- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG).

08/09/2020



Assinado digitalmente por:  
**PATRICIA ASHTON PROLLA**

Grupo de Pesquisa e Pós-graduação

05/09/2020 21:39:37

https://www.rii.br/portal/assinado-digitalmente-por-patricia-ashton-prolla-grupo-de-pesquisa-e-pos-grad-uacao-05-09-2020-21-39-37

## **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

(INDIVÍDUOS COM DOENÇA DE GAUCHER)

CAAE: \_\_\_\_\_

### **PROJETO**

EVOLUÇÃO DE SINTOMAS PRÉ MOTORES E DE BIOMARCADORES DA DOENÇA DE PARKINSON EM UMA COORTE DE PACIENTES ADULTOS COM DOENÇA DE GAUCHER TIPO 1.

### **PESQUISADOR RESPONSÁVEL**

Dra. Ida Vanessa Doederlein Schwartz. Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Rua Ramiro Barcelos, 2350. Porto Alegre-RS. Telefone (51)3359.8011.

**NOME DO PARTICIPANTE:** \_\_\_\_\_

Prezado paciente (ou responsável),

Gostaríamos de convidá-lo para participar de um estudo que avaliará sintomas precoces da Doença de Parkinson em pacientes com Doença de Gaucher. Se você concordar, também será coletado exames laboratoriais de sangue e líquido cefalorraquidiano (líquido da coluna) para medir alterações em outras enzimas e lipídios que podem ajudar a melhor entendimento da relação da Doença de Gaucher e Doença de Parkinson.

A Doença de Gaucher é uma doença genética ligada ao Gene *GBA* que causa o mau funcionamento da enzima beta-glucocerebrosidase.

A mutação no Gene *GBA* pode estar ligada à Doença de Parkinson. A Doença de Parkinson é a segunda doença neurodegenerativa mais comum, depois da doença de Alzheimer. A origem da Doença de Parkinson é pouco conhecida, pois pode envolver diferentes causas como o envelhecimento do cérebro, causas genéticas ou causas ambientais. Os achados principais dessa doença podem envolver rigidez e tremores em sua forma mais avançada. Muitos sinais iniciais da Doença de Parkinson podem ser avaliados em ambulatório e podem representar uma abordagem inicial dessa doença

Nosso estudo pretende avaliar 5 dos sintomas iniciais da Doença de Parkinson (prisão de ventre, depressão, alterações no sono, alterações na atenção e diminuição na capacidade de sentir cheiro) em pacientes com Doença de Gaucher.

Além disso pretendemos avaliar outras enzimas e lipídios através de coleta de sangue e líquido cefalorraquidiano (líquido da coluna) que podem estar alterados em pacientes com Gaucher e que podem auxiliar no entendimento da interação entre as duas doenças.

Se você concordar NA PRIMEIRA PARTE DO ESTUDO serão coletados dados de prontuário, como por exemplo, idade, tipo de Doença de Gaucher, escolaridade e outras informações sobre sua saúde. Realizaremos uma avaliação de como você sente cheiros, através da inspiração dos aromas contidos em canetas específicas para essa finalidade. Serão também aplicados 4 questionários que avaliam os sintomas iniciais da Doença de Parkinson (prisão de ventre, depressão, alterações no sono, alterações na atenção). A avaliação terá a duração de aproximadamente 50 minutos, sendo que você poderá fazer essas avaliações em um ou dois encontros, se assim achar conveniente. Os questionários e avaliação do olfato não causam dor e não são invasivos.

Se você concordar na SEGUNDA PARTE DO ESTUDO do estudo será feito coleta de sangue de veia periférica (do braço) por profissional treinado.

Se você concordar na TERCEIRA PARTE DO ESTUDO será feito coleta de líquido cefalorraquidiano (líquido da coluna) por profissional treinado.

Se, por acaso, for encontrada alguma alteração nos questionários ou exames você irá seguir para avaliação com um neurologista vinculado ao Centro de Pesquisa Clínica.

## **RISCOS E BENEFÍCIOS**

A coleta de líquido da coluna será feita por profissional treinado. Esse é um exame que é feito de rotina como exame neurológico e consiste na inserção de uma agulha no espaço da coluna para tirar algumas gotas de líquido. Não necessita anestesia geral, apenas no local onde a agulha será inserida. O procedimento geralmente tem duração de aproximadamente 30 minutos. Com relação à punção lombar, observa-se cefaleia (dor de cabeça) pós-punção em cerca de 15 a 30% dos pacientes, independentemente do repouso ou da reposição hídrica. A intensidade dessa dor de cabeça varia conforme o paciente.

## **RECOMENDAÇÕES E ORIENTAÇÕES PARA O PROCEDIMENTO DE LÍQUOR:**

Vir acompanhado Não dirigir ou viajar logo após o procedimento. Após o procedimento será necessário manter repouso absoluto em casa por 24 a 36h. Essa recomendação é uma forma de reduzir a ocorrência da cefaleia (dor de cabeça) pós-punção. Trazer exames de imagens e laboratório realizados recentemente Os exames de imagem mais importantes a se trazer são os de crânio / cabeça (como Tomografia Computadorizada ou Ressonância Magnética) Informar se está em uso de anticoagulantes. Remédios para “afinar o sangue”.

Não são conhecidos riscos à sua saúde relacionados aos procedimentos do estudo, ficando apenas o desconforto mínimo por responder aos testes e questionamentos, bem como o tempo despendido para fazer estes procedimentos. Os benefícios consistem em uma avaliação ampla de sintomas, que podem indicar doenças ou situações a serem melhor investigadas, para otimizar sua qualidade de vida. Você (participante ou responsável) poderá ter acesso aos resultados dos seus testes (ou dos testes do seu filho) e esclarecer dúvidas sobre os procedimentos, ou sobre a pesquisa, a qualquer momento.

## **DÚVIDAS**

Se você tiver alguma dúvida em relação à pesquisa, deve contatar a Dra. Ida Vanessa Doederlein Schwartz, telefone (51) 33598011, no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Além disso, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA, que aprovou este projeto, através do telefone (51) 33597640 ou localmente no segundo andar do HCPA, na rua Ramiro Barcelos, 2350, bairro Santa Cecília, Porto Alegre-RS, horário de funcionamento das 8h às 17h de segunda a sexta-feira.

### **RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO NA PARTICIPAÇÃO DO ESTUDO**

Sua participação no estudo é voluntária. Se você decidir não participar do estudo, isso não afetará em nada o seu tratamento no HCPA. A sua participação pode ser interrompida a qualquer momento por você mesmo (a). Em qualquer caso, você não será penalizado e não haverá a necessidade de justificar a sua decisão. A concordância ou a não concordância em participar não irá alterar o tratamento já estabelecido para você ou para o seu familiar.

### **CONFIDENCIALIDADE DAS INFORMAÇÕES**

As informações desta pesquisa serão mantidas em sigilo, sendo apenas utilizadas de forma científica, e sem identificação de seu nome. Caso alguma informação derivada deste estudo seja importante para você, todo esforço será realizado para informá-lo.

Pelo presente termo, você declara que foi informado(a), de forma clara e detalhada, sobre a presente pesquisa, e que teve suas dúvidas esclarecidas por \_\_\_\_\_ . Declara ter esclarecido que não receberá nenhuma remuneração financeira e que também não terá nenhum custo por participar do estudo. Declara que foi informado da garantia de receber resposta ou esclarecimento sobre a pesquisa a ser realizada, bem como da liberdade de não participar do estudo e da possibilidade de desistir, em qualquer momento, da participação. Além disso, declara que assinou duas vias deste consentimento e que uma delas ficou em seu poder.

1. Aceito participar da avaliação de sintomas pré motores da doença de Parkinson com questionários e exame físico.

SIM ( ) NÃO ( )

2. Aceito coleta de sangue para avaliação de biomarcadores de doença de Parkinson

SIM ( ) NÃO ( )

3. Aceito coleta de líquido cefalorraquidiano para avaliação de biomarcadores de doença de Parkinson

SIM ( ) NÃO ( )

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

\_\_\_\_\_

Nome do participante

Assinatura

\_\_\_\_\_

Nome do responsável (se aplicável)

Assinatura

Eu expliquei a \_\_\_\_\_ os objetivos e procedimentos necessários para esta pesquisa, e entreguei a ele (a) cópia deste termo de consentimento para este (a) pessoa.

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

\_\_\_\_\_

Nome do pesquisador

Assinatura

### APÊNDICE 3 : ANÁLISE DA FUNÇÃO OLFATIVA

Indivíduo nº \_\_\_\_\_

Avaliador: \_\_\_\_\_

Data da Avaliação \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Desempenho(acertos totais): \_\_\_\_\_ Obs \_\_\_\_\_

1       correto  incorreto \_\_\_\_\_

2       correto  incorreto \_\_\_\_\_

3       correto  incorreto \_\_\_\_\_

4       correto  incorreto \_\_\_\_\_

5       correto  incorreto \_\_\_\_\_

6       correto  incorreto \_\_\_\_\_

7       correto  incorreto \_\_\_\_\_

8       correto  incorreto \_\_\_\_\_

9       correto  incorreto \_\_\_\_\_

10      correto  incorreto \_\_\_\_\_

11      correto  incorreto \_\_\_\_\_

12      correto  incorreto \_\_\_\_\_

#### **APÊNDICE 4: ESCALA DE SONOLÊNCIA DE EPWORTH**

Marque nas seguintes situações a chance de cochilar conforme pontuação abaixo:

- 0 - Nenhuma chance de cochilar
- 1- Pequena chance de cochilar
- 2- Moderada chance de cochilar
- 3- Alta chance de cochilar

Situação

- 1- Sentado e lendo ( )
- 2-Vendo TV ( )
- 3- Sentado em um lugar público sem atividade ( )
- 4- Como passageiro de trem, carro ou ônibus andando uma hora sem parar ( )
- 5- Deitado para descansar à tarde quando as circunstâncias permitem ( )
- 6- Sentado e conversando com alguém ( )
- 7- Sentado, calmamente, após o almoço sem álcool ( )
- 8- Se estiver no carro, enquanto pára por alguns minutos no trânsito intenso.( )

## APÊNDICE 5: AVALIAÇÃO DO SONO REM.

Responda a seguinte questão com SIM ou NÃO.

Já lhe disseram, ou você já suspeitou que você parece "atuar nos sonhos enquanto você dorme (por exemplo, seus braços no ar, fazendo movimentos de corrida, etc.)?

- a.  SIM
- b.  NÃO

**APÊNDICE 6- AVALIAÇÃO DE CONSTIPAÇÃO (UMAS The Unified Multiple System Atrophy Rating Scale).**

Sobre seus hábitos intestinais marque a alternativa que mais se aplica dentre as abaixo:

- ( ) 0 - Não há mudanças no meu funcionamento intestinal quando comparado a padrões prévios.
- ( ) 1- Constipação ocasional, porém sem a necessidade do uso de medicação
- ( ) 2- Constipação frequente necessitando do uso de laxativos
- ( ) 3- Constipação crônica necessitando uso de laxativos e enemas
- ( ) 4- Não consigo ter movimento intestinal espontâneo.

## APÊNDICE 7- INVENTÁRIO DE DEPRESSÃO DE BECK

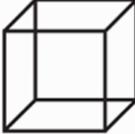
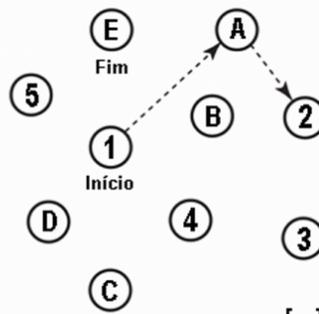
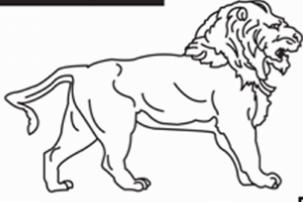
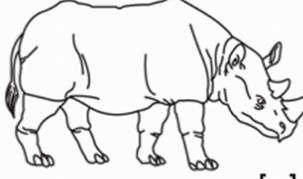
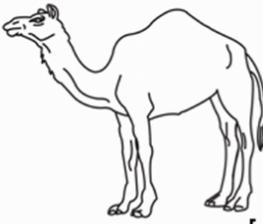
Este questionário consiste em 21 grupos de afirmações. Depois de ler cuidadosamente cada grupo, faça um círculo em torno do número (0, 1, 2 ou 3) próximo à afirmação, em cada grupo, que descreve **melhor** a maneira que você tem se sentido na **última semana, incluindo hoje**. Se várias afirmações num grupo parecerem se aplicar igualmente bem, faça um círculo em cada uma. **Tome cuidado de ler todas as afirmações, em cada grupo, antes de fazer sua escolha.**

1	0 Não me sinto triste 1 Eu me sinto triste 2 Estou sempre triste e não consigo sair disto 3 Estou tão triste ou infeliz que não consigo suportar	7	Não me sinto decepcionado comigo mesmo Estou decepcionado comigo mesmo Estou enojado de mim Eu me odeio
2	Não estou especialmente desanimado quanto ao futuro 1 Eu me sinto desanimado quanto ao futuro 2 Acho que nada tenho a esperar Acho o futuro sem esperanças e tenho a impressão de que as coisas não podem melhorar	8	0 Não me sinto de qualquer modo pior que os outros Sou crítico em relação a mim por minhas fraquezas ou erros Eu me culpo sempre por minhas falhas Eu me culpo por tudo de mal que acontece
3	Não me sinto um fracasso Acho que fracassei mais do que uma pessoa comum Quando olho pra trás, na minha vida, tudo o que posso ver é um monte de fracassos Acho que, como pessoa, sou um completo fracasso	9	0 Não tenho quaisquer idéias de me matar 1 Tenho idéias de me matar, mas não as executaria 2 Gostaria de me matar 3 Eu me mataria se tivesse oportunidade
4	Tenho tanto prazer em tudo como antes Não sinto mais prazer nas coisas como antes Não encontro um prazer real em mais nada Estou insatisfeito ou aborrecido com tudo	10	0 Não choro mais que o habitual 1 Choro mais agora do que costumava 2 Agora, choro o tempo todo Costumava ser capaz de chorar, mas agora não consigo, mesmo que o queria
5	Não me sinto especialmente culpado Eu me sinto culpado grande parte do tempo Eu me sinto culpado na maior parte do tempo Eu me sinto sempre culpado	11	0 Não sou mais irritado agora do que já fui Fico aborrecido ou irritado mais facilmente do que costumava 2 Agora, eu me sinto irritado o tempo todo Não me irrita mais com coisas que costumavam me irritar
6	Não acho que esteja sendo punido Acho que posso ser punido Creio que vou ser punido Acho que estou sendo punido	12	0 Não perdi o interesse pelas outras pessoas Estou menos interessado pelas outras pessoas do que costumava estar Perdi a maior parte do meu interesse pelas outras pessoas 3 Perdi todo o interesse pelas outras pessoas
13	0 Tomo decisões tão bem quanto antes Adio as tomadas de decisões mais do que costumava Tenho mais dificuldades de tomar decisões do que antes Absolutamente não consigo mais tomar decisões	18	O meu apetite não está pior do que o habitual Meu apetite não é tão bom como costumava ser Meu apetite é muito pior agora Absolutamente não tenho mais apetite

<p><b>14</b></p>	<p>Não acho que de qualquer modo pareço pior do que antes</p> <p>Estou preocupado em estar parecendo velho ou sem atrativo</p> <p>Acho que há mudanças permanentes na minha aparência, que me fazem parecer sem atrativo</p> <p>3 Acredito que pareço feio</p>	<p><b>19</b></p>	<p>Não tenho perdido muito peso se é que perdi algum recentemente</p> <p>1 Perdi mais do que 2 quilos e meio</p> <p>2 Perdi mais do que 5 quilos</p> <p>3 Perdi mais do que 7 quilos</p> <p>Estou tentando perder peso de propósito, comendo menos: Sim _____ Não _____</p>
<p><b>15</b></p>	<p>0 Posso trabalhar tão bem quanto antes</p> <p>É preciso algum esforço extra para fazer alguma coisa</p> <p>Tenho que me esforçar muito para fazer alguma coisa</p> <p>3 Não consigo mais fazer qualquer trabalho</p>	<p><b>20</b></p>	<p>Não estou mais preocupado com a minha saúde do que o habitual</p> <p>Estou preocupado com problemas físicos, tais como dores, indisposição do estômago ou constipação</p> <p>Estou muito preocupado com problemas físicos e é difícil pensar em outra coisa</p> <p>Estou tão preocupado com meus problemas físicos que não consigo pensar em qualquer outra coisa</p>
<p><b>16</b></p>	<p>0 Consigo dormir tão bem como o habitual</p> <p>1 Não durmo tão bem como costumava</p> <p>Acordo 1 a 2 horas mais cedo do que habitualmente e acho difícil voltar a dormir</p> <p>Acordo várias horas mais cedo do que costumava e não consigo voltar a dormir</p>	<p><b>21</b></p>	<p>Não notei qualquer mudança recente no meu interesse por sexo</p> <p>Estou menos interessado por sexo do que costumava</p> <p>2 Estou muito menos interessado por sexo agora</p> <p>3 Perdi completamente o interesse por sexo</p>
<p><b>17</b></p>	<p>Não fico mais cansado do que o habitual</p> <p>Fico cansado mais facilmente do que costumava</p> <p>Fico cansado em fazer qualquer coisa</p> <p>Estou cansado demais para fazer qualquer coisa</p>		

# APÊNDICE 8 – MONTREAL COGNITIVE ASSESSMENT (MoCa)

MONTREAL COGNITIVE ASSESSMENT (MOCA) Nome: \_\_\_\_\_ Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
 Versão Experimental Brasileira Escolaridade: \_\_\_\_\_ Data de avaliação: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
 Sexo: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

<b>VISUOESPACIAL / EXECUTIVA</b>		 Copiar o cubo		Desenhar um RELÓGIO (onze horas e dez minutos) (3 pontos)		Pontos			
 [ ] [ ]		[ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ]		[ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ]		_/5			
<b>NOMEAÇÃO</b>									
 [ ]		 [ ]		 [ ]		_/3			
<b>MEMÓRIA</b>		Leia a lista de palavras, O sujeito de repeti-la, faça duas tentativas Evocar após 5 minutos		Rosto	Veludo	Igreja	Margarida	Vermelho	Sem Pontuação
		1ª tentativa							
		2ª tentativa							
<b>ATENÇÃO</b>		Leia a seqüência de números (1 número por segundo)		O sujeito deve repetir a seqüência em ordem direta [ ] 2 1 8 5 4		O sujeito deve repetir a seqüência em ordem indireta [ ] 7 4 2		_/2	
		Leia a série de letras. O sujeito deve bater com a mão (na mesa) cada vez que ouvir a letra "A". Não se atribuem pontos se ≥ 2 erros.		[ ] F B A C M N A A J K L B A F A K D E A A A J A M O F A A B				_/1	
		Subtração de 7 começando pelo 100 [ ] 93 [ ] 86 [ ] 79 [ ] 72 [ ] 65		4 ou 5 subtrações corretas: 3 pontos; 2 ou 3 corretas 2 pontos; 1 correta 1 ponto; 0 correta 0 ponto				_/3	
<b>LINGUAGEM</b>		Repetir: Eu somente sei que é João quem será ajudado hoje. [ ]		O gato sempre se esconde embaixo do Sofá quando o cachorro está na sala. [ ]				_/2	
		Fluência verbal: dizer o maior número possível de palavras que comecem pela letra F (1 minuto). [ ] _____ (N ≥ 11 palavras)						_/1	
<b>ABSTRAÇÃO</b>		Semelhança p. ex. entre banana e laranja = fruta [ ] trem - bicicleta [ ] relógio - régua						_/2	
<b>EVOCAÇÃO TARDIA</b>		Deve recordar as palavras SEM PISTAS		Rosto	Veludo	Igreja	Margarida	Vermelho	Pontuação apenas para evocação SEM PISTAS
		Pista de categoria							
		Pista de múltipla escolha							
<b>ORIENTAÇÃO</b>		[ ] Dia do mês [ ] Mês [ ] Ano [ ] Dia da semana [ ] Lugar [ ] Cidade						_/6	
		© Z. Nasreddine MD www.mocatest.org Versão experimental Brasileira: Ana Luisa Rosas Sarmiento Paulo Henrique Ferreira Bertolucci - José Roberto Wajzman		TOTAL Adicionar 1 pt se ≤ 12 anos de escolaridade				_/30	

(UNIFESP-SP 2007)

## APÊNDICE 9 – PARTE III da UPDRS

### **III. EXAME MOTOR**

1. fala  
0= normal.  
  
1= perda discreta da expressão, volume ou dicção.  
  
2= comprometimento moderado. Arrastado, monótono mas compreensível.  
  
3= comprometimento grave, difícil de ser entendido.  
  
4= incompreensível.
2. expressão facial  
0= normal.  
  
1= hipomimia mínima.  
  
2= diminuição pequena, mas anormal, da expressão facial.  
  
3= hipomimia moderada, lábios caídos/afastados por algum tempo.  
  
4= fâcias em máscara ou fixa, com perda grave ou total da expressão facial. Lábios afastados ¼ de polegada ou mais.
3. tremor de repouso  
0= ausente.  
  
1= presente mas infrequente ou leve.  
  
2= persistente mas de pouca amplitude, ou moderado em amplitude mas presente de maneira intermitente.  
  
3= moderado em amplitude mas presente a maior parte do tempo.  
  
4= com grande amplitude e presente a maior parte do tempo.
4. tremor postural ou de ação nas mãos  
0= ausente  
  
1= leve, presente com a ação.  
  
2= moderado em amplitude, presente com a ação.  
  
3= moderado em amplitude tanto na ação quanto mantendo a postura.  
  
4= grande amplitude, interferindo com a alimentação.
5. rigidez (movimento passivo das grandes articulações, com paciente sentado e relaxado, ignorar roda denteada)  
0= ausente  
  
1= pequena ou detectável somente quando ativado por movimentos em espelho de outros.

- 2= leve e moderado.
- 3= marcante, mas pode realizar o movimento completo da articulação.
- 4= grave e o movimento completo da articulação só ocorre com grande dificuldade.
6. bater dedos continuamente – polegar no indicador em sequências rápidas com a maior amplitude possível, uma mão de cada vez.
- 0= normal
- 1= leve lentidão e/ou redução da amplitude.
- 2= comprometimento moderado. Fadiga precoce e bem clara. Pode apresentar parada ocasional durante o movimento.
- 3= comprometimento grave. Hesitação frequente para iniciar o movimento ou paradas durante o movimento que está realizando.
- 4= realiza o teste com grande dificuldade, quase não conseguindo.
7. movimentos das mãos (abrir e fechar as mãos em movimentos rápidos e sucessivos e com a maior amplitude possível, uma mão de cada vez).
- 0= normal
- 1= leve lentidão e/ou redução da amplitude.
- 2= comprometimento moderado. Fadiga precoce e bem clara. Pode apresentar parada ocasional durante o movimento.
- 3= comprometimento grave. Hesitação frequente para iniciar o movimento ou paradas durante o movimento que está realizando.
- 4= realiza o teste com grande dificuldade, quase não conseguindo.
8. movimentos rápidos alternados das mãos (pronação e supinação das mãos, horizontal ou verticalmente, com a maior amplitude possível, as duas mãos simultaneamente).
- 0= normal
- 1= leve lentidão e/ou redução da amplitude.
- 2= comprometimento moderado. Fadiga precoce e bem clara. Pode apresentar parada ocasional durante o movimento.
- 3= comprometimento grave. Hesitação frequente para iniciar o movimento ou paradas durante o movimento que está realizando.
- 4= realiza o teste com grande dificuldade, quase não conseguindo.
9. agilidade da perna (bater o calcanhar no chão em sucessões rápidas, levantando toda a perna, a amplitude do movimento deve ser de cerca de 3 polegadas/  $\pm 7,5$  cm).

0= normal

1= leve lentidão e/ou redução da amplitude.

2= comprometimento moderado. Fadiga precoce e bem clara. Pode apresentar parada ocasional durante o movimento.

3= comprometimento grave. Hesitação frequente para iniciar o movimento ou paradas durante o movimento que está realizando.

4= realiza o teste com grande dificuldade, quase não conseguindo.

10. levantar da cadeira (de espaldar reto, madeira ou ferro, com braços cruzados em frente ao peito).

0= normal

1= lento ou pode precisar de mais de uma tentativa

2= levanta-se apoiando nos braços da cadeira.

3= tende a cair para trás, pode tentar se levantar mais de uma vez, mas consegue levantar

4= incapaz de levantar-se sem ajuda.

11. postura

0= normal em posição ereta.

1= não bem ereto, levemente curvado para frente, pode ser normal para pessoas mais velhas.

2= moderadamente curvado para frente, definitivamente anormal, pode inclinar-se um pouco para os lados.

3= acentuadamente curvado para frente com cifose, inclinação moderada para um dos lados.

4= bem fletido com anormalidade acentuada da postura.

12. marcha

0= normal

1= anda lentamente, pode arrastar os pés com pequenas passadas, mas não há festinação ou propulsão.

2= anda com dificuldade, mas precisa de pouca ajuda ou nenhuma, pode apresentar alguma festinação, passos curtos, ou propulsão.

3= comprometimento grave da marcha, necessitando de ajuda.

4= não consegue andar sozinho, mesmo com ajuda.

13. estabilidade postural (respostas ao deslocamento súbito para trás, puxando os ombros, com paciente ereto, de olhos abertos, pés separados, informado a respeito do teste)
- 0= normal
  - 1= Retropulsão, mas se recupera sem ajuda.
  - 2= ausência de respostas posturais, cairia se não fosse auxiliado pelo examinador.
  - 3= muito instável, perde o equilíbrio espontaneamente.
  - 4= incapaz de ficar ereto sem ajuda.
14. bradicinesia e hipocinesia corporal (combinação de hesitação, diminuição do balançar dos braços, pobreza e pequena amplitude de movimentos em geral)
- 0= nenhum.
  - 1= lentidão mínima. Podia ser normal em algumas pessoas. Possível redução na amplitude.
  - 2= movimento definitivamente anormal. Pobreza de movimento e um certo grau de lentidão.
  - 3= lentidão moderada. Pobreza de movimento ou com pequena amplitude.
  - 4= lentidão acentuada. Pobreza de movimento ou com pequena amplitude.

## APÊNDICE 10—STROBE Statement – Checklist para estudos observacionais

STROBE Statement—Checklist of items that should be included in reports of *cross-sectional studies*

	Item No	Recommendation
<b>Title and abstract</b>	1	(a) Indicate the study's design with a commonly used term in the title or the abstract <b>Pág. 6</b> (b) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found <b>Pág. 6</b>
<b>Introduction</b>		
Background/rationale	2	Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported <b>Pág. 17-78</b>
Objectives	3	State specific objectives, including any prespecified hypotheses <b>Pág.86</b>
<b>Methods</b>		
Study design	4	Present key elements of study design early in the paper <b>Pág.86</b>
Setting	5	Describe the setting, locations, and relevant dates, including periods of recruitment, exposure, follow-up, and data collection <b>Pág.86</b>
Participants	6	(a) <i>Cohort study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants. Describe methods of follow-up <i>Case-control study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of case ascertainment and control selection. Give the rationale for the choice of cases and controls <i>Cross-sectional study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants <b>Pág.87</b> (b) <i>Cohort study</i> —For matched studies, give matching criteria and number of exposed and unexposed <i>Case-control study</i> —For matched studies, give matching criteria and the number of controls per case N/A
Variables	7	Clearly define all outcomes, exposures, predictors, potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable up <b>Pág.87</b>
Data sources/ measurement	8*	For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe comparability of assessment methods if there is more than one group up <b>Pág.87-89</b>
Bias	9	Describe any efforts to address potential sources of bias <b>Pág.86</b>
Study size	10	Explain how the study size was arrived at <b>Pág.86</b>
Quantitative variables	11	Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen and why <b>Pág.88</b>
Statistical methods	12	(a) Describe all statistical methods, including those used to control for confounding <b>Pág.138</b> (b) Describe any methods used to examine subgroups and interactions <b>Pág.138</b> (c) Explain how missing data were addressed <b>Pág.138</b> (d) <i>Cohort study</i> —If applicable, explain how loss to follow-up was addressed <i>Case-control study</i> —If applicable, explain how matching of cases and controls was addressed <i>Cross-sectional study</i> —If applicable, describe analytical methods taking account of sampling strategy N/A (e) Describe any sensitivity analyses

Continued on next page

<b>Results</b>		
Participants	13*	(a) Report numbers of individuals at each stage of study—eg numbers potentially eligible, examined for eligibility, confirmed eligible, included in the study, completing follow-up, and analysed <b>Pág.106</b> (b) Give reasons for non-participation at each stage <b>Pág.106</b> (c) Consider use of a flow diagram <b>Pág.106</b>
Descriptive data	14*	(a) Give characteristics of study participants (eg demographic, clinical, social) and information on exposures and potential confounders <b>Pág.107, 114 e 115</b> (b) Indicate number of participants with missing data for each variable of interest <b>Pág.107,</b> (c) <i>Cohort study</i> —Summarise follow-up time (eg, average and total amount) <b>Pág.105,</b>
Outcome data	15*	<i>Cohort study</i> —Report numbers of outcome events or summary measures over time <i>Case-control study</i> —Report numbers in each exposure category, or summary measures of exposure <i>Cross-sectional study</i> —Report numbers of outcome events or summary measures <b>Pág.115,</b>
Main results	16	(a) Give unadjusted estimates and, if applicable, confounder-adjusted estimates and their precision (eg, 95% confidence interval). Make clear which confounders were adjusted for and why they were included <b>Pág.138-141</b> (b) Report category boundaries when continuous variables were categorized <b>Pág.138-141</b> (c) If relevant, consider translating estimates of relative risk into absolute risk for a meaningful time period <b>Pág.138-141</b>
Other analyses	17	Report other analyses done—eg analyses of subgroups and interactions, and sensitivity analyses
<b>Discussion</b>		
Key results	18	Summarise key results with reference to study objectives <b>Pág.129 e 108</b>
Limitations	19	Discuss limitations of the study, taking into account sources of potential bias or imprecision. Discuss both direction and magnitude of any potential bias <b>Pág.110</b>
Interpretation	20	Give a cautious overall interpretation of results considering objectives, limitations, multiplicity of analyses, results from similar studies, and other relevant evidence <b>Pág.138-141</b>
Generalisability	21	Discuss the generalisability (external validity) of the study results <b>Pág.112</b>
<b>Other information</b>		
Funding	22	Give the source of funding and the role of the funders for the present study and, if applicable, for the original study on which the present article is based <b>Pág.16,117 e 137</b>

\*Give information separately for cases and controls in case-control studies and, if applicable, for exposed and unexposed groups in cohort and cross-sectional studies.

**Note:** An Explanation and Elaboration article discusses each checklist item and gives methodological background and published examples of transparent reporting. The STROBE checklist is best used in conjunction with this article (freely available on the Web sites of PLoS Medicine at <http://www.plosmedicine.org/>, Annals of Internal Medicine at <http://www.annals.org/>, and Epidemiology at <http://www.epidem.com/>). Information on the STROBE Initiative is available at [www.strobe-statement.org](http://www.strobe-statement.org).