

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

**ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DA β -GLICOSIDASE
HUMANA EM INDIVÍDUOS HOMOZIGOTOS E HETEROZIGOTOS PARA
DOENÇA DE GAUCHER COM MUTAÇÕES PRÉ-DETERMINADAS:
COMPARAÇÃO COM INDIVÍDUOS NORMAIS**

Tese de Doutorado

Kristiane Michelin-Tirelli

Porto Alegre

2005

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

**ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DA β -GLICOSIDASE
HUMANA EM INDIVÍDUOS HOMOZIGOTOS E HETEROZIGOTOS PARA
DOENÇA DE GAUCHER COM MUTAÇÕES PRÉ-DETERMINADAS:
COMPARAÇÃO COM INDIVÍDUOS NORMAIS**

Kristiane Michelin-Tirelli

Orientadora Janice Carneiro Coelho

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação
em Ciências Biológicas: Bioquímica –
Universidade Federal do rio Grande do Sul –
como parte dos requisitos para a obtenção do
título de Doutora em Bioquímica

DEDICATÓRIA

Ao Ernani e Henrique, meus amores.

AGRADECIMENTOS

À Janice, minha orientadora, uma pessoa na qual tenho o privilégio de conviver diariamente. Tenho uma grande admiração pela sua competência, dinamismo, organização e o dom de tornar tudo mais simples e prático. Agradeço pela amizade, constante incentivo, compreensão, otimismo e entusiasmo em cada etapa concluída. Certamente uma pessoa muito especial.

Ao Roberto Giugliani, chefe do Serviço de Genética Médica, pelas oportunidades de crescimento profissional.

À Maira Burin, bioquímica responsável pelo Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo, pela oportunidade, confiança, ensinamentos, conselhos e a boa convivência diária.

À Maria Luiza Pereira, bioquímica responsável pela análise molecular dos pacientes com Doença de Gaucher, pela importante participação em todas as etapas deste estudo.

Ao Alessandro Wajner por me auxiliar nos experimentos com muita seriedade e competência. Consolidamos uma grande e bonita amizade nestes anos de convivência.

À Angela Fachel e Hugo Bock pelo auxílio nos dados moleculares deste estudo.

À Elisa Sobreira, médica da Santa Casa de São Paulo, colaboradora do International Collaborative Gaucher Group (ICGG) e responsável pelos pacientes com Doença de Gaucher na região sudeste, agradeço pelas informações fornecidas.

Ao Ricardo Flores Pires, médico geneticista, colaborador do International Collaborative Gaucher Group (ICGG) e responsável pelos pacientes com Doença de Gaucher na região sul agradeço a importante ajuda, sugestões e ensinamentos.

A todos os médicos colaboradores que participaram deste estudo multicêntrico.

Ao Roberto Rozenberg, pesquisador da USP, pela importante colaboração nos dados moleculares e pela troca de conhecimentos.

Aos pacientes e familiares pela colaboração, sem os quais não seria possível a realização deste estudo.

Aos meus colegas e companheiros de laboratório (Juarez, Régis, Marilyn, Marli, Ana Paula Beheregaray, Jurema, Marilda) pelo apoio e agradável convivência sempre com muito bom humor, descontração, alegria e aprendizado.

À Fernanda Timm Seabra Souza pelo apoio, carinho, amizade e incentivo.

À Maria Viviane, pela importante ajuda nos dados bibliográficos e pelo apoio no dia-a-dia.

À Equipe da Genzyme do Brasil, pelo suporte, incentivo e oportunidades essenciais para meu crescimento profissional.

À Zeniara, Fabrízio, Jacira, Valdenize, Célio e Karine pelas inúmeras gentilezas e o carinho cultivados nestes anos.

À todos os colegas do Serviço de Genética Médica do HCPA, pela cooperação e convívio no dia-a-dia.

À Cléia, secretária do Curso de Pós-graduação, pela constante paciência e solicitude.

Ao meu pai pelo exemplo de homem de caráter, honesto e íntegro, sempre colocando a família como o plano mais importante da sua vida. **À** minha mãe, mulher doce e batalhadora, uma guerreira que não permite se abater e desistir mesmo nos piores momentos da sua vida. São meus exemplos de vida, seres maravilhosos com amor e dedicação incondicionais. Seus ensinamentos ajudaram a moldar a minha personalidade.

Ao meu irmão Leandro, pela presença e companheirismo em momentos tão importantes de nossas vidas.

A minha irmã Josiane, pelo carinho de sempre e por ter provado como é importante lutar pela vida em momentos muito delicados e difíceis.

À Annita, Lilian e Elizabeth pela companhia do dia-a-dia, pelo carinho, atenção e por cuidarem com muito amor e dedicação do meu filho.

A todos que colaboraram de uma forma direta ou indiretamente para a realização desta tese de doutorado, e ao mesmo tempo, para o meu aperfeiçoamento profissional e emocional.

Estes anos de pesquisas, estudos, buscas e descobertas caminharam paralelamente com os mais diversos acontecimentos em minha vida. Os acontecimentos sejam eles de extrema felicidade ou de extrema aflição, sempre nos trazem ensinamentos e crescimento. A luta pela sobrevivência de minha irmã, nos mostrou a importância da união, do amor incondicional e da solidariedade de tantas pessoas. A garra, coragem e o otimismo dos meus pais ficarão para sempre como meu legado de obstinação e busca. Hoje, a batalha ainda continua, mas conseguimos trazer alegria e leveza às nossas vidas com a chegada do meu filho. A maternidade é sem dúvida um “experimento” mágico que traz sentido à vida. Em todos estes momentos pude contar com a presença do Ernani, meu incansável incentivador, companheiro, amigo, conselheiro de todas as horas, meu amor que demonstra nos pequenos detalhes do dia-a-dia o quanto nossa união é bela.

SUMÁRIO

Agradecimentos	IV
Lista de Abreviaturas e Siglas	VIII
Lista de Tabelas e Figuras	X
Resumo	XI
Abstract	XII
I. Introdução	1
I.1. Doenças genéticas – Erros Inatos do Metabolismo	2
I.2. As doenças lisossômicas	3
I.2.1. As enzimas lisossômicas	4
I.3. As esfingolipidoses	5
I.3.1. Os glicosfingolipídios	5
I.3.1.1. Biossíntese e catabolismo dos GELs	6
I.3.2. As saposinas	10
I.3.3. As esfingolipidoses são doenças lisossômicas	12
I.3.4. Tratamento para as esfingolipidoses	13
I.3.5. Doença de Gaucher (DG): a glicosfingolipidose mais comum	14
I.3.5.1. Um pouco da história	14
I.3.5.2. Características, bases bioquímica e molecular da DG	15
I.3.5.3. Diagnóstico laboratorial para DG	25
I.3.5.4. Biomarcadores auxiliares no diagnóstico laboratorial para DG	26
I.3.5.4.1. Quitotriosidase	26
I.3.5.4.2. Quemoquina CCL18/PARC	27
I.3.5.5. Tratamento para DG	28
II. Objetivos	34
III. Capítulo 1 – Artigo 1	36

IV. Capítulo 2 – Artigo 2	43
V. Discussão	54
V.1.Detecção da DG em pacientes de alto risco	55
V.2.Sensibilidade e eficácia do método enzimático para detecção da DG.....	56
V.3.Quitotriosidase: o biomarcador de escolha no diagnóstico laboratorial para DG.....	58
V.4.Análise das mutações.....	59
V.4.1. Fenótipo = genótipo + ambiente	60
V.4.2. Correlação genótipo – fenótipo.....	61
a)Correlação genótipo – pH ótimo da β -gli.....	62
b)Correlação genótipo – Km/Vmax da β -gli.....	63
c)Correlação genótipo – termoestabilidade da β -gli.....	65
d)Correlação genótipo – fenótipo – estabilidade da β -gli.....	67
V.5.Considerações finais.....	68
VI. Conclusões	69
VII. Referências Bibliográficas	73
VIII. Anexos	96
Anexo 1: Termo de consentimento livre e esclarecido	97
Anexo 2: Ficha de solicitação de investigação laboratorial para DG.....	98
Anexo 3:Informações sobre coleta e envio de material biológico	99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A: base adenina

β -gli: β -glicosidase

C: base citosina

Cer: ceramida

DG: doença de Gaucher

DL: doença lisossômica

EC: enzyme classification (classificação das enzimas)

ECA: enzima conversora da angiotensina

EIM: Erros Inatos do Metabolismo

G: base guanina

Gal: galactose

Gal-Cer: galactosilceramida

Gal-Glc-Cer: lactosilceramida

GalNac: N-acetilgalactosamina

Glc: glicose

Glc-Cer: glicosilceramida

GlcNac: N-acetilglicosamina

GELs: glicoesfingolipídios

GM1: monosialogangliosídeo 1

GM2: monosialogangliosídeo 2

GM3: monosialogangliosídeo 3

L-Fuc: fucose

LAMP: proteína de membrana associada a lisossomo

Man: manose

M6P: manose-6-fosfato

NB-DNJ: N-butildeoxinojirimicin

Neu Ac: ácido N-acetil neuramínico ou ácido siálico

OMS: Organização Mundial da Saúde

PARC: Pulmonary and activation – regulated chemokine

PCR: reação em cadeia de polimerase

QT: quitotriosidase

RER: retículo endoplasmático rugoso

SAP: saposinas

SAP A: saposina A

SAP B: saposina B

SAP C: saposina C

SAP D: saposina D

SNC: Sistema Nervoso Central

T: base timina

TG: terapia gênica

TMO: transplante de medula óssea

TRE: terapia de reposição enzimática

TRS: terapia de redução do substrato

TRAP: fosfatase ácida tartarato resistente

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabelas

Tabela 1: A DG é dividida em 3 tipos baseados nos sinais clínicos e especialmente na presença e progresso dos sintomas neurológicos.....	19
Tabela 2: Os alelos das mutações da β -gli na DG e suas correlações genótipo-fenótipo.....	24

Figuras

Figura 1: Biossíntese dos GELs.....	8
Figura 2: Catabolismo dos GELs.....	9
Figura 3: Decomposição do glicocerebrosídeo.....	16
Figura 4A: Seqüência de parte do gene da β -gli.....	21
Figura 4B: A síntese protéica.....	22
Figura 5: Estrutura tridimensional da β -glicosidase humana.....	23
Figura 6: A Quitotriosidase	26
Figura 7: A enzima β -gli humana e a enzima modificada.....	29
Figura 8: As duas formas de tratamento para DG.....	32

RESUMO

A Doença de Gaucher (DG) é a doença de depósito mais comum. É causada pela deficiência da enzima β -glicosidase (β -gli), necessária para o catabolismo intralisossômico do glicocerebrosídeo, sendo herdada de modo autossômico recessivo. Esta deficiência resulta em um acúmulo de glicocerebrosídeo nos lisossomos de macrófagos derivados de monócitos em tecidos do sistema reticuloendotelial.

No período de janeiro de 1982 a outubro de 2003 foram analisadas, bioquimicamente, 1081 amostras de sangue de pacientes com suspeita de DG. Nestas amostras foram medidas as atividades das enzimas β -gli e quitotriosidase (QT). Foram diagnosticados 412 casos de DG (38,1%), sendo na sua grande maioria DG tipo 1. As regiões brasileiras de maior concentração destes pacientes foram as regiões sudeste, sul e nordeste. A idade média destes pacientes ao diagnóstico foi de 19 anos. A atividade da β -gli de indivíduos com DG foi em média 10,7% daquela apresentada pelos indivíduos normais. A QT apresentou-se em média 269 vezes mais elevada no grupo de pacientes com DG.

Nos 669 casos em que não foi confirmada a presença de DG, houve pacientes com Doença de Niemann-Pick tipos A, B ou C (44 casos), possíveis heterozigotos para DG (59 casos), pacientes com outras DL (19 casos) e outros EIM (3 casos). Em 508 casos não foi encontrado nenhum distúrbio metabólico. Foram analisadas as mutações de 128 indivíduos com DG, sendo que o genótipo N370S/L444P foi o mais freqüente (48,4%). Este estudo mostra que o protocolo bioquímico empregado foi eficiente para a detecção de DG, uma doença que se mostra bastante freqüente também no Brasil.

Neste estudo também foi possível caracterizar o comportamento do pH ótimo, termoestabilidade, K_m e V_{max} da β -gli em leucócitos de pacientes com DG e heterozigotos obrigatórios com diferentes genótipos comparando-os com indivíduos normais. Os resultados mostraram um comportamento diferente da enzima nos três grupos analisados. Esse comportamento variou conforme a mutação presente nos indivíduos. Não foi observado somente um único pH ótimo nos 3 grupos. A enzima de indivíduos normais mostrou uma faixa de pH de 5,0 a 5,4, a de heterozigotos, um único pH ou uma estreita faixa e a de indivíduos com DG, 2 picos de pH ótimo. O K_m e a V_{max} da enzima de heterozigotos variou desde igual até maior que aquele da enzima normal. Quando comparamos a enzima de indivíduos normais com aquela de pacientes com DG, observamos que nos genótipos N370S/N370S e N370S/IVS2+1 o K_m foi maior e no grupo N370S/L444P o K_m foi significativamente menor. A V_{max} nos indivíduos com DG apresentou valores menores em relação aos indivíduos normais. A enzima de leucócitos de indivíduos normais, heterozigotos e homozigotos para DG, foi inativada a 60°C. As diferenças de comportamento entre as enzimas dos três grupos analisados permitiram discriminá-los, ou seja, a enzima de indivíduos homozigotos apresentou uma maior atividade residual após 60 minutos de pré-incubação, sendo mais termoestável que os grupos de indivíduos normais e heterozigotos.

A mutação N370S produziu uma enzima mais estável e cataliticamente mais ativa que aquela da mutação L444P. Esta por sua vez, foi mais estável e ativa do que a mutação D409H. O mesmo aconteceu com os indivíduos homozigotos para DG, onde o comportamento bioquímico da β -gli foi determinado pela presença do alelo N370S. Portanto há um gradiente de estabilidade que vai de uma condição mais estável a uma condição menos estável. Este gradiente assemelha-se aquele da classificação do fenótipo clínico da DG. Os resultados nos permitem correlacionar diretamente a mutação N370S, mais estável cineticamente, com a forma clínica não neurológica da doença e a mutação menos estável cataliticamente (D409H) com a forma clínica neurológica da DG.

Através deste trabalho foi possível obter informações sobre o comportamento da proteína em cada mutação estudada, seja ela em homo ou em heterozigose e estes dados podem colaborar para uma melhor distinção entre a enzima de indivíduos normais, heterozigotos e homozigotos para DG.

ABSTRACT

Gaucher's disease (GD) is the most common storage disease. It is caused by the deficiency of enzyme β -glucosidase (β -glu), which is necessary for the intralysosomal catabolism of glycosphingolipids, and is inherited through the autosomal recessive path. This deficiency results in an accumulation of glycosphingolipids in the lysosomes of macrophages derived from monocytes in tissue from the reticuloendothelial system.

In the period from January 1982 to October 2003, 1081 blood samples from patients with suspected GD were analysed. In these samples, β -glu and chitotriosidase (QT) activities were measured. Four hundred and twelve (412) cases of GD were diagnosed (38.1%), the great majority of which were GD type 1. The regions of Brazil with the highest concentrations of these patients were Southeast, South and Northeast regions. The average age of the patients when diagnosed was 19 years. The β -glu activity in individuals with GD was, on average, 10.7% that of presented in normal individuals. QT was shown to be, on average 269 times higher in the group of patients with GD.

In the 669 cases in which the presence of GD was not confirmed, there were patients with types A, B or C of Niemann-Pick disease (44 cases), possible heterozygotes for GD (50 cases), patients with other lysosomal disorders (19 cases) and another IEM (3 cases). In 508 cases no metabolic disturbance was found. The mutations of 128 individuals with GD were analysed, and the N370S/L444P genotype was the most frequent (48.4%). This study shows that the biochemical protocol used was efficient in the detection of GD, a disease that is relatively common in Brazil.

This study also permitted the characterisation of the behaviour of the optimum pH, thermal stability, K_m and V_{max} of the β -glu from patients with GD and obligatory heterozygotes with different genotypes in comparison with normal individuals. The results showed different enzyme behaviour in the three groups analysed. This behaviour varied in relation to the mutation present in the individuals. No single optimum pH was seen in the 3 groups. The enzyme of normal individuals exhibited a pH range from 5.0 to 5.4, that of heterozygotes, a single pH or narrow range, and that of individuals with GD, 2 optimum pH peaks. The K_m and V_{max} of the enzyme from heterozygotes varied from equal to till greater than that of the normal enzyme. When we compared the enzyme from normal individuals with that from patients with GD, we noted that in the N370S/N370S and N370S/IVS2+1 genotypes, the K_m was significantly greater and in the N370S/L444P group the K_m was significantly lower. Individuals with GD had lower V_{max} values than normal individuals. The enzyme from leukocytes of normal individuals, heterozygotes and homozygotes for GD, were inactivated at 60°C. The behavioural differences between the enzymes from the three groups analysed permitted them to be discriminated, that is, the enzyme from homozygous individuals presented higher residual activity after 60 minutes of pre-incubation, being more thermo-stable than those of normal and heterozygous individuals.

The mutation N703S produced a more stable and catalytically more active enzyme than that of the L444P mutation, which was, in turn, more stable and active than that of the D409H mutation. The same occurred with homozygotes for GD, where the biochemical behaviour of β -glu was determined by the presence of N370S allele. Therefore, there is a gradient of stability that ranges from a more stable condition to a less stable condition. This gradient is similar to that of the clinical phenotype classification of GD. The results allow us to directly compare the N370S mutation, kinetically more stable, with clinical non-neurological form of the disease and the less catalytically stable mutation (D409H) with the clinical neurological form of the GD.

Through this study it was possible to obtain information on the behaviour of the protein in each mutation studied, be it in homo or heterozygotes and this data can be of use in enhancing the distinction between the enzymes of normal individuals and heterozygotes and homozygotes for GD.

I. INTRODUÇÃO

I.1. Doenças genéticas – Erros Inatos do Metabolismo

A genética médica, que há muito tempo era considerada um tema obscuro, hoje permeia praticamente todo o ramo da medicina. Embora a genética clássica freqüentemente fosse vista como apenas um catálogo de síndromes e distúrbios raros, a “nova genética” proporcionou a compreensão destes distúrbios e em muitos casos o seu tratamento. Grande parte do progresso em genética médica resultou da aplicação de técnicas de recombinação de DNA, e todos estes avanços não seriam possíveis sem o amplo conhecimento bioquímico, suas rotas de biossíntese e degradação.

As doenças genéticas, embora raras se analisadas individualmente, tornam-se relativamente freqüentes em seu conjunto se somarmos a incidência de traços gênicos, anomalias cromossômicas e doenças multifatoriais [Pollitt et al., 1997].

Os Erros Inatos do metabolismo (EIM), um ramo da genética, são definidos como doenças causadas por bloqueio em uma ou mais vias metabólicas, afetando seu funcionamento normal. As alterações ocorrem ao nível molecular, causando a ausência de síntese de uma enzima, síntese de uma enzima funcionalmente deficiente, ou ainda, a destruição de uma enzima normalmente sintetizada. Os EIM, freqüentemente apresentam variabilidade clínica (formas leves, moderadas ou graves em uma mesma doença) e, ocasionalmente, heterogeneidade genética, ou seja, deficiência de diferentes enzimas determinando o mesmo quadro clínico [Pollitt et al., 1997; Gimenez-Sanchez et al., 2000].

Segundo Wapper (1993), os EIM são na sua grande maioria, de herança autossômica recessiva, com risco de 25% a cada gestação de pais heterozigotos. Alguns possuem herança ligada ao X, sendo o risco de recorrência de 50% a cada gestação para o sexo masculino e de 50% das filhas serem portadoras. A incidência dos EIM é rara, mas quando em conjunto chegam a 1 caso para cada 1000 nascidos vivos [Nowacki et al., 1997, Giugliani, 1997].

I.2. As doenças lisossômicas

O estudo das vias degradativas dos EIM é muito importante, pelo menos para aproximadamente 40 doenças deste grupo, conhecidas como Doenças Lisossômicas (DL). A maioria destas desordens ocorre devido a vários fatores entre eles a deficiência enzimática lisossomal levando ao acúmulo de substrato, transporte insuficiente de produtos hidrolíticos através da membrana lisossomal, ausência de cofatores ou defeito de proteínas ativadoras [Neufeld, 1991; Wilcox, 1995; Aerts, 2003].

As DL são individualmente raras na população, com menos de 5 casos em cada 10.000 nascimentos, mas em conjunto têm uma incidência de aproximadamente 1 caso em 5000 nascidos vivos [Meikle et al, 1997].

As DL podem ser classificadas de acordo com a natureza do substrato acumulado em [Watts, 2003]:

1) ESFINGOLIPIDOSES, ocorrem quando há falhas para degradar os esfingolipídios. Doenças de Gaucher, Niemann-Pick, Gangliosidoses GM1 e GM2 são alguns exemplos deste grupo.

2) MUCOPOLISSACARIDOSES nas quais há deficiência de uma hidrolase lisossomal ou sulfatase lisossomal causando um acúmulo de glicosaminoglicanos (mucopolissacarídeos) nos lisossomos sendo este metabólito excretado na urina.

3) GLICOPROTEINOSES, nas quais há uma deficiência para clivar seqüencialmente resíduos de açúcar dos carboidratos das glicoproteínas. Fucosidose, manosidose e sialidose são exemplos de glicoproteinoses.

4) Outras DL como mucopolipidose que é um grupo heterogêneo clinicamente intermediário entre as esfingolipidoses e as Mucopolissacaridoses. A deficiência de lipase ácida (lipidose), glicogenose tipo 2 e lipofucinose também são exemplos de DL.

O quadro clínico para estas doenças, segundo Danks (1981), dependerá do tipo e da quantidade de macromoléculas acumuladas nas células dos tecidos envolvidos e das conseqüências patológicas dessa alteração. Para a maioria das DL, o processo anormal de depósito lisossômico inicia no feto durante a gravidez e torna-se clinicamente evidente nos primeiros dois anos de vida, mas existem várias situações de início tardio. As DL são

progressivas, graves e predominantemente incuráveis, apresentando um risco de recorrência de 25% na mesma irmandade. Para a maioria delas, o diagnóstico permite apenas medidas preventivas como o aconselhamento genético, a detecção de heterozigotos e o diagnóstico pré-natal.

I.2.1. As enzimas lisossômicas

As enzimas lisossômicas são sintetizadas em polissomos ligados à membrana do retículo endoplasmático rugoso (RER) e glicosiladas através da transferência de oligossacarídeos provenientes de dolicol-P-oligossacarídeos. No RER, o peptídeo sinalizador é removido e as proteínas são translocadas para o Complexo de Golgi onde ocorre fosforilação dos oligossacarídeos. A fosforilação de certos resíduos de manose de enzimas hidrossolúveis é um processo que, entre outros resultados, culmina na criação dos sítios de reconhecimento do receptor manose-6-fosfato (M6P). Em uma primeira etapa, N-acetilglicosamina-1-fosfato é adicionado a um ou dois grupos de manose presentes nas cadeias de oligossacarídeos através da ação de uma fosfotransferase. Em uma segunda etapa, os grupamentos N-acetilglicosamina são removidos por uma fosfoglicosidase expondo resíduos de M6P. A unidade M6P é reconhecida por receptores presentes na membrana do Complexo de Golgi, favorecendo a ligação destas glicoproteínas aos receptores. Embora sistemas de transporte independentes de M6P existam na maioria dos tipos celulares, a via de transporte e reconhecimento por receptores M6P é o principal meio de distinção das enzimas lisossômicas de outras enzimas secretadas [Kornfeld, 1987].

As vesículas contendo glicoproteínas ligadas a receptores surgem do Complexo de Golgi e ligam-se a vesículas pré-lisossômicas, as quais são mais ácidas que as provenientes do Complexo de Golgi. Esta diminuição do pH promove a dissociação da glicoproteína de seu receptor, estes pré-lisossomos se fundem a lisossomos maduros recebendo suas enzimas. Neste ponto os receptores de M6P retornam ao Complexo de Golgi através de grupo diferente de vesículas [Kornfeld, 1987].

Este receptor que se dissocia da enzima é reciclado podendo ser utilizado várias vezes. Caso não ocorra a acidificação das vesículas, não há a dissociação do complexo enzima-receptor, conseqüentemente o receptor M6P não retorna ao Complexo de Golgi. Na carência do receptor, glicoproteínas que deveriam ter como destino os lisossomos continuam na via de secreção e são liberadas [Kornfeld, 1987].

I.3. As Esfingolipidoses

I.3.1. Os glicosfingolipídios

Os glicosfingolipídios (GELs) são componentes essenciais da membrana de células eucarióticas. Eles são sintetizados no retículo endoplasmático e no Complexo de Golgi. Localizados principalmente na camada externa da membrana plasmática são internalizados por endocitose e são degradados dentro dos lisossomos [Van Meer, 2004; Sillence e Platt, 2004]. Os GELs colaboram nas propriedades físico-químicas da membrana celular. Eles apresentam cerca de 300 estruturas diferentes entre si e são compostos de pelo menos 1 resíduo de monossacarídeo ligado a um aminoálcool ceramida ou esfingosina que é inserido na bicamada lipídica. A presença destas moléculas na membrana plasmática enriquece a superfície externa da camada de carboidratos deixando-a mais rígida e auxiliando a proteger a membrana de danos químicos e mecânicos [Chester, 1999]. Diversas outras funções dos GELs como adesão, crescimento, regulação e diferenciação celular têm sido observadas *in vitro* [Yamashita et al., 1999; Sandhoff e Kolter, 2003].

Como todos os constituintes celulares, os GELs são continuamente sintetizados e degradados. Tanto a via de síntese como a de degradação contém séries de enzimas, sendo o resultante de uma reação o substrato para a próxima. Se uma das enzimas faltar, a molécula não é sintetizada, é imperfeita, ou não é degradada, gerando desordens metabólicas [Sandhoff e Kolter 2003]. Estas desordens metabólicas hereditárias são conhecidas por resultarem de defeitos nas enzimas lisossomais envolvendo a degradação

de GELs [Yamashita et al., 1999; Furukawa, 2004]. Estas desordens no armazenamento de GELs pertencem a uma família de mais de 40 DL, na qual o substrato da enzima deficiente acumula-se nos lisossomos das células [Futerman, 2004]. Um achado interessante é que os GELs também acumulam-se em algumas DL secundariamente ao acúmulo do material de armazenamento principal [Walkley, 2004]. Por exemplo, armazenamento de gangliosídios GM2 e GM3 foram observados no cérebro de pacientes com a Doença de Niemann-Pick tipo A, enquanto que o material de armazenamento principal nesta desordem é a esfingomiélinina [Brunngraber et al., 1973; Rodriguez-Lafrasse e Vanier, 1999]. Também foi observado este fato em pacientes com a doença de Niemann-Pick tipo C e Mucopolissacaridose tipos I e III, onde os materiais de armazenamento principais são o colesterol, dermatan sulfato e heparan sulfato, respectivamente [Hara et al., 1984; Jones et al., 1997; Taniguchi et al., 2001; Ikonen, 2004].

Quando o catabolismo dos GELs está alterado, diversas condições patológicas graves em humanos são observadas. A frequência individual das DL do tipo esfingolipidoses não é alta, mas juntas, elas são um grupo significativo apresentando uma frequência de 1 em cada 18.000 nascidos vivos e representam a causa mais freqüente de doenças neurodegenerativas em crianças [Meikle et al., 1999].

I.3.1.1. Biossíntese e Catabolismo dos GELs

Os GELs são sintetizados no Complexo de Golgi por adição seqüencial de monossacarídios na ceramida através da ação de glicosiltransferases (figura 1) [Ichikawa e Hirabayashi 1998; Sandhoff e Kolter 2003.]

As duas principais famílias são os GELs neutros (séries lacto e globo) e os gangliosídios. Os gangliosídios contêm um ou mais resíduos de ácido siálico e são encontrados em todos os tecidos de mamíferos, embora eles sejam particularmente abundantes na superfície de células no Sistema Nervoso Central [Lloyd e Furukawa 1998]. Os GELs são direcionados ao lisossomo onde eles são degradados por uma ação seqüencial de glico-hidrolases específicas [Schapiro et al., 1998; Sandhoff e Van Echten,

1993]. Estas enzimas removem um monossacarídeo do GEL em cada etapa da rota de degradação (figura 2) [Sandhoff e Kolter, 1996].

Ratos knockout os quais não possuíam a primeira enzima da biossíntese de GELs (ceramida glicosiltransferase, figura 1) morreram *in útero*. [Yamashita et al., 1999]. Isto demonstra o papel essencial dos GELs durante a diferenciação e desenvolvimento em mamíferos. Deficiências em uma ou mais enzimas da rota de degradação dos GELs (figura 2), resultam em DL caracterizadas como esfingolipidoses.

Nas DL caracterizadas como glicoesfingolipidoses, a deficiência enzimática leva ao acúmulo do substrato (GELs) nos lisossomos levando às respectivas patologias (figura 2).

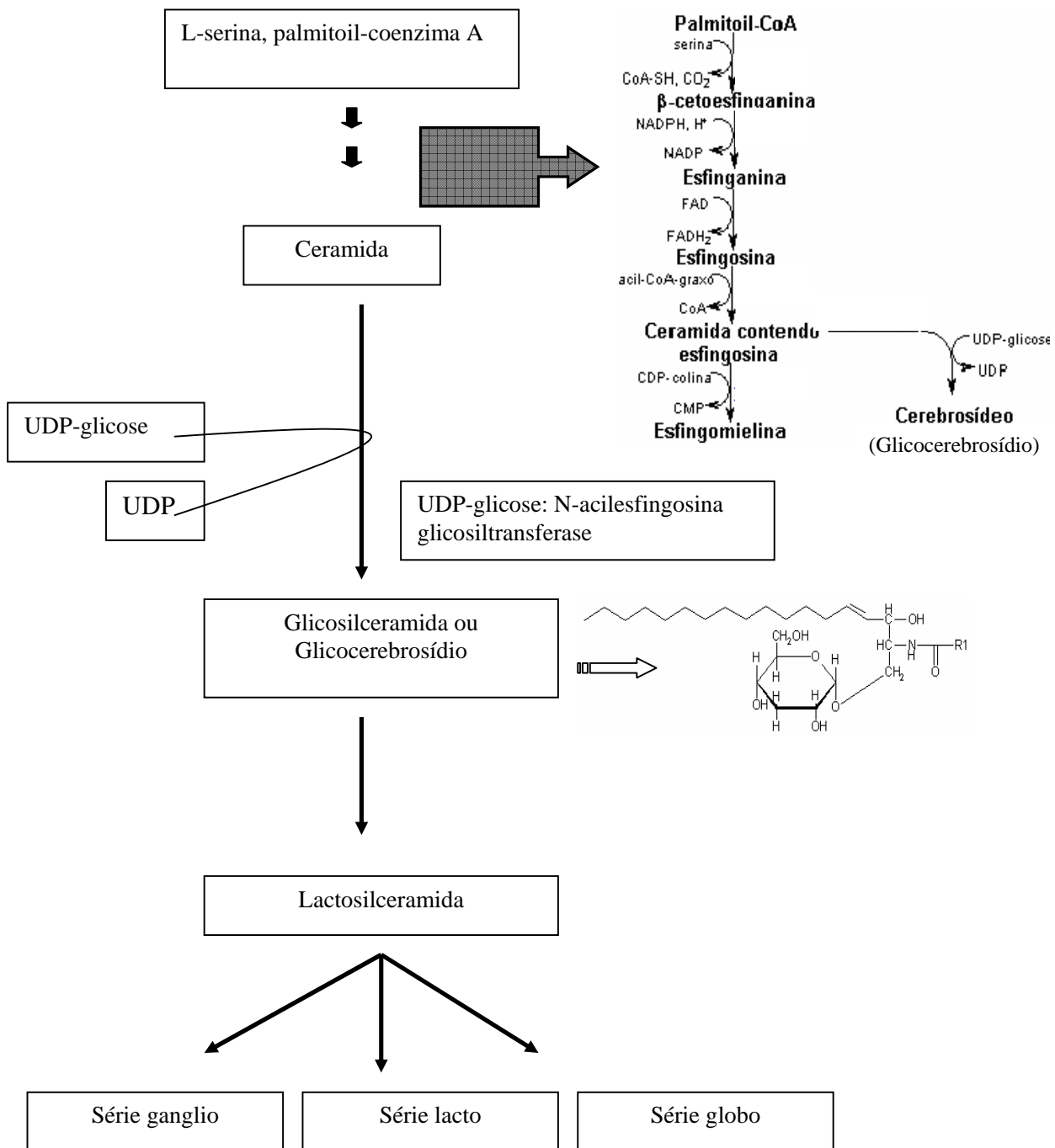


Figura 1: Biossíntese dos GELs, enfatizando a conversão da ceramida em glicosilceramida (glicocerebrosídeo) através da ação da ceramida glicosiltransferase (Adaptada de Platt et al., 2003).

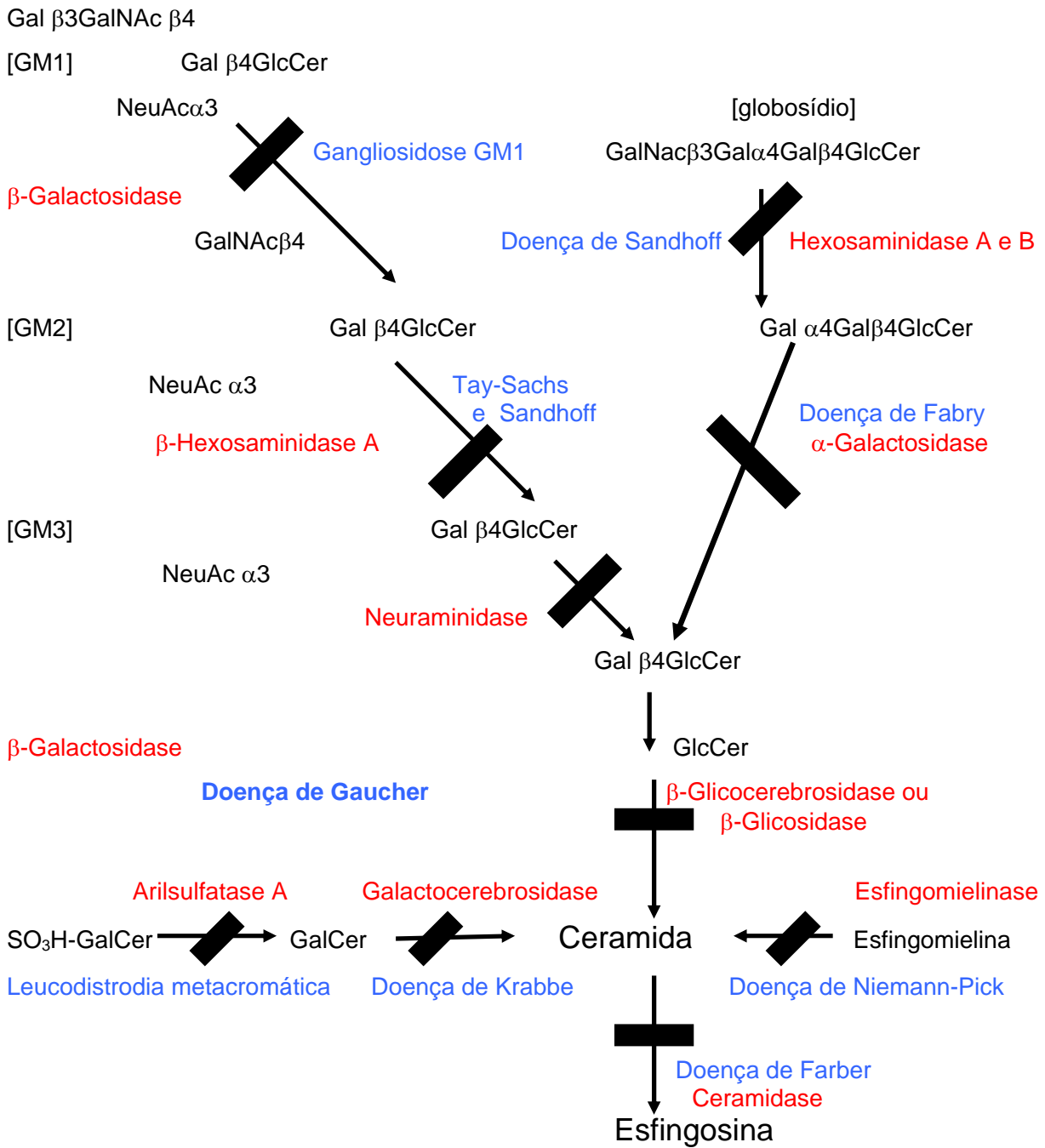


Figura 2: Catabolismo dos GELs e as doenças associadas a deficiências de hidrolases ácidas lisossomais. A via de degradação contém séries de enzimas (em vermelho) sendo o resultante de uma reação o substrato para a próxima (em preto). Mutações que ocorrem nos genes que codificam estas enzimas, são responsáveis pela produção de enzima cataliticamente ineficiente. Se uma enzima apresentar-se ausente ou deficiente, ou mesmo se apresentar alterações, a molécula não será sintetizada, gerando as mais diversas doenças metabólicas (em azul). Os monossacarídeos e ceramida são reutilizados no citosol (Gal=galactose; Glc=glicose; Cer=ceramida; GalNAc=N-acetilgalactosamina; NeuAc=ácido N-acetil neuramínico ou ácido siálico; GM1-2-3=monosialogangliosídeo 1-2-3) (Adaptado de Platt et al., 2003).

I.3.2. As Saposinas

Certas proteínas não enzimáticas que possuem uma pequena cadeia de oligossacarídeos são solicitadas para auxiliar na degradação dos GELs. Estas proteínas são chamadas de Saposinas ou SAPs. Devido à especificidade, elas facilitam a degradação de esfingolipídios ligados à membrana por exohidrolases solúveis em água [Mehl e Jatzkewitz, 1964; Morimoto et al., 1988].

São conhecidas quatro tipos de SAPs (SAP-A, SAP-B, SAP-C e SAP-D) derivadas de uma única proteína, precursora das SAPs ou Prosaposina, através de um processamento proteolítico [Fürst et al., 1988; O'Brien et al., 1988; Nakano et al., 1989].

A prosaposina é sintetizada no retículo endoplasmático e transportada através do Complexo de Golgi onde é glicosilada originando uma proteína de 70 KDa. É secretada no espaço extracelular e pode ser endocitada por receptores de lipoproteínas de baixa densidade [Hiesberger et al. 1998]. Há pesquisas que apontam para a prosaposina propriedades neuroprotetoras [Hiraiwa et al, 1997]. Elas são encontradas em fluídos corporais incluindo leite humano e sêmen [Hineno et al., 1991; Kondoh et al, 1991].

No compartimento ácido da célula, os domínios desta proteína precursora são proteoliticamente processados a SAP-A, SAP-B, SAP-C e SAP-D [Vielhaber et al., 1996]. As quatro SAPs apresentam homologia e propriedades similares entre si, mas diferem em suas especificidades e modo de ação. Suas seqüências (todas com cerca de 80 aminoácidos) contêm 6 cisteínas e um sítio de N-glicosilação conservado [Kishimoto et al., 1992]. As pontes de dissulfeto são essenciais para a atividade e são responsáveis pela estabilidade da proteína [Vacarro et al., 1995b].

A primeira SAP foi descoberta em 1964 por Mehl e Jatzkewitz e denominada proteína ativadora de sulfatídio: SAP-B ou Saposina B, a qual é necessária para a degradação de sulfatídios - galactosilceramida-3-sulfato - pela arilsulfatase A. A SAP-B é uma pequena glicoproteína lisossomal com cadeias de oligossacarídeos ligadas glicosidicamente e possui três pontes de dissulfeto [Fischer e Jatzwitz 1975; Fürst et al., 1990]. A SAP-B comporta-se como um detergente fisiológico e estimula a degradação de sulfatídios por solubilizar o substrato preso à membrana. O defeito inato de SAP-B leva ao acúmulo de

sulfatídios, digalactosilceramida e globotriaosilceramida [Sandhoff et al., 2001]. O fenótipo destes pacientes assemelha-se a uma forma variante de leucodistrofia metacromática com início infantil ou juvenil tardio [Kretz et al., 1990].

A SAP-C ou Saposina C é necessária para a degradação lisossomal da glicosilceramida (glicocerebrosídeo) pela glicosilceramida- β -glicosidase. A SAP-C é uma proteína de 20 KDa, com estrutura homodimérica, e foi primeiramente isolada do baço de pacientes com Doença de Gaucher [Ho e O'Brien, 1971].

A β -glicosidase é uma enzima lisossomal solúvel em água que pode se associar às membranas. *In vitro*, é necessário o uso de detergentes ou fosfolipídios carregados negativamente para que a atividade enzimática seja completa [Wilkening et al., 1998]. Achados cinéticos sugerem uma ativação alostérica da enzima [Morimoto et al., 1990]. Sob pH ácido, a afinidade da SAP-C à membrana é fortemente aumentada [Vaccaro et al., 1995a]. Nesta faixa de pH, as SAP-C e SAP-D também desestabilizam membranas fosfolipídicas de vesículas unilamelares [Wilkening et al., 1998]. Isto pode facilitar a associação de glicosilceramida- β -glicocerebrosidase com membranas que favorecem a degradação do substrato glicosilceramida [Vaccaro et al., 1999]. *In vitro*, a SAP-C também estimula a degradação de galactosilceramida por galactosilceramida - β -galactosidase [Wenger et al., 1982], esfingomielina por esfingomielinase ácida [Tayama et al., 1993; Linke et al., 2001a] e de ceramida pela ceramidase ácida [Linke et al., 2001b]. A deficiência de SAP-C leva a uma forma juvenil anormal de Doença de Gaucher e um acúmulo de glicosilceramida (glicocerebrosídeo) [Christomanou et al., 1986; Schnabel et al., 1991].

Nenhuma doença humana é conhecida baseada no defeito isolado de SAP-A [Morimoto et al., 1989] ou SAP-D [Fürst et al., 1988]. *In vitro*, SAP-A pode ligar-se a gangliosídios GM1 e GM2 [Hiraiwa et al., 1992]. SAP-D contém 78 aminoácidos e uma cadeia de oligossacarídios e estimula a degradação da ceramida pela ceramidase ácida em cultura de células [Klein et al., 1994].

A análise molecular da prosaposina revela que uma mutação homoalélica no códon de iniciação onde ocorre a substituição de ATG para TTG, leva à completa perda

de SAP-A-D o que resulta no acúmulo de glicolipídios, principalmente nos rins e fígado [Schnabel et al., 1992; Bradova et al., 1993].

I.3.3. As Esfingolipidoses são Doenças Lisossômicas

As esfingolipidoses são desordens progressivas onde os GELs estão acumulados nos lisossomos devido a defeitos na sua degradação. Podem ser classificadas como tipos infantil, juvenil e adulto de acordo com o início da doença e os níveis enzimáticos. Entre estes tipos, o infantil apresenta o pior prognóstico. A maioria das formas é caracterizada por neurodegeneração progressiva e fatal no início da infância. Elas resultam de mutações no gene que codifica as glicosidases ácidas ou cofatores protéicos, responsáveis pela remoção seqüencial de unidades de monossacarídios dos GELs nos lisossomos. A maioria destas doenças é autossômica recessiva, com exceção da Doença de Fabry que é ligada ao X [Platt et al., 2003].

Este grupo inclui as doenças de Gaucher tipos 1, 2 e 3, Fabry, Tay-Sachs, Sandhoff e gangliosidose GM1. Com exceção da Doença de Gaucher tipo 1, todas estão associadas com o acúmulo de GELs no sistema nervoso [Platt et al., 2003].

Mutações individuais têm conseqüências diferentes na atividade residual da enzima específica. Níveis enzimáticos residuais servem como um guia para a gravidade das manifestações clínicas. Variantes da doença com início na infância, apresentam baixa ou nenhuma atividade enzimática, os indivíduos com a forma juvenil têm a atividade enzimática detectável mas em baixo nível e a forma adulta apresenta uma maior atividade enzimática [Platt et al., 2003].

O mecanismo da patogênese das esfingolipidoses ainda não é bem compreendido, há diversos fatores que particularmente podem explicar a patogênese: a rota bioquímica que as células escolhem na síntese dos GELs; diferenças nos tipos de GELs nas diferentes células e compostos tóxicos derivados do armazenamento de GELs e a diversidade no genótipo. As diferenças no genótipo geralmente determinam a patogênese da doença de acordo com os efeitos dos níveis de atividade enzimática.

Entretanto, em alguns casos particulares, o mesmo genótipo causa o aparecimento de diferentes fenótipos [Özkara et al., 2004].

Quando se considera a patogênese destas doenças de acordo com o nível de atividade enzimática residual é necessário levar em conta uma questão: Por que certa quantidade de atividade enzimática leva a um melhor e mais longo tempo de vida nestas doenças? A teoria de Conzelmann e Sandhoff (1983) é que a atividade enzimática residual ajuda a esclarecer a patogênese de heterozigotos, tipos juvenil e adulto das esfingolipidoses. De acordo com esta teoria, sob condições fisiológicas normais, as enzimas lisossomais trabalham com concentrações de substratos abaixo dos seus valores de Km (constante de Michaelis). No caso de baixas concentrações enzimáticas, a enzima pode tolerar o aumento da concentração de substrato até uma concentração estável. Com altas concentrações de substrato, este começa a acumular e os achados clínicos começam a surgir. Isto explica os achados clínicos dos tipos juvenil e adulto das esfingolipidoses surgirem mais tarde que a forma infantil e também explica a ausência de sintomatologia nos heterozigotos [Özkara et al., 2004].

A clonagem dos genes, o amplo uso da PCR e tecnologias relatadas desde 1989 têm caracterizado as mutações que causam as esfingolipidoses. Os resultados das análises das mutações mostraram que: (1) mutações que causam as esfingolipidoses são heterogêneas; (2) uma correlação é possível entre genótipos e fenótipos, mas estas correlações podem muitas vezes não apresentar os resultados esperados; e (3) as mutações ajudam a explicar os domínios fundamentais das enzimas e proteínas ativadoras e a caracterização dos efeitos destas mutações na proteína traduzida que leva a uma melhor compreensão do processo biológico das células normais [Özkara et al., 2004].

I.3.4. Tratamento para as esfingolipidoses

Quando há uma doença genética, a mais importante questão é como preveni-la através do diagnóstico pré-natal. Contudo isto nem sempre é possível. Neste caso, o mais importante em questão é o tratamento destas doenças. Diferentes estratégias

terapêuticas têm sido desenvolvidas como a terapia de reposição enzimática (TRE), terapia gênica (TG), transplante de medula óssea (TMO), terapia com chaperonas químicas e terapia de redução de substrato (TRS). O objetivo destas terapias é restabelecer a atividade enzimática nos lisossomos. Isto não é tão simples para aquelas esfingolipidoses com envolvimento do SNC. Nesta situação, a estratégia é encontrar um agente terapêutico que possa atravessar a barreira hematoencefálica. Estas estratégias têm sido testadas em modelos de ratos e em culturas de células de pacientes [Schiffmann e Brady, 2002; Jeyakumar et al., 2002].

I.3.5. Doença de Gaucher: a glicosfingolipidose mais comum

I.3.5.1. Um pouco da história

A Doença de Gaucher (DG) foi descrita pela primeira vez em 1882 pelo médico francês Philippe C. E. Gaucher como um epitelioma de baço (reconhecida, hoje em dia, como linfoma) quando avaliava a autópsia de baço de uma jovem mulher com esplenomegalia para a sua tese de doutorado [Gaucher, 1882]. Outros relatos de caso logo se seguiram, revelando tanto a natureza sistêmica como familiar deste distúrbio, e também uma substancial variabilidade nos sinais, sintomas e idade de apresentação [Beutler e Grabowski, 2001; Schueler et al., 2003]. O primeiro caso de comprometimento neurológico em um bebê foi descrito em 1927, e uma variante neuropática “juvenil” foi descrita pela primeira vez na Suécia, em 1959 [Oberling e Woringen, 1927; Hillborg, 1959].

Em 1920, Lieb caracterizou o material de armazenamento nas células, que provocava o aumento de alguns órgãos, como sendo o galactocerebrosídeo, porém, somente em 1934, Aghion e colaboradores identificaram corretamente o material acumulado nas células do retículo endotelial do baço, fígado, cérebro e medula óssea de pacientes com DG, como glicocerebrosídeo (ou glicosilceramida) [Halliday et al., 1940; Agranoff et al., 1962]. A deficiência da enzima envolvida no catabolismo do

glicocerebrosídeo, a glicocerebrosidase (ou β -glicosidase - β -gli) foi subseqüentemente confirmada por Brady e colaboradores na década de 60 [Brady et al., 1965].

Na história da DG, a década de 70 foi marcada por avanços que incluíram a identificação da Saposina C (SAP-C) como um ativador da β -gli; a purificação do glicocerebrosídeo de placentas humanas; a descoberta da célula de Gaucher pertencente à linhagem dos macrófagos e ainda os receptores de manose na superfície destes macrófagos, fato este fundamental para o desenvolvimento da TRE [Furbish et al., 1977; Burns et al., 1977]. Estudos populacionais realizados por Fried (1973) permitiram estabelecer o caráter de herança autossômico recessivo da DG. Em 1982, ensaios específicos detectaram quantidades aumentadas de glicosilesfingosina em tecidos destes pacientes. A glicosilesfingosina é um segundo substrato para a β -gli e um precursor metabólico para a síntese do glicocerebrosídeo. O acúmulo de glicosilesfingosina foi observado em córtex cerebral e cerebelar de pacientes com a DG tipos 2 e 3, sugerindo a neurotoxicidade desta substância [Nilsson e Svennerholm, 1982; Shinoda et al., 1987].

Ainda em meados da década de 80, cientistas localizaram o gene codificador da β -gli no cromossomo 1 e posteriormente clonaram o gene desta enzima. Desde então, mutações patológicas têm sido identificadas neste gene [Horowitz et al., 1989].

A década de 90 foi o marco para a TRE, primeiramente utilizando a enzima obtida através de placenta humana, e atualmente utilizando a enzima produzida por técnicas de recombinação de DNA [Fallet et al., 1992]. Atualmente, milhares de pacientes com DG são tratados com injeções da enzima glicocerebrosidase modificada. Nesta década, iniciaram-se as pesquisas com terapia gênica e também o uso de outra forma de terapia: a de redução do substrato glicocerebrosídeo, na qual muitos pacientes já fazem uso [Cox, 2003].

I.3.5.2. Características, bases bioquímica e molecular da Doença de Gaucher

Após o acima exposto, podemos dizer que a DG é um erro inato do metabolismo dos glicoesfingolipídios resultando no acúmulo lisossomal de um material degradado

incompletamente denominado de glicocerebrosídeo (figura 3) dentro de células da linhagem monócito-macrófago [Beutler, 1999]. Este acúmulo deve-se à ausência ou deficiência da enzima lisossomal β -glicosidase ácida - β -gli (D-glicosil-N-acilesfingosina glico-hidrolase, EC 3.2.1.45). Em decorrência da deficiência da atividade da β -gli, fica prejudicada a clivagem da ligação β -glicosídica do glicocerebrosídeo (glicosilceramida) que resulta em glicose e ceramida (figura 3) [Grabowski e Horowitz, 1997].

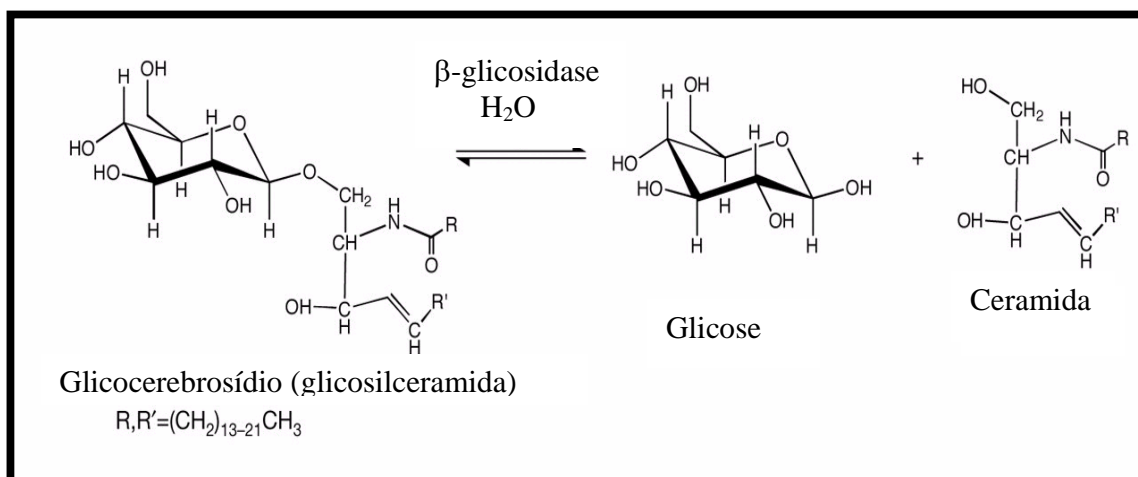


Figura 3: Decomposição do glicocerebrosídeo. A β -glicosidase decompõe o glicocerebrosídeo, esta reação tem como produto resultante moléculas de glicose e ceramida. Fonte: Dvir et al., 2003.

O acúmulo do substrato glicocerebrosídeo dentro dos monócitos e macrófagos deixa as células com uma aparência característica de “papel de seda dobrado”, ao exame microscópico. Estas células cheias de glicoesfingolipídios são conhecidas como células de Gaucher [Beutler e Grabowski, 2001]. Estes macrófagos anômalos se acumulam progressivamente e em grande quantidade no fígado, baço, medula óssea e em outros órgãos. Este acúmulo prejudica e inibe o funcionamento normal destes órgãos e tecidos [Michelakakis et al., 1996; Allen et al., 1997]. As células de Gaucher são responsáveis por todas as manifestações não-neurológicas da doença. O fígado e o baço aumentam algumas vezes as suas massas normais. A esplenomegalia resulta ou contribui para uma

trombocitopenia, que culmina no consumo das células sangüíneas pelo baço e da infiltração de células de Gaucher na medula. Em geral as desordens hemorrágicas na DG são atribuídas à trombocitopenia [Hollak et al., 1995; Esplin, 1994]. Em adição a uma baixa contagem de plaquetas, tem sido descrita também uma deficiência no fator de coagulação, que pode contribuir na tendência ao sangramento [Humphires e Hess, 1994; Hollak et al., 1995]. O envolvimento hepático está freqüentemente associado com fibrose e funcionamento anormal do fígado [Esplin, 1994]. Os alvéolos pulmonares podem apresentar-se cheios de células de Gaucher ou pode haver desvios arteriovenosos nos pulmões ocasionando hipoxemia e/ou doenças restritivas dos pulmões [Grabowski, 1996].

O envolvimento ósseo é comum na DG. Dilatação do fêmur distal, conhecida como deformidade em frasco de Erlenmeyer é um sinal clássico da doença. Necrose asséptica da cabeça femoral, infarto ósseo e fraturas patológicas dos ossos longos são complicações freqüentes da DG. Crises ósseas, isto é, episódios de dor, às vezes acompanhado de febre, mas sem alterações radiológicas são manifestações recorrentes da doença [Beutler e Grabowski, 2001].

Na forma neuropática da DG, os pulmões, rins, adrenais, ovários, glândula pituitária, timo e o cérebro também estão envolvidos. Ocorre uma degeneração neuronal aguda, mas o armazenamento de lipídios nos neurônios é mínimo [Athens, 1998].

É importante ressaltar que as células de Gaucher não são patognomônicas, mas apenas responsáveis pelos efeitos secundários de órgãos reticuloendoteliais como o fígado, baço, ossos e medula óssea [Rosnes et al, 1996]. Estas células já foram detectadas em amostras de medula de pacientes com leucemia mielocítica crônica, leucemia linfocítica crônica e talassemia. A atividade da β -gli nos leucócitos destes pacientes apresentou-se normal eliminando, desta forma, a possibilidade de uma associação com a DG. Células semelhantes às de Gaucher foram encontradas em pacientes com a síndrome da Imunodeficiência adquirida (AIDS), infecções por micobactérias e doença de Hodgkin [Athens, 1998].

A DG foi classificada em três tipos tendo como base a presença e a gravidade de envolvimento neurológico (tabela 1). A doença do tipo 1 não envolve o sistema nervoso central e estima-se que ela afete 1 em cada 40.000 a 60.000 pessoas [Grabowski e

Horowitz, 1997]. Sua incidência é pan-étnica, mas pode ser bastante alta entre os judeus Ashkenazi, chegando a afetar 1 em 450 indivíduos. Na população de judeus Ashkenazi 1 em cada 10 pessoas é portadora dos alelos mutantes da β -gli [Barranger et al., 1995]. A doença do tipo 1 tem sinais, sintomas e curso extremamente variáveis mesmo entre indivíduos com o mesmo genótipo. A variação vai desde a apresentação assintomática, ou com sintomas leves, até o risco de vida. O início clínico da doença do tipo 1 ocorre em qualquer idade, mas ela aparece tipicamente depois da infância e, às vezes, só se manifesta na vida adulta [Watts, 2003]. Os tipos 2 e 3 da DG envolvem o sistema nervoso central e são as variações neuropáticas aguda e subaguda, respectivamente. Ambas as variações são raras, pan-étnicas, progressivas e potencialmente fatais. Elas afetam menos de 1 em cada 50.000 pessoas [Barranger e Rice, 1993].

Tabela 1: A DG é dividida em 3 tipos baseados nos sinais clínicos e especialmente na presença e evolução dos sintomas neurológicos.

CARACTERÍSTICAS	TIPO 1	TIPO 2	TIPO 3
Idade do diagnóstico	Qualquer idade	Primeira infância	Infância
Incidência	1 em 40.000 a 1 em 60.000 (1 em 450 a 1 em 1.500 entre Judeus Ashkenazi)	< 1/100. 000	<1/50. 000
Etnia (grupo étnico com maior ocorrência)	Pan-étnico (Judeus Ashkenazi)	Pan-étnico	Pan-étnico, Norbottniano
Expectativa de vida	6 a 80 anos	Menos de 2 anos	2 a 16 anos
Doença primária no SNC	Ausente	+++	+ → +++ (progressiva)
Hepatoesplenomegalia	+ → +++	++	+ → +++
Anomalias Hematológicas	+ → +++	+++	+ → +++
Anomalias Esqueléticas	- → +++	-	- → +++

Legenda: - = ausente; + = branda; ++ = grave; +++ = muito grave. (Adaptada de Erickson, 1994; Barranger et al., 1995; Grabowski e Horowitz, 1997;).

A DG é uma doença autossômica recessiva definida pela presença de dois alelos mutantes para o gene da β -gli, localizado na região q21 do cromossomo 1 (figura 4A) [Beutler e Grabowski, 2001]. Esta enzima é uma glicoproteína com peso molecular de aproximadamente 60 KDa e abrange aproximadamente 32 Kb de DNA genômico dividido em 11 exons, o qual codifica uma proteína com 497 aminoácidos (figuras 4A e 4B) (Horowitz et al., 1989). É uma glicoproteína homomérica com uma subunidade glicosilada, composta de 7% de carboidratos, 13% de resíduos básicos (lisina, arginina e histidina) e o restante de aminoácidos apolares o que a caracteriza como uma proteína hidrofóbica [Glew et al., 1985; Grace et al., 1989; Grabowski e Horowitz, 1997].

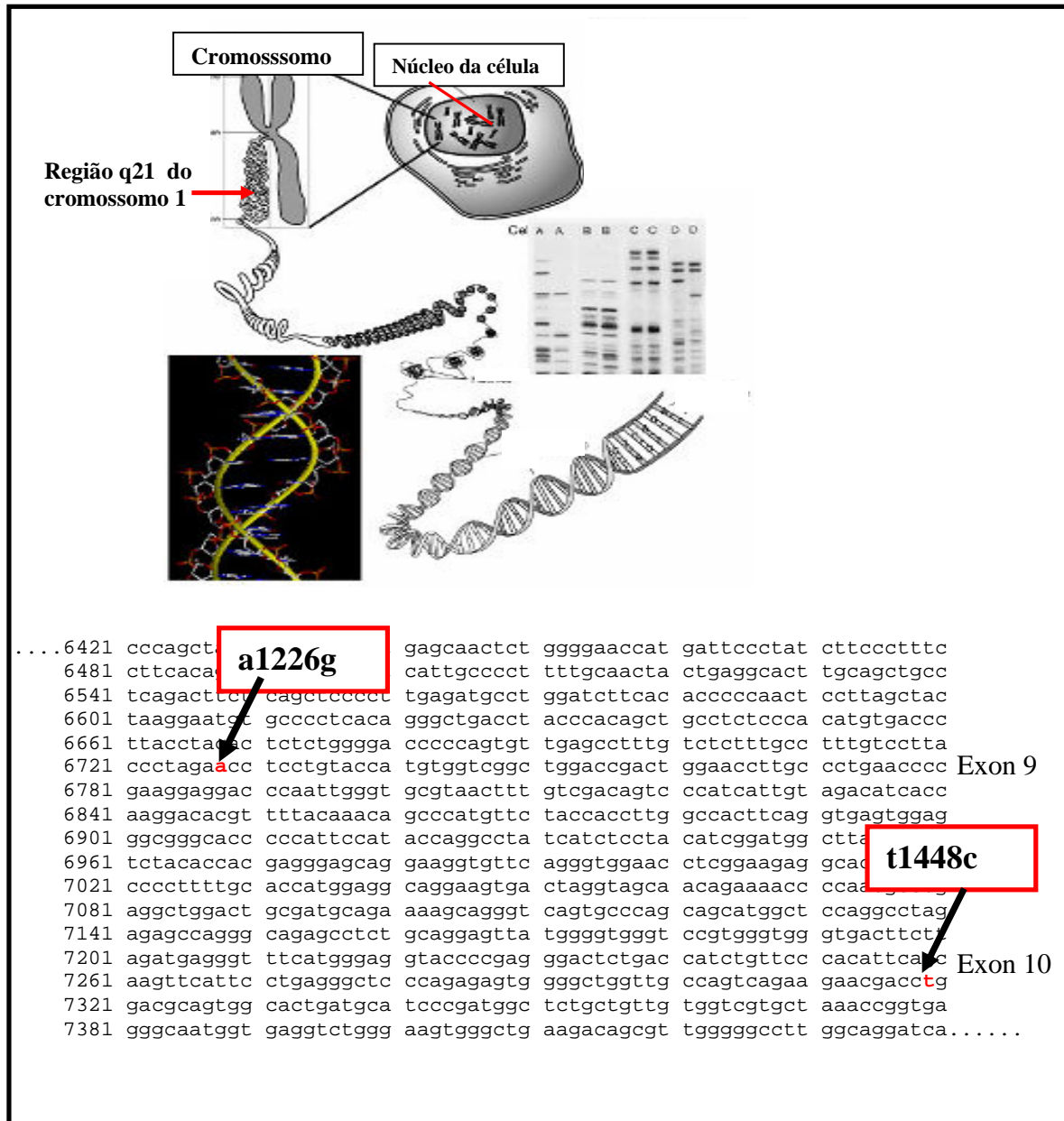


Figura 4A: Seqüência de parte do gene da β -gli. Localiza-se na região q21 do cromossomo 1 e abrange 32 Kb de DNA genômico dividido em 11 exons contendo 1500 pares de base o qual codifica uma proteína com 497 aminoácidos (figura 4B). No DNA as substituições das bases adenina para guanina na posição 1226 e timina por citosina na posição 1448 geram as mutações N370S e L444P, respectivamente. Fonte: www.ncbi.nlm.nih.gov (J03059).

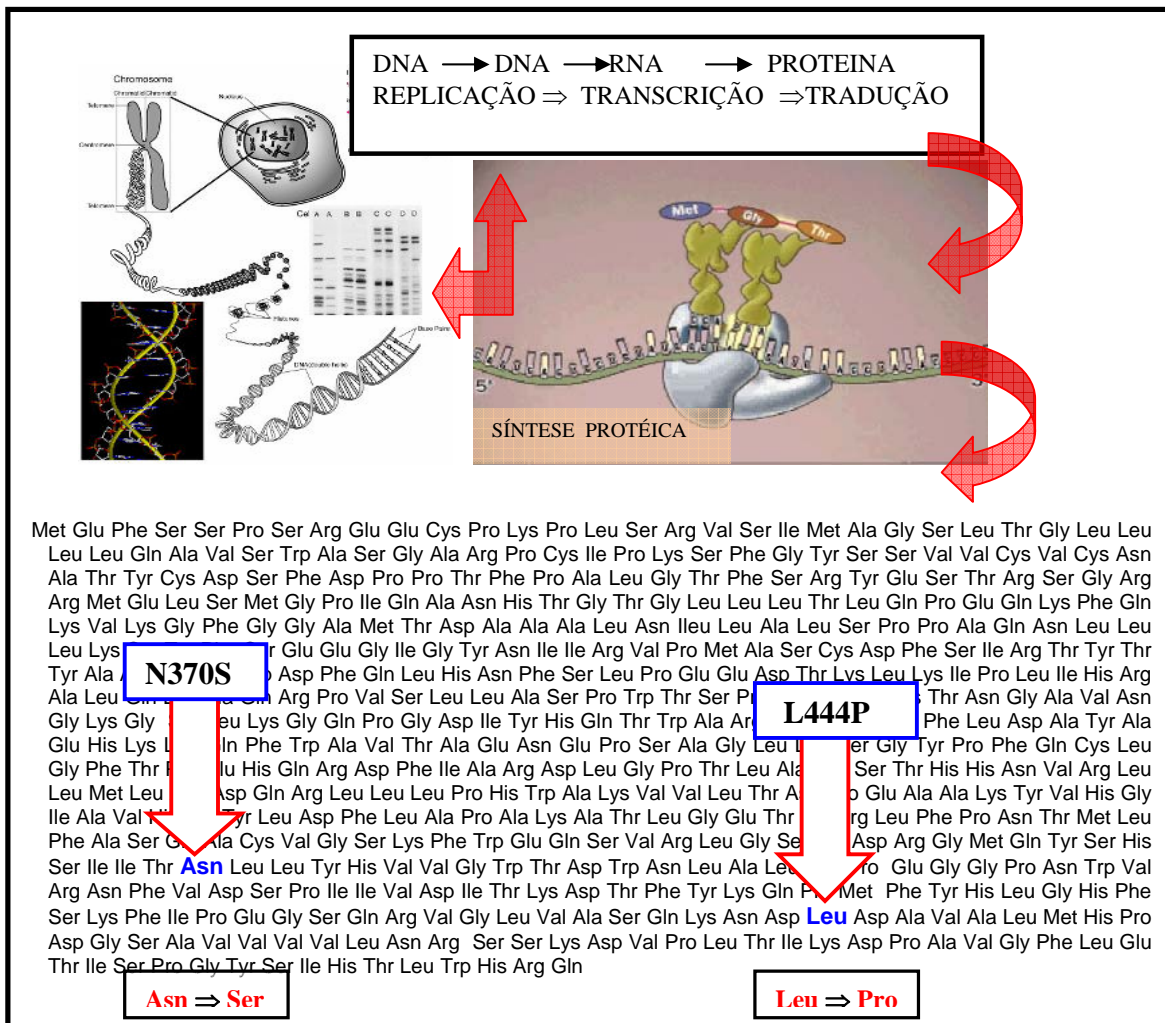


Figura 4B: A síntese protéica. A replicação (duplicação) do DNA, a transcrição do DNA para RNA (ambas ocorrem no núcleo da célula) e a tradução do RNA em aminoácidos são as etapas primordiais para ocorrer a síntese protéica. Estas proteínas terão as mais diversas funções no organismo. Se ocorrer algum erro nas bases nucleotídicas (figura 4A) acarretará em outra seqüência de aminoácidos, gerando uma proteína mutante. Na DG, as mutações mais comuns na β-gli apresentam a troca do aminoácido asparagina por serina no resíduo 370 e a troca da leucina por prolina no resíduo 444 da proteína. [Adaptada de Tsiju et al., 1988].

A DG é caracterizada por notável heterogeneidade do fenótipo clínico entre os 3 tipos, resultado do grande número de diferentes mutações. Cerca de 200 mutações já foram descritas no gene da β-gli, mas somente um pequeno grupo destas acomete cerca de 97% da população de origem não judaica. A presença de mutações nos dois alelos pode comprometer a ação catalítica e/ou a estabilidade da enzima [Beutler e Grabowski,

2001; Alfonso et al., 2002; Dvir et al., 2003]. Há raros casos de mutações no gene ativador da pro saposina (SAP-C) [Koprivica et al., 2000].

As mutações mais prevalentes nesta doença são as denominadas N370S e L444P (figura 5 e tabela 2). A primeira é causada por uma troca de adenina por guanina no exon 9 do gene da β -gli, que determina a substituição do aminoácido asparagina por serina no resíduo 370 da proteína. A mutação L444P deve-se a troca de timina por citosina no exon 10 do gene, que leva a substituição do aminoácido leucina por prolina no resíduo 444 da proteína [Tsuji et al., 1988; Zimran et al, 1989; Zimran et al., 1991; Beutler e Gelbart, 1996; Dvir et al., 2003]. No Brasil, as mutações mais freqüentes coincidem com as mais comuns referidas na literatura internacional: N370S e L444P (figuras 4A e 4B) [Pires e Sobreira, 2004].

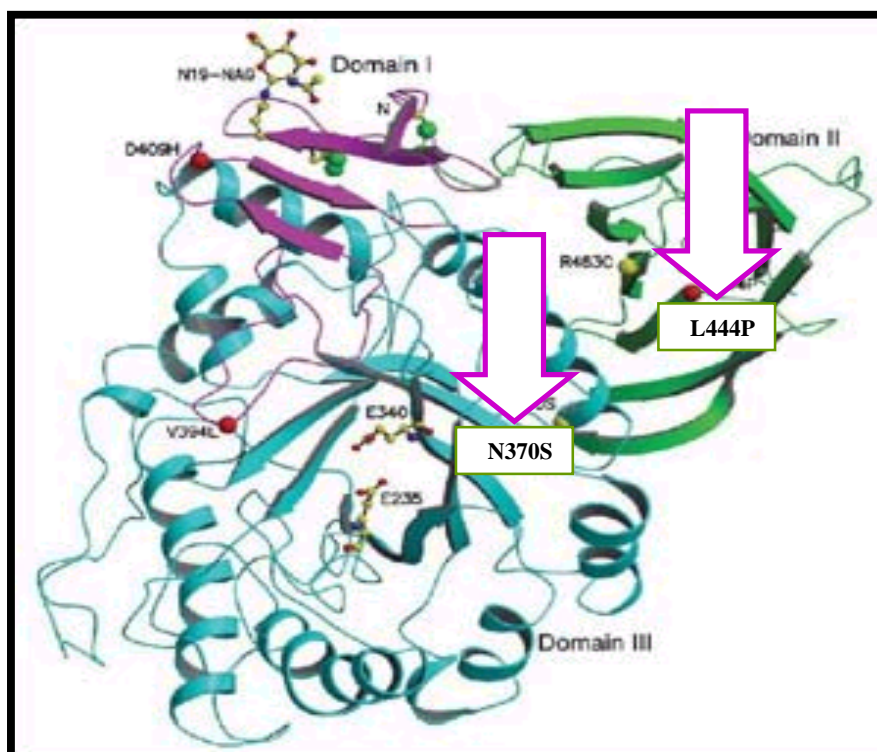


Figura 5: Estrutura tridimensional da β -glicosidase humana. Nas indicações, as localizações das mutações mais comuns na DG.[Fonte: Dvir et al., 2003].

Tabela 2: Os alelos das mutações da β -gli na DG e suas correlações genótipo-fenótipo.

Mutação	Posição cDNA	Posição Aminoácido	Posição Genômica	Substituição do Nucleotídeo e aminoácido	Efeito	Características/Correlação
N370S	1226	370	5841	A \rightarrow G Asn \rightarrow Ser	Leve	-Representa cerca de 70% dos alelos mutantes nos judeus Ashkenazi e cerca de 25% dos pacientes com DG não judeus; -Resulta em enzima com atividade reduzida mas concentração normal no lisossomo; -Homozigose parece excluir o envolvimento neurológico.
L444P	1448	444	6433	T \rightarrow C Leu \rightarrow Pro	Grave	-Presente em cerca de 35% de pacientes com DG não judeus; -Resulta em enzima instável com pouca ou nenhuma atividade no lisossomo; -Genótipo homozigoto pode levar à doença tipo 3.
D409H	1342	409	5957	G \rightarrow C Asp \rightarrow His	Grave	-Mutação menos freqüente; -Resulta em uma enzima muito instável; -Pode gerar fenótipo com quadro pulmonar.
IVS2+1	IVS2+1	-	1067	G \rightarrow A	Grave	-Mutação menos freqüente; -Resulta em uma proteína com efeito catalítico e estabilidade nula.

Legenda: **A:** base purínica adenina; **C:** base pirimídica citosina; **T:** base pirimídica timina; **G:** base purínica guanina. Aminoácidos: **Asn:** asparagina; **Ser:** serina; **Leu:** leucina; **Pro:** prolina; **Asp:** aspartato; **His:** histidina [Adaptada de Glew et al., 1985; Grace et al., 1991; Ohashi et al., 1991; Zimran et al., 1991; Barranger e Rice, 1993; Grabowski, 1995; Beutler e Grabowski, 2001]

Cabe ressaltar outras duas mutações, não tão comuns como as já citadas, mas que estarão presentes no capítulo 2. A mutação D409H é causada por uma troca de guanina por citosina no exon 9 do gene, a qual determina a substituição do aminoácido aspartato por histidina no resíduo 409 da proteína. Quando em homozigose, ela expressa somente cerca de 0,5% ou menos de atividade enzimática, pois a proteína é muito instável. E a mutação IVS2+1, que substitui guanina por adenina no exon 2 do gene da β -gli, quando em homozigose produz um efeito catalítico e uma estabilidade nula na enzima, refletindo um fenótipo grave (tabela 2) [Glew et al., 1985; Beutler e Grabowski, 2001].

Em geral, as diversas mutações identificadas no gene estrutural da β -gli de pacientes com DG, podem gerar mudanças no processamento da glicoproteína alterando sua estabilidade e propriedades bioquímicas e cinéticas. A análise molecular pode contribuir para estabelecer uma correlação com o subtipo da doença assim como proporcionar uma nova forma de identificação de heterozigotos, contribuindo no aconselhamento genético de famílias de risco e no diagnóstico pré-natal.

Há uma forte relação entre as mutações encontradas e as manifestações clínicas da doença (correlação genótipo-fenótipo). Com base nos efeitos funcionais e a associação com o fenótipo da DG, é possível classificar estas mutações em 2 grupos: as mutações associadas com a doença neuropática (por exemplo a L444P quando em homozigose), denominadas graves e aquelas não associadas com a doença neuropática que, mesmo quando encontradas em combinação com uma mutação grave, são denominadas brandas (por exemplo a N370S) [Beutler e Grabowski, 2001].

I.3.5.3. Diagnóstico Laboratorial para DG

Há tempos usava-se a biópsia da medula óssea para diagnosticar a DG, entretanto, a presença das células de Gaucher podem muitas vezes levar a diagnósticos errôneos, ou seja, outras doenças existentes tais como leucemia mielóide crônica, leucemia mielóide aguda, doença de Niemann-Pick e doença de Hodgkin aonde se verifica a presença destas células poderiam ser equivocadamente classificadas como DG [Alterini et al., 1996].

O diagnóstico laboratorial usual para detecção de homozigotos para DG consiste na medida da atividade da β -gli em leucócitos obtidos a partir de sangue total e/ou fibroblastos obtidos a partir de biópsia de pele [Coelho e Giugliani, 2000] utilizando-se substrato artificial específico para a reação enzimática (4-metilumbeliferil- β -D-Glicosídeo) e taurocolato de sódio como detergente [Peters et al., 1976]. O uso de taurocolato de sódio é justificado devido a β -gli possuir várias formas moleculares pela glicosilação diferenciada, fazendo com que necessite do uso de detergentes e lipídios específicos, carregados

negativamente, com o objetivo de solubilizar e ativar esta proteína [Grabowski et al., 1984; Glew et al., 1985].

Estes ensaios não nos permitem distinguir os subtipos neurológicos e não neurológicos da DG [Basu et al 1984; Glew et al., 1985]. Também não nos permitem separar completamente indivíduos normais de heterozigotos. Desta forma, faz-se necessário o conhecimento das características bioquímicas da enzima para chegarmos a uma investigação mais precisa e apurada nos familiares de pacientes com DG.

I.3.5.4. Biomarcadores auxiliares no diagnóstico laboratorial para DG

I.3.5.4.1. Quitotriosidase

A quitotriosidase (QT), também conhecida como quitinase humana (EC 3.2.1.14) é uma glicosil hidrolase sintetizada e excretada por macrófagos ativados (figura 6) [Hollak et al., 1994]. Na década de 90, estudos mostraram que pacientes com DG possuíam níveis elevados de QT no plasma (cerca de 100 a 500 vezes) e que após a introdução da TRE estes níveis diminuía consideravelmente [Guo et al., 1995; Czartoryska et al., 2000; Elstein et al., 2000; Aguilera et al., 2003].

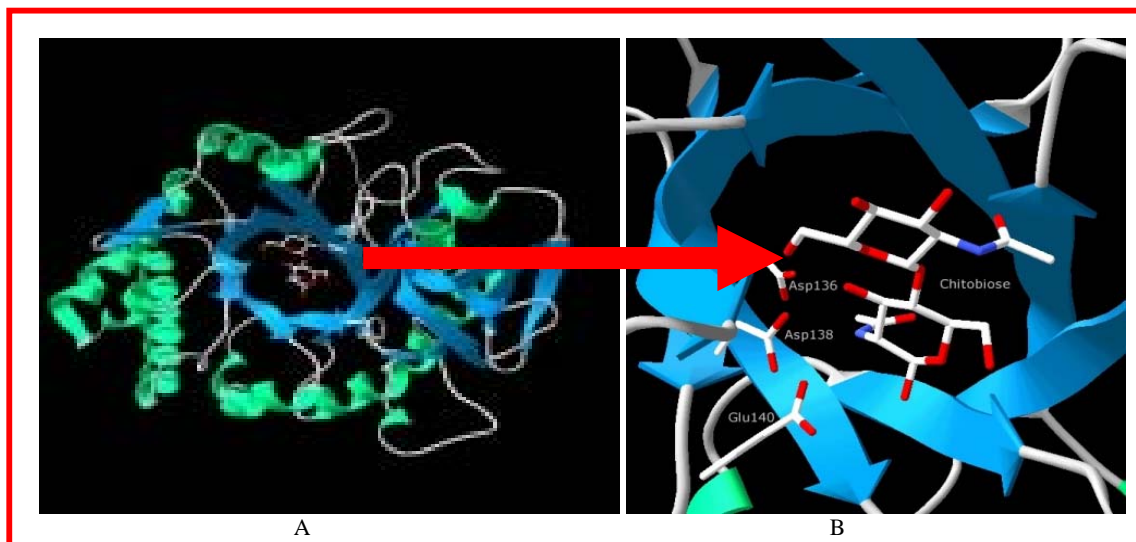


Figura 6: A quitotriosidase. A QT é uma quitinase humana (39KDa) capaz de hidrolisar a quitina (A). A figura B mostra o sítio ativo da QT. [Fonte: Fusetti et al., 2002; <http://www.xray.chem.rug.nl/Gallery1.htm>].

Esta enzima também mostra-se alterada na Doença de Niemann-Pick. Há um aumento de QT nos níveis plasmáticos (480 – 2600 nmol/h/mL), menores que aqueles observados em pacientes com DG (5200 – 63000 nmol/h/mL), o que mantém sua função de auxiliar na diferenciação do diagnóstico, uma vez que, estas duas doenças possuem sinais e sintomas semelhantes [Guo et al., 1995; Wajner et al., 2004]. Estudos bioquímicos e cinéticos com a QT têm demonstrado a importância desta enzima como um indicador em doenças lisossômicas que envolvem macrófagos, embora ainda sejam necessárias muitas pesquisas neste campo para uma melhor compreensão da rota fisiológica da QT [Wajner et al., 2004].

A QT, cujo papel fisiológico ainda não está bem elucidado, está presente no fígado, rins, baço, pulmão e medula óssea [Guo et al., 1995]. Está estabelecido que 6% da população possui uma deficiência desta enzima e este fato não está associado com nenhuma condição patológica e não resulta em sintomatologia [Andersen et al., 1997].

I.3.5.4.2. Quemoquina CCL18/PARC (*Pulmonary and activation-regulated chemokine*)

Apesar da potencialidade da enzima QT como marcador bioquímico para DG, Moyses (2003) e Aerts (2003) assinalam que a elevada atividade enzimática não constitui condição específica desta patologia e que alguns pacientes possam não expressar esta atividade. Estes últimos incluem-se a parcela de 6% da população mundial que possuem deficiência da atividade da QT [Guo et al., 1995; Andersen et al., 1997].

Uma nova proteína vem sendo estudada para servir como marcador específico para a DG: a quemoquina CCL18/PARC. Boot e colaboradores (2003), relatam que no plasma de pacientes sintomáticos com DG a concentração desta proteína é cerca de 29 vezes mais elevada, não ocorrendo sobreposição entre pacientes e indivíduos normais. A medida normal está estimada em 33 ng/mL (10 – 72 ng/mL) enquanto o nível plasmático para pacientes afetados é de 948 ng/mL (237 – 2285 ng/mL).

I.3.5.5. Tratamento para DG

Os tratamentos para DL restringem-se na sua maioria a cuidados paliativos, mas na DG a terapia de reposição enzimática oferece melhora clínica substancial. Esta terapia tem mudado significativamente o tratamento desta patologia [Butters, 2003].

Proposta pela primeira vez em 1966, a experiência clínica inicial da TRE aconteceu em 1974 [Barton et al., 1990 e 1991; Murray e Jin, 1995]. Nesta experiência clínica inicial, foram administradas infusões intravenosas únicas de pequenas quantidades da glicocerebrosidase purificada. Os resultados iniciais mostraram níveis mais baixos do glicocerebrosídeo hepático e plasmático. Entretanto, estes resultados foram inconsistentes, porque a enzima não modificada foi absorvida principalmente pelos hepatócitos, não pelos macrófagos. Foram necessários avanços técnicos não só para extrair quantidades suficientes de glicocerebrosidase da placenta, como também para fazê-la chegar aos macrófagos através de tratamento enzimático de grupos de açúcares terminais expondo os resíduos de manose para que os receptores de M6P pudessem reconhecê-los (figura 7) [Brady e Barton, 1994].

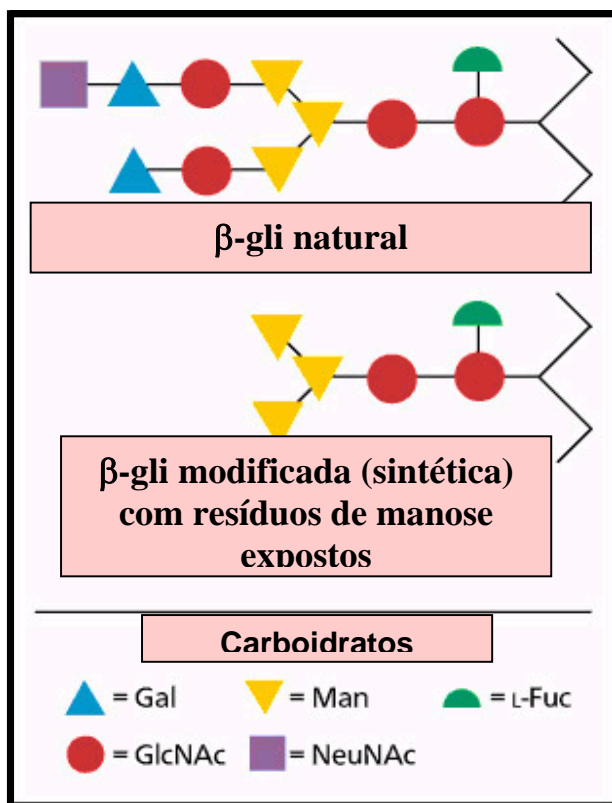


Figura 7: A enzima β -gli humana e a enzima modificada com os resíduos de manose expostos destinados a atingir os macrófagos.

Legenda: Gal: galactose; GlcNAc: N-acetilglicosamina;
 Man: manose; NeuNAc: ácido N-acetilneuramínico; L-Fuc: fucose.
 [Fonte:http://history.nih.gov/exhibits/gaucher/docs/page_04f.html].

Nos anos 80, surgiu então a glicocerebrosidase com a porção carboidrato modificada, purificada de placenta humana e que tinha macrófagos como alvo. O primeiro preparado disponível foi a alglucerase (Ceredase®). Em 1991 ela foi aprovada para comercialização nos Estados Unidos e, em seguida, em 10 países europeus.

Nos anos 90, surgiu a glicocerebrosidase recombinante como a segunda geração da TRE. A enzima recombinante, imiglucerase (Cerezyme®) foi aprovada para comercialização nos Estados Unidos em 1994 e na Europa em 1997. No Brasil a TRE chegou em 1992.

A imiglucerase é um análogo da β -gli humana. Tanto a imiglucerase quanto à β -gli natural catalisam a hidrólise do glicocerebrosídeo dentro dos lisossomos das células da linhagem de monócitos/macrófagos. Os grupos de açúcares terminais da imiglucerase e da alglucerase são retirados pelas enzimas sialidase, β -galactosidase e β -N-acetilglicosaminidase, para expôr os resíduos de manose. Tais como os resíduos de carboidrato na alglucerase, os resíduos modificados na imiglucerase são reconhecidos especificamente por receptores endocíticos de carboidratos em monócitos/macrófagos [Grabowski et al., 1995]. Os dois medicamentos diferem entre si na substituição de um único aminoácido (histidina por arginina, na posição 495), o que não afeta a função catalítica da enzima [Grace et al., 1993; Grabowski et al., 1995]. A imiglucerase é uma glicoproteína monomérica de 497 aminoácidos com carboidratos compondo aproximadamente 6% da molécula. A enzima humana β -gli não modificada também contém 497 aminoácidos, mas a porção carboidrato representa 12% da molécula.

A TRE é efetiva para tratar DG tipo 1 (forma não neuropática), visto que a enzima não consegue atravessar a barreira hematoencefálica, porém, as manifestações sistêmicas da DG tipo 3 (forma neuropática crônica) também respondem bem à TRE. Para cada paciente há a dose específica que depende do peso do indivíduo e do estágio da doença. O medicamento é aplicado por infusão endovenosa, por 90 minutos a cada duas semanas, em regime ambulatorial [Desnick, 2004; Futerman et al., 2004; Germain, 2004b]. Atualmente, mais de 3000 pessoas em todo o mundo fazem uso desta terapia [Aerts et al., 2003].

A TRE é um tratamento caro, mas melhora muito as funções e o bem-estar de milhares de pacientes com DG tipo 1 em todo o mundo. Quando em combinação com o uso apropriado de intervenções farmacológicas e não-farmacológicas adjuvantes, e sob orientação de uma equipe multidisciplinar, é considerada como método mais eficiente e de melhor custo-benefício para melhora dos resultados e da saúde de pacientes com DG.

A TRE é pioneira no tratamento da DG, porém, atualmente há outras formas de tratamento, como a terapia de redução de substrato (TRS) (figura 8), onde ocorre a redução da concentração do substrato glicocerebrosídeo através de substâncias que agem na síntese dos GELs. Estas substâncias (Miglustat–Zavesca®) agem inibindo a

enzima glicosilceramida sintetase, enzima esta responsável pelo primeiro passo na síntese da maioria dos GELs. Nesta terapia, o acúmulo de substrato é evitado não pela substituição da enzima deficiente como ocorre na TRE, mas pela redução da concentração de substrato onde a atividade residual da enzima mutante seja suficiente para evitar o armazenamento patológico. As substâncias utilizadas são pequenas moléculas difusíveis inibidoras da síntese de GELs. Um dos inibidores atualmente pesquisado é o Miglustat: N-butildeoxinojirimicin (NB-DNJ; Zavesca®) [Lachmann et al., 2001; Butters, 2003; Moyses 2003; Platt et al., 2003; Germain 2004a; Germain 2004b].

Platt e colaboradores (2003) destacam as várias vantagens desta terapia: administração oral, utilização de pequenas moléculas não imunogênicas, capacidade destas em ultrapassar a barreira hematoencefálica, o que possibilita desta maneira o tratamento para Doença de Gaucher tipos 1,2 e 3.

A experiência com a TRS é limitada, mas promissora. A consideração desta molécula inibidora como opção terapêutica requer seleção apropriada de pacientes; definição dos objetivos terapêuticos e monitoramento não apenas da resposta, mas dos reais efeitos adversos [Pastores e Barnett, 2003]. Há muitos efeitos adversos citados por pacientes que utilizaram a TRS e, segundo estudo realizado avaliando volume de fígado e baço, contagem de plaquetas e atividade de QT, concluiu-se que a monoterapia com Miglustat pode não ser suficiente para manter o mesmo controle nos doentes [Lachmann et al., 2001; Butters, 2003; Pastores e Barnett, 2003]. Este medicamento é indicado para tratamento via oral da DG e é utilizado naqueles pacientes cuja TRE é inadequada.

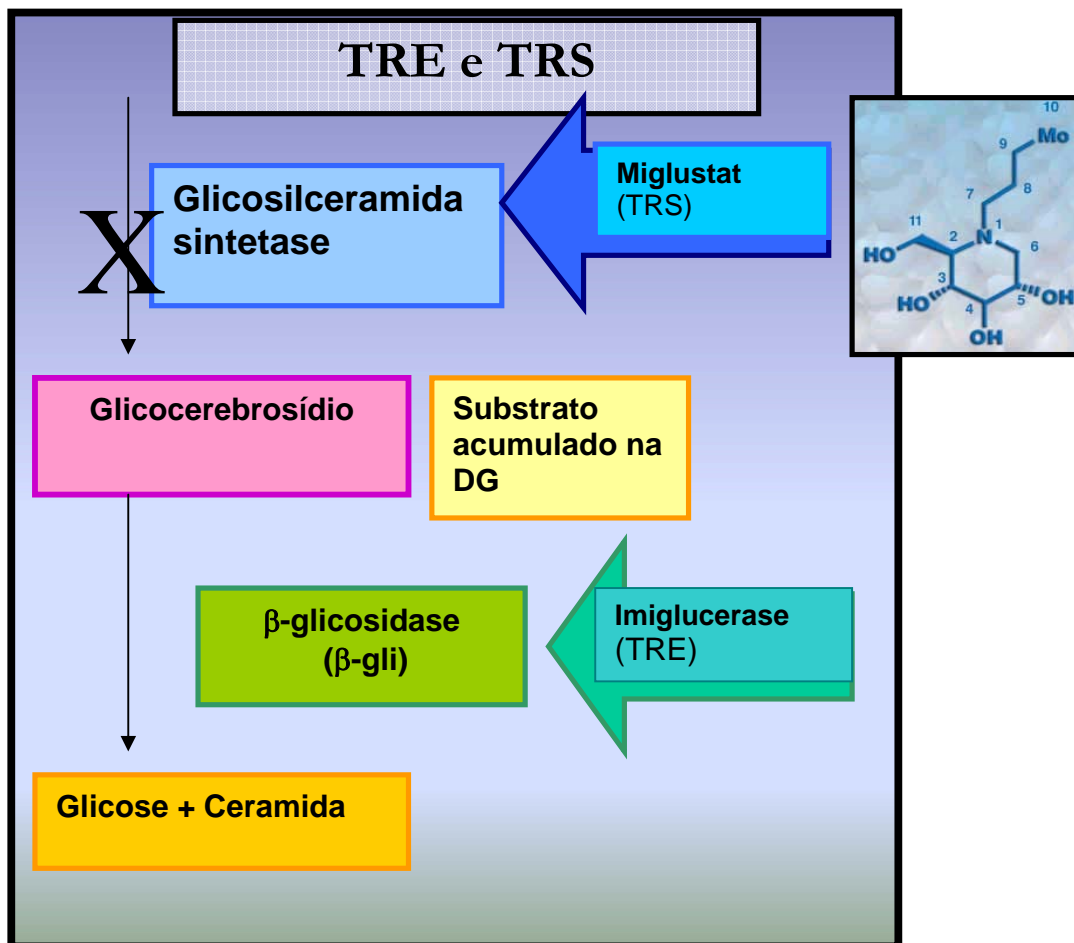


Figura 8: As duas formas de tratamento para DG. A TRS age na biossíntese dos GELs, onde o Miglustat inibe a enzima glicosilceramida sintetase produzindo menor quantidade de glicocerebrosídeo. A TRE (imiglucerase) age na degradação dos GELs quebrando o glicocerebrosídeo, resultando em glicose e ceramida como produto final. [Fonte: adaptação de <http://www.oeaz.at/zeitung/3aktuell/2004/02/serie/serie02>].

A terapia gênica é outra forma de tratamento para DL ainda em fases de muitas pesquisas. A maioria das esfingolipidoses com exceção das doenças de Gaucher e Fabry mostra envolvimento do SNC. Nestas doenças, a provisão de quantidades suficientes de enzimas para o sistema nervoso é solicitada. Contudo, um vetor apropriado é utilizado para transferir o gene para dentro do SNC. Retrovírus e adenovírus foram desenvolvidos para transferir um gene normal para os neurônios na cultura de células e nos modelos animais. A célula tronco hematopoiética (*stem cell*), células de precursores neurais ou astrócitos, são transformadas por estes vetores virais para depois serem administradas.

Esta terapia tem grande possibilidade de tornar-se a opção de tratamento para DL, porém, ainda são necessárias pesquisas na tecnologia de vetores e na expressão de transgenes em macrófagos [Aerts et al., 2003; Ioannou et al., 2003].

Outra possibilidade de tratamento é com o uso das chaperonas químicas, que são proteínas que interferem na montagem de outras, intermediando dobramentos ou selecionando conformações que devem ser estabilizadas. Cada chaperona possui um compartimento central, que acomoda a proteína recém-sintetizada, impedindo que esta tenha um dobramento prematuro e de forma inadequada. Assim, as Chaperonas ajudam as proteínas a se moldar, associar a outras proteínas de maneira estável e tornarem-se estruturas ativas, evitando a associação de proteínas ainda não dobradas corretamente [Lewin B., 2001]. Desta forma, as moléculas com atividades de “chaperonas” aumentariam a atividade residual das enzimas lisossomais, as quais, poderiam, em princípio, atravessar a barreira hematoencefálica. As chaperonas específicas para proteínas com defeito são capazes de estabilizar proteínas mutantes responsáveis por causar as esfingolipidoses. Esta terapia tem sido aplicada em duas esfingolipidoses: as doenças de Gaucher e Fabry [Özkara, 2004].

O transplante de medula óssea continua sendo efetivo na DG e em formas brandas da Doença de Krabbe, mas a alta morbidade e mortalidade limitam seu uso nas DL [Krivit et al., 1998 e 1999].

II. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- 1)** Aplicar um protocolo bioquímico para identificação de indivíduos com DG e heterozigotos baseado na medida da atividade da β -glicosidase em leucócitos e na medida da atividade da quitotriosidase.

- 2)** Caracterizar os indivíduos identificados através do protocolo acima quanto à idade, idade de diagnóstico, sexo, consangüinidade, etnia, perfil demográfico e mutações para o gene da β -glicosidase.

- 3)** Investigar diferenças bioquímicas e cinéticas entre a β -glicosidase de pacientes com DG e heterozigotos obrigatórios que já possuíam a mutação caracterizada realizando uma correlação genótipo X fenótipo bioquímico.

III. CAPÍTULO 1

Artigo 1

O artigo resultante deste capítulo foi aceito para publicação no American Journal of Medical Genetics, em 07 de Abril de 2005:

Application of a Comprehensive Protocol for the Identification of Gaucher Disease in Brazil

Kristiane Michelin^{1,2}, Alessandro Wajner^{1,2}, Fernanda T.S. de Souza^{1,2}, Alexandre S. de Mello¹, Maira G. Burin¹, Maria Luiza S. Pereira^{1,2}, Ricardo F. Pires¹, Roberto Giugliani^{1,3} e Janice C. Coelho^{1,2,*}

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

² Biochemistry Department, ICBS, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

³ Genetics Department, IB, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

IV. CAPÍTULO 2

Artigo 2

O artigo resultante deste capítulo foi aceito para publicação na revista Clinica Chimica

Acta, em 1º de junho de 2005:

Biochemical properties of beta-glucosidase in leukocytes from patients and obligated heterozygotes for Gaucher Disease who are carriers of identified mutation

Kristiane Michelin^{1,2}, Alessandro Wajner^{1,2}, Hugo Bock¹, Ângela Fachel¹, Roberto Rosenberg³, Ricardo Flores Pires¹, Maria Luiza Saraiva Pereira^{1,2}, Roberto Giugliani^{1,4} and Janice Carneiro Coelho^{1,2}

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

²Department of Biochemistry, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

³Department of Genetics, IB, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

⁴Departament of Genetics, IB, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

V. DISCUSSÃO

V.1. Detecção da DG em pacientes de alto risco

Em 1902, os caminhos da genética bioquímica ganharam considerável destaque com os estudos de Archibald Garrod, que pela primeira vez, utilizou o modelo mendeliano em pesquisa com seres humanos e criou o conceito de Erros Inatos do Metabolismo (EIM), grupo de distúrbios hereditários envolvendo processo de síntese, degradação, transporte e armazenamento de moléculas no organismo [Beutler e Grabowski, 2001].

Atualmente, o termo EIM é utilizado para designar mais de 400 defeitos [McKusick, 1993], entre eles as Doenças Lisossômicas (DL) causadas pela deficiência de alguma enzima específica, ativador protéico ou proteína de transporte. Esta deficiência leva ao acúmulo de substratos nos lisossomos, fazendo com que a célula fique repleta de vacúolos de armazenamento, provocando mudanças bioquímicas e sintomas característicos para cada doença [Meikle et al., 1997].

A Doença de Gaucher (DG), descrita pela primeira vez em 1882, é a mais prevalente das DL e também a pioneira na terapia de reposição enzimática (TRE) [Beutler e Grabowski, 2001]. Passado mais de um século da descrição da DG, estudos genéticos, bioquímicos e moleculares têm se expandido cada vez mais na busca de alternativas menos onerosas para o tratamento e a cura da doença, principalmente nos tipos 2 e 3 onde ocorre neurodegeneração [Desnick, 2004].

O Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre tornou-se um serviço de referência nacional para o diagnóstico das DL, desta forma, nasceu a necessidade de elaborar um protocolo para o diagnóstico da DG, através das medidas das atividades das enzimas β -gli e QT.

Amostras de sangue de 1081 indivíduos, todos pacientes de alto risco para DG, foram encaminhadas ao Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do Serviço de Genética Médica por médicos, na sua maioria hematologistas e hepatologistas, de várias partes do país. Estas amostras foram submetidas ao protocolo que permitiu a detecção de 412 casos de DG (38,1%).

O protocolo desenvolvido direcionava a investigação laboratorial também para a pesquisa das doenças de Niemann-Pick tipos A ou B e Niemann-Pick tipo C, caso uma DG

não fosse diagnosticada, a investigação imediatamente seguia para a pesquisa destas desordens, que se assemelham muito clinicamente com a DG. Mais 44 indivíduos foram diagnosticados com estas doenças. Unindo-se os diagnósticos destas DL obteve-se 456 indivíduos com diagnóstico bioquímico elucidado, ou seja, 42,18% do total de amostras enviadas ao laboratório. Somando-se a isto, os 1,75% de casos de outras DL detectados e os 0,28% de outros EIM, obteve-se uma frequência final de 44,21% de diagnósticos de EIM nesta amostra de 1081 indivíduos de alto risco.

Dos 412 casos com DG, 57,6% eram do sexo feminino e 42,4% do sexo masculino. O diagnóstico bioquímico foi estabelecido entre os 7 meses e os 72 anos de idade, sendo a média de $19,2 \pm 15,6$ anos. Deste grupo, somente 239 indivíduos informaram a existência ou não de consangüinidade entre os pais, sendo a porcentagem de consangüinidade de 3,1%. A idade ao diagnóstico e a proporção de homens e mulheres de nossa amostra está de acordo com os dados encontrados em outros países como observado por Charrow et al. (2000).

Os indivíduos cujo diagnóstico não foi estabelecido através deste protocolo, foram reavaliados clinicamente e para aqueles, cujo médico ainda suspeitava de alguma DL ou outro EIM, foi solicitado novo material para a investigação específica. Com isto conseguimos ampliar o número de casos diagnosticados para 478, distribuídos em 12 diferentes EIM. O desenvolvimento de protocolos seletivos para a identificação de pacientes com suspeita de EIM é imperioso, especialmente em países com recursos escassos, para racionalizar processos, custos e tempo.

V.2. Sensibilidade e eficácia do método enzimático para detecção da doença de Gaucher

A princípio, pode-se suspeitar que um indivíduo tem DG depois de um aspirado de medula óssea para avaliação de anemia crônica, trombocitopenia e/ou esplenomegalia. Embora “células de Gaucher”, que são os macrófagos repletos de lipídios na medula óssea, sejam frequentemente encontradas em pacientes com DG, essas células podem ter aspecto similar a células em outras doenças de armazenamento lisossômico, ou às células “pseudo-

Gaucher” observadas em diversas patologias hematológicas, especialmente leucemia granulocítica crônica [Alterini et al., 1996; Kattlove et al., 1969].

O ensaio enzimático é o método mais eficiente, sensível e confiável para o estabelecimento do diagnóstico da DG, pois avalia a atividade da β -gli em leucócitos de sangue periférico [Beutler e Saven, 1990]. Também podem ser utilizados fibroblastos cultivados, obtidos a partir de uma biópsia de pele [Beutler e Kuhl, 1971]. Este ensaio é realizado com o uso do substrato artificial 4-Metilumbeliferil- β -D-glicosídeo e taurocolato de sódio que possui efeito de detergência (Peters et al., 1976). Este detergente possui como função solubilizar através da formação de um complexo micelar toda a β -gli da célula seja ela ligada à membrana ou não. Com isto, caso a célula possua duas isoenzimas, as duas serão liberadas e suas atividades posteriormente medidas. A atividade da β -gli, medida pelo uso deste substrato artificial em leucócitos ou em fibroblastos cutâneos cultivados não é um valor preditivo confiável para avaliar a gravidade clínica, ou seja, estes ensaios não nos permitem distinguir os subtipos neurológicos e não neurológicos da DG [Basu et al., 1984; Glew et al., 1985; Grabowski et al., 1996].

Na média, heterozigotos para DG têm atividade de β -gli abaixo do normal, porém é observado também uma sobreposição da faixa de atividade enzimática em heterozigotos com a faixa de atividade da população normal. Isto inviabiliza o uso da análise enzimática como método confiável e sensível para detecção de heterozigotos como pôde ser observado pela sobreposição nos valores encontrados nos resultados deste trabalho [Beutler e Kuhl, 1971]. Desta forma, fez-se necessário o conhecimento das características bioquímicas da enzima para chegar a uma investigação mais precisa e apurada nos familiares de pacientes com DG.

Nenhum resultado falso positivo foi observado neste estudo e para que houvesse um controle da qualidade dos materiais biológicos, foi utilizada uma segunda enzima como referência, a β -galactosidase, além da QT ter sido de grande importância para auxiliar no estabelecimento do diagnóstico.

Neste estudo, observou-se que os indivíduos com DG apresentaram 10,7% da atividade da β -gli em leucócitos em relação à atividade média dos indivíduos sem DG, o que está de

acordo com Michelin et al (2004). Beutler e Saven (1990) também já haviam observado uma variação na atividade desta enzima na faixa de 10% a 30% do normal.

V.3. Quitotriosidase (QT): O Biomarcador de Escolha no Diagnóstico Laboratorial para DG

Muitas proteínas séricas endógenas encontram-se variavelmente elevadas em pacientes com DG. A QT e outras proteínas como a enzima conversora da angiotensina (ECA) e a fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP) se correlacionam com a evolução da doença, podendo ter utilidade como adjuvantes para observações clínicas de monitoramento das respostas do paciente à TRE [Lacerda et al., 1999; Ida et al., 2001; Gaucher Registry, 2004]. Encontra-se em investigação outros biomarcadores possivelmente úteis para a DG, como a proteína de membrana associada a lisossomo (LAMP) e a quemoquina CCL18 [Whitfield et al., 2002; Boot et al., 2003].

Dessas proteínas séricas sabidamente elevadas na DG, a QT foi a mais estudada até os dias de hoje. Em 1994, Hollak e colaboradores, demonstraram uma surpreendente elevação da atividade da QT em plasma de pacientes com DG (100 a 500 vezes). A rota fisiológica desta endo β -glicosaminidase ainda não está bem elucidada, mas sabe-se que ela é secretada e ativada por macrófagos e está presente no fígado, rins, baço, pulmão e medula óssea [Hollak et al., 1994; Guo et al., 1995; Korolenko et al., 2000]. Foi observado que a atividade da QT diminui em resposta à TRE, e o decréscimo estava relacionado à dose, tendo se correlacionado com outros indicadores de respostas clínicas positivas, por exemplo, melhora nos parâmetros hematológicos e viscerais [Giraldo et al., 2001; Hollak et al., 2001]. Estudos realizados por Giraldo e colaboradores (2001) mostraram decréscimo médio de 40 a 70% na atividade de QT em pacientes com DG durante dois anos de tratamento. Hollak e colaboradores (2001) demonstraram decréscimo médio da atividade da QT de 32% em 12 meses de tratamento.

A medida da QT em plasma foi uma ferramenta auxiliar muito importante no diagnóstico da DG como de outras DL. Nos indivíduos com DG a atividade da QT apresentou-

se muito acima da normalidade (em média 269 vezes), como já havia sido descrito na literatura por Hollak e colaboradores (1994).

Além de estar com atividade aumentada nos pacientes com DG, a atividade da QT também estava aumentada em alguns indivíduos com atividade normal da β -gli (90 casos), conduzindo o estudo para a pesquisa de outras DL e estabelecendo outros diagnósticos, principalmente de doença de Niemann-Pick tipo A, B ou C.

Outro aspecto que chama atenção é a deficiência de atividade da QT em alguns indivíduos. A atividade da QT está ausente em um pequeno percentual de indivíduos (cerca de 6%), devido a uma deleção comum no gene desse biomarcador no cromossomo 1q 31-32 [Guo et al., 1995]. Neste estudo, esta deficiência correspondeu a 3,42% de toda a amostra analisada. Para tais pacientes, pode-se substituir a QT pela avaliação da atividade da ECA ou da TRAP, que em geral proporcionam resultados que se correlacionam com a QT [Czartoryska et al., 1998; Cabrera-Salazar et al., 2004].

Níveis absolutos de QT (ou de outros marcadores bioquímicos) não são indicativos da gravidade da doença em pacientes individuais, não são úteis para comparações entre pacientes e não tem significado prognóstico [Pastores et al., 2004]. Desta forma, esses biomarcadores não devem ser utilizados isoladamente na avaliação da gravidade da doença, e alterações ocorrentes num marcador talvez não se correlacionem necessariamente com alterações em outros, pois pacientes com DG com freqüência apresentam anormalidades bioquímicas, presumivelmente atribuíveis ao processo de depósito dos lipídios levando a diversas alterações em seu metabolismo [Robinson e Glew, 1980; Giraldo et al., 2000; Cox et al., 2001].

V.4. Análise das Mutações

O gene codificador da β -gli já foi clonado, mapeado na região 1q21 e seqüenciado [Sorge et al., 1985; Horowitz et al., 1989]. Foram identificados mais de 200 alelos mutantes, porém, sete são responsáveis pela maioria das alterações dos nucleotídios [Koprivica et al., 2000].

No âmbito da população de judeus Ashkenazi, onde a DG é muito freqüente (1/450 a 1/5000), as mutações mais comuns que afetam cerca de 90% dos pacientes sintomáticos são N370S, 84GG, L444P e IVS2+1. Na população não-judaica, a prevalência é consideravelmente mais baixa, e as mutações mais comuns são L444P, N370S, D409H, R463C e IVS2+1 [Horowitz et al., 1994; Barranger et al., 1995].

V.4.1. Fenótipo = Genótipo + Ambiente

Esta fórmula significa que somos (fenótipo), uma somatória daquilo que trouxemos para o mundo, através de nossos genes (genótipo), com aquilo que o mundo nos deu (ambiente). Assim sendo, devemos buscar no cerne do indivíduo, considerado em sua totalidade única, a mistura enigmática do inato com o adquirido, do biológico com o ambiental e/ou, finalmente, da pessoa com sua cultura.

Em suma, devemos entender por desenvolvimento as mudanças sofridas pela pessoa, ao longo de sua vida, resultantes de sua interação com o ambiente. O ambiente é, para o indivíduo, uma fonte de estímulos das mais variadas naturezas, estímulos que determinarão no indivíduo uma série de interações e respostas e estas, finalmente, determinarão mudanças significativas no curso de sua vida. Os estímulos sejam eles físicos, alimentares, sensoriais, cognitivos ou emocionais são necessários para a mudança da pessoa, mudança esta que pode ser entendida como desenvolvimento.

Lachmann e colaboradores (2004) relataram o caso de irmãs gêmeas monozigóticas, ambas com a homozigose N370S/N370S, nas quais uma foi diagnosticada aos 69 anos apresentando hepatoesplenomegalia, trombocitopenia e danos ósseos enquanto a outra irmã, assintomática, foi a óbito aos 84 anos. Os fatores não hereditários influenciam na expressão da DG em indivíduos geneticamente predispostos. É importante compreender a interação entre fatores hereditários e não hereditários para uma importante análise da patogênese e para o tratamento de indivíduos predispostos para DG [Lachmann et al.,2004]. A DG tipo 1 mostra uma grande variabilidade na gravidade e uma extensa expressão clínica, com isso muitos indivíduos os quais possuem dois alelos mutantes para a doença podem

apresentar-se levemente afetados ou mesmo assintomáticos. Mesmo com muito esforço nem sempre é possível prever a severidade do genótipo ou identificar aqueles pacientes destinados a desenvolver a forma grave e iniciar o tratamento precocemente [Lachmann et al., 2004].

Neste estudo não foi possível realizar uma pesquisa correlacionando o ambiente dos indivíduos com seu genótipo, devido a estes serem oriundos de diversos estados brasileiros, o que dificultaria expressar estes resultados com fidelidade.

V.4.2. Correlação Genótipo - Fenótipo

Aproximadamente 200 mutações no gene da β -gli estão associadas à DG, sendo que a correlação genótipo-fenótipo nem sempre é bem definida, mas somente um pequeno grupo delas acomete cerca de 97% da população de origem não judaica [Beutler e Grabowski, 2001; Alfonso et al., 2002; Dvir et al., 2003]. A existência de distintas mutações no gene da β -gli pode explicar parcialmente a heterogeneidade na expressão da DG tipo 1 [Barranger e Ginns, 1989; Tsuji et al., 1988].

As mutações que se destacam em prevalência na DG são as 2 mutações de ponto, a N370S e a L444P. A primeira é causada por uma troca de A \rightarrow G no exon 9 do gene da β -gli, que determina a substituição do aminoácido asparagina por serina no resíduo 370 da proteína. A mutação L444P deve-se a troca de T \rightarrow C no exon 10 do gene, que leva à substituição do aminoácido leucina por prolina no resíduo 444 da proteína [Tsuji et al., 1988; Zimran et al., 1989; Zimran et al., 1991; Dvir et al., 2003; Beutler e Gelbart, 1996]. No Brasil, as mutações mais freqüentes coincidem com as mais comuns referidas na literatura internacional: N370S e L444P [Pires e Sobreira, 2004].

Há uma forte relação entre as mutações encontradas e as manifestações clínicas da doença. Com base nos efeitos funcionais e a associação com o fenótipo da DG, é possível classificar estas mutações em 2 grupos: as mutações associadas com a doença neuropática (por exemplo a L444P quando em homozigose), denominadas graves e aquelas não associadas com a doença neuropática que, mesmo quando encontradas em combinação

com uma mutação grave, são denominadas brandas (por exemplo a N370S) [Beutler e Grabowski, 2001]. Desta forma, o genótipo pode ajudar na previsão da gravidade nos pacientes. Exemplificando, homozigose para o alelo N370S está associada a um fenótipo menos grave, embora com ampla variabilidade clínica; estado de heterozigose para N370S tem ação protetora contra envolvimento do sistema nervoso central; e o alelo L444P no estado de homozigose está freqüentemente, mas nem sempre, associado a sintomas neurológicos precoces, mais comuns nas classificações clínicas dos tipos 2 e 3 [Zimran et al., 1989; Grabowski, 1993; Sibille et al., 1993]. Há casos de alelos raros em que tal associação é mais difícil por haver poucos pacientes afetados disponíveis para estudo.

A análise das mutações é particularmente útil para determinar se membros da família são portadores de mutações conhecidas, podendo também ser empregada para diagnosticar com precisão pacientes com DG que estejam assintomáticos [Barranger et al., 1995].

Uma vez determinada a mutação presente nos indivíduos com DG ou nos heterozigotos, investigamos a correlação genótipo-fenótipo bioquímico da enzima β -gli. Os aspectos avaliados foram: pH ótimo, Km e Vmax da reação enzimática e termoestabilidade da enzima a 60°C.

a) Correlação Genótipo - pH ótimo da β -gli

Estudos bioquímicos têm demonstrado uma extensiva heterogeneidade nas características da β -gli, sugerindo com isto, estudos mais aprofundados em relação ao comportamento enzimático e às características da doença, já que, pouco se sabe sobre o comportamento bioquímico e cinético desta enzima em leucócitos.

A β -gli de indivíduos normais (grupo controle) mostrou uma faixa de pH ótimo que variou de 5,0 a 5,4 e não um único pH ótimo, o que está de acordo com estudos prévios [Glew et al., 1985; Michelin et al., 2004]. Provavelmente este achado deva-se à existência de isoenzimas, formas múltiplas de β -gli, que possuem a mesma atividade biológica, mas diferentes estruturas moleculares as quais resultam em propriedades cinéticas distintas [Carrol M., 1981; Saito et al., 1982; Glew et al., 1985; Michelin et al., 2004].

Em contraste, dois picos distintos de pH ótimo foram observados no grupo de homocigotos, nas mutações analisadas (N370S/N370S, N370S/L444P, N370S/IVS2+1 e N370S/D409H). Este achado também já havia sido observado anteriormente [Michelin et al., 2004], o que nos leva a pensar que isto seja o resultado da presença das duas isoenzimas da β -gli nestas células, uma forma solúvel e uma forma ligada à membrana.

No grupo de heterocigotos também se observou um pH ótimo variável para a enzima dos indivíduos com as mutações analisadas. Alguns mostraram um único pH ótimo como aqueles com as mutações N370S e L444P, mas outros apontaram uma estreita faixa de pH ótimo (D409H e IVS2+1). Se levamos em consideração a presença de isoenzimas, podemos supor que nestes dois últimos grupos de indivíduos elas possam estar presentes.

As isoenzimas, formas múltiplas da β -gli, possuem a mesma atividade biológica, porém apresentam diferenças na estrutura molecular, o que acarreta em propriedades cinéticas diferentes, impedindo o aparecimento de um único pH ótimo.

A existência de duas isoenzimas da β -gli de leucócitos normais, já foi proposta por Beutler e Kuhl (1970) e Carrol (1981). Este último autor propôs a existência de duas β -gli ligadas à membrana celular dos leucócitos.

Em 1987, Maret e colaboradores, em estudos com linfócitos de indivíduos normais, também propuseram a existência de duas isoenzimas da β -gli, mas, ao contrário de Carrol (1981), uma estaria ligada à membrana e a outra seria solúvel. Tanto Maret e colaboradores, quanto Carrol, concluem afirmando que não há um único pH ótimo para a enzima, mas sim uma faixa de pH correspondendo as duas isoenzimas, o que está de acordo com os nossos dados.

Pelo acima exposto, acreditamos que cada um destes pH ótimos reflita o comportamento de uma isoenzima, o que estaria de acordo com aqueles pesquisadores que propõem a existência de uma β -gli solúvel e outra ligada a membrana, neste tipo de célula [Saito et al., 1982].

b) Correlação Genótipo - Km/ Vmax da β -gli

Quando se observa o Km e a Vmax de todos os grupos estudados é importante levar em consideração as propriedades catalíticas bem como a estabilidade da β -gli, pois a mutação pode gerar efeitos distintos nesta proteína e cada grupo pode comportar-se, portanto, conforme estas propriedades, refletindo diretamente no fenótipo da DG.

O homocigoto N370S/N370S apresentou um alto valor de Km e uma Vmax diminuída quando comparado com a enzima de indivíduos normais e aquela dos heterocigotos N370S. Embora a proteína produzida pelo alelo mutante em homocigose tenha apresentado uma menor afinidade pelo substrato, ela parece ser estável e cataliticamente ativa, conforme já havia sido descrito [Beutler and Kuhl, 1970].

A mutação L444P, quando em heterocigose com a mutação N370S, apresentou os menores valores de Km e de Vmax encontrados entre os três grupos de homocigotos para DG analisados. Estes resultados talvez possam ser explicados por uma mais baixa estabilidade da proteína produzida, já que a mutação L444P quando em homocigose gera uma proteína instável e de baixa atividade [Glew et al., 1985; Chabás et al., 1995].

A mutação IVS2+1, que substitui G \rightarrow A no exon 2 do gene da β -gli, quando em homocigose produz um efeito catalítico e uma estabilidade nula na enzima, refletindo em um fenótipo grave. Na presença da N370S ocorre um abrandamento desta situação [Beutler and Grabowski, 2001]. Isto está de acordo com nossos resultados. O Km e a Vmax observados neste estudo para a enzima produzida pelos alelos N370S/IVS2+1 foram diferentes daqueles da enzima normal, mas iguais aos da enzima dos alelos N370S/N370S.

A mutação N370S quando presente em heterocigose com o alelo normal apresentou um Km e Vmax muito semelhantes aos resultados encontrados em indivíduos normais. Este fato ocorre, provavelmente, porque mesmo a N370S estando presente no exon 9 onde está localizado o sítio ativo da β -gli [Beutler and Kuhl, 1970], permite processar uma forma de 56 KDa, produzindo uma proteína estável [Glew et al., 1985]. Esta forma estável possui atividade catalítica e estabilidade o que pode levar-nos a observar características semelhantes entre estes dois grupos.

O Km da enzima no grupo L444P foi significativamente maior que aquele da β -gli no grupo controle embora as Vmax não tenham sido diferentes. Esta mutação ocorre no exon 10, onde também está localizado o sítio ativo da enzima [Beutler e Kuhl, 1970]. Segundo alguns autores [Glew et al., 1985, Chabás et al., 1995] a presença da mutação L444P nos dois alelos expressa uma proteína mutante com uma variedade de anormalidades na cinética, estabilidade ou processamento da enzima residual. Talvez quando em heterozigose com o alelo normal, esta mutação possa estar interferindo com a afinidade da enzima pelo substrato artificial.

Já a mutação D409H também em heterozigose com o alelo normal, apresentou tanto um aumento significativo no Km quanto na Vmax da reação enzimática quando comparada com a enzima de leucócitos de indivíduos normais. Esta mutação é causada por uma troca de G \rightarrow C no exon 9 do gene da β - gli, a qual determina a substituição do aminoácido aspartato por histidina no resíduo 409 da proteína. Quando em homozigose, ela expressa somente cerca de 0,5% ou menos de atividade enzimática, pois a proteína produzida é muito instável. Há trabalhos que demonstram que quando a mutação N370S está presente em um dos alelos (N370S/D409H), gera uma certa estabilidade e proteção para a enzima, o que confere maior atividade catalítica [Glew et al., 1985; Beutler e Grabowski, 2001]. Se pensarmos que esta certa estabilidade possa estar sendo conferida pela presença do alelo normal, poderíamos justificar a atividade e as diferenças encontradas.

c) Correlação Genótipo - Termoestabilidade da β -gli

Todas as enzimas estudadas perderam atividade quando submetidas a uma pré-incubação a 60°C. O que diferiu foi o momento em que começou a ocorrer esta inativação e o comportamento, mais resistente ou não à temperatura, ao longo do tempo.

Ao final dos 60 minutos de pré-incubação a 60°C a atividade residual da enzima normal e daquelas produzidas por alelos mutantes em heterozigose com o alelo normal foi a mesma. As diferenças na estrutura e propriedades catalíticas das enzimas produzidas por alelos mutantes, talvez possam explicar o comportamento das mesmas ao longo do período de pré-incubação.

Beutler e Kuhl, em 1970, já haviam estudado o efeito da temperatura (45°C) sobre a β -gli de leucócitos, utilizando meio de incubação tamponado em pH 4,0. Após 60 minutos de pré-incubação, estes autores observaram que tanto a enzima de indivíduos normais quanto aquela de indivíduos com DG, era inativada aproximadamente 40% em relação à enzima não submetida à desnaturação (100% de atividade). Neste trabalho não foi possível, portanto, a diferenciação dos dois grupos de indivíduos, nas condições experimentais empregadas.

Em 1980, Yaqoob e Carroll desenvolveram um trabalho semelhante com células do baço. A enzima de pacientes com DG, presente neste tecido foi desnaturada aproximadamente 25% quando incubada a 52,5°C.

Neste trabalho propôs-se uma temperatura mais alta do que aquelas citadas na literatura, visando uma maior desnaturação enzimática, o que talvez levasse a uma resposta diferente entre os grupos de indivíduos em estudo.

No grupo de homozigotos observou-se que todas as enzimas foram mais termoestáveis quando comparadas com a dos outros grupos. Após os primeiros cinco minutos, as enzimas mutantes parecem possuir uma maior resistência à perda de atividade e estes dados estão de acordo com Michelin e colaboradores (2004). Confirmando o que já foi discutido anteriormente em relação ao centro catalítico/estabilidade, podemos observar uma maior estabilidade da mutação N370S/N370S frente ao calor quando comparada com a mutação N370S/L444P. Como a L444P, quando em homozigose, gera uma proteína mais instável, conseqüentemente há uma termolabilidade maior que a mutação N370S em homozigose, que processa uma proteína mais estável. Ao final do período observa-se que a enzima produzida pelos alelos N370S/N370S difere significativamente daquela produzida pelos alelos N370S/L444P e da enzima normal.

Ao final dos 60 minutos de pré-incubação a 60°C a atividade residual da enzima normal e daquelas produzidas por alelos mutantes em heterozigose com o alelo normal foi a mesma. As diferenças na estrutura e propriedades catalíticas das enzimas produzidas por alelos mutantes, talvez possam explicar o comportamento das mesmas ao longo do período de pré-incubação. As enzimas produzidas pelos alelos L444P e IVS2+1 foram mais estáveis ao longo do tempo quando comparadas com as demais.

Os heterozigotos com a mutação IVS2+1 ou del55pb também tiveram a β -gli inativada significativamente a partir de 1 minuto de pré-incubação. Aqueles com a mutação N370S ou L444P tiveram a enzima inativada significativamente somente após 2 minutos de pré-incubação a 60°C, enquanto aqueles com a mutação D409H apresentaram inativação enzimática significativa somente após 4 minutos de pré-incubação.

Observando os primeiros 5 minutos de pré-incubação a 60°C, verificou-se que a β -gli de indivíduos normais apresentou um comportamento semelhante àquele da dos heterozigotos com a mutação D409H, diferindo dos demais grupos. Após este tempo, a enzima normal diferiu somente daquela dos heterozigotos com a mutação L444P na qual há uma menor estabilidade e atividade catalítica.

Quando os cinco grupos de heterozigotos para a DG foram confrontados em relação à inativação térmica, pôde-se observar que somente aqueles com a mutação L444P diferiram, após 10 minutos de pré-incubação, dos heterozigotos para as mutações N370S e IVS2+1.

d) Correlação Genótipo-Fenótipo – Estabilidade da β -gli

Os resultados deste estudo mostraram que a mutação N370S produziu uma enzima mais estável e cataliticamente mais ativa que aquela da mutação L444P. Esta, por sua vez, foi mais estável e ativa do que a da mutação D409H. O mesmo aconteceu com os indivíduos homozigotos para DG, onde o comportamento bioquímico da β -gli parece ter sido determinado pela presença do alelo N370S. De modo geral, pode-se inferir que do ponto de vista da cinética enzimática, tem-se um gradiente de estabilidade que vai de uma condição mais estável (presença da mutação N370S) a uma condição menos estável (presença da mutação D409H). Este gradiente cinético apresenta-se semelhante aquele da classificação do fenótipo clínico da DG. Com isto, pode-se correlacionar diretamente a mutação N370S, mais estável cineticamente, com a apresentação clínica não neurológica da doença e a mutação menos estável cataliticamente (D409H) com a apresentação clínica neurológica da DG.

O estudo das propriedades cinéticas e físico-químicas da β -gli, associado aos diferentes genótipos da DG poderá nos levar a uma melhor compreensão sobre a

repercussão das diferentes mutações na função desta proteína possibilitando, talvez, prever a gravidade desta complexa desordem metabólica, permitindo planejar antecipadamente a intervenção individual mais adequada.

V. 5. Considerações Finais

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define saúde como “um estado de completo bem-estar físico, mental, e social, e não meramente a ausência de doença ou enfermidade”. Quando a qualidade de vida é considerada em situações clínicas, o enfoque deve recair na percepção do impacto da doença e do tratamento nas múltiplas dimensões da saúde, inclusive bem-estar físico e psicológico, e nos desempenhos das atividades.

Ainda tem-se muito a pesquisar e elucidar sobre propriedades cinéticas e físico-químicas desta hidrolase lisossomal relacionadas com a natureza molecular da DG. Isto então, levará à compreensão da função desta proteína mutante possibilitando, talvez, prever a gravidade desta desordem metabólica tão complexa.

VI. CONCLUSÕES

1) A partir do protocolo empregado foi possível identificar 412 casos de DG (38,1% da amostra) e 6,1% de outros EIM como Niemann-Pick A ou B (36 casos), Niemann-Pick C (8 casos) e 5,5% de heterozigotos para DG. Em 508 (47%) indivíduos não foi possível detectar nenhuma DL ou outro EIM e em outros 36 indivíduos (3,3%) não houve a possibilidade de prosseguir a investigação devido à quantidade de material enviada ser insuficiente ou inadequado para análise.

2) Entre os 412 casos de DG, 57,6% foram do sexo feminino e 42,4% do sexo masculino. O diagnóstico bioquímico foi realizado entre 7 meses e 72 anos de idade, com uma média de idade de 19 anos. Neste grupo, somente 239 indivíduos mencionaram consangüinidade entre os pais, resultando em uma percentagem de 3,1%.

3) A atividade da β -gli em leucócitos de indivíduos com DG variou de 0 a 5,9 nmol/h/mg de proteína. Neste estudo, observou-se que indivíduos com DG apresentaram 10,7% da atividade da β -gli em leucócitos, quando comparados com a média da atividade enzimática encontrada em indivíduos sem DG. O grupo de heterozigotos apresentou atividade de 5 a 9 nmol/h/mg de proteína e o grupo de indivíduos normais para DG mostrou uma atividade que variou de 9 a 39 nmol/h/mg de proteína.

4) Os indivíduos com DG apresentaram uma atividade de QT que variou de 112 a 108.940 nmol/h/mL. O grupo de heterozigotos para DG mostrou uma atividade de 10 a 358 nmol/h/mL e o grupo de indivíduos sem a DG apresentou uma faixa de atividade enzimática que oscilou de 0 a 132 nmol/h/mL.

5) Foram analisadas as mutações de 128 indivíduos com DG, sendo que a mutação N370S/L444P foi a mais freqüente, 62/128 (48,4%) e a mutação N370S/? foi identificada em 21,9% destes indivíduos (28/128). As mutações N370S/N370S, L444P/?, L444P/L444P,

N370S/IVS2+1, N370S/D409H, L444P/N188S, foram encontradas em 7,8% (10/128), 7,0% (9/128), 0,78% (1/128), 0,78% (1/128), 0,78% (1/128) e 0,78% (1/128), respectivamente.

6) A enzima de indivíduos normais apresentou uma faixa de pH ótimo que variou de 5,0 a 5,4. Dentro desta faixa de pH ótimo encontraram-se também os pH ótimos dos diversos grupos de heterozigotos, ou seja, N370S pH 5,23, L444P pH 5,32, IVS2+1 pH 5,3 a 5,5 e D409H pH 5,0 a 5,2. Nos indivíduos com DG cujas mutações analisadas foram N370S/N370S, N370S/L444P, N370S/IVS2+1 e N370S/D409H, foram observados dois picos de pH ótimo, ou seja, 5,2 e 5,8; 5 e 5,5; 5,1 e 5,4; 5,3 e 5,5, respectivamente.

7) Em leucócitos de indivíduos normais, observou-se que o Km da reação enzimática foi 6,04 mmol/L. Os heterozigotos N370S apresentaram um Km de 7,18 mmol/L semelhante aquele da enzima normal, mas difere dos demais heterozigotos (L444P=12,4 mmol/L e D409H = 37,2 mmol/L). Os homozigotos N370S/L444P possuem um Km de 2,97 mmol/L, diferente dos grupos N370S/N370S (Km=12,37 mmol/L) e N370S/IVS2+1 (Km=18,43 mmol/L).

8) A Vmax da enzima normal (13,31 nmol/h/mg de proteína) difere daquela de todos os grupos de homozigotos para DG estudados (N370S/N370S= 1,27 nmol/h/mg de proteína; N370S/L444P= 0,40 nmol/h/mg de proteína; N370S/IVS2+1= 1,11 nmol/h/mg de proteína. Quando comparou-se com os heterozigotos, observou-se que ela é semelhante aquela dos heterozigotos N370S (12,75 nmol/h/mg de proteína) e L444P (14,87 nmol/h/mg de proteína), mas difere do grupo D409H (27,95 nmol/h/mg de proteína).

9) A enzima β -gli de leucócitos de indivíduos normais, heterozigotos e homozigotos para DG, foi inativada a 60°C, permanecendo durante os 60 minutos de pré-incubação nesta temperatura. As diferenças de comportamento entre as enzimas dos três grupos analisados permitiu diferenciá-las, ou seja, a enzima de indivíduos homozigotos apresentou uma maior atividade residual sendo mais termoestável que os grupos de indivíduos normais e heterozigotos.

10) A mutação N370S produziu uma enzima mais estável e cataliticamente mais ativa que aquela da mutação L444P. Esta, por sua vez, foi mais estável e ativa do que a da mutação D409H. O mesmo aconteceu com os indivíduos homocigotos para DG, onde o comportamento bioquímico da β -gli foi determinado pela presença do alelo N370S. Há um gradiente de estabilidade que vai de uma condição mais estável (presença da mutação N370S) a uma condição menos estável (presença da mutação D409H). Este gradiente assemelha-se aquele da classificação do fenótipo clínico da DG. Com isto, pode-se correlacionar diretamente a mutação N370S, mais estável cineticamente, com a apresentação clínica não neurológica da doença e a mutação menos estável cataliticamente (D409H) com a apresentação clínica neurológica da DG.

11) Através deste trabalho foi possível obter informações importantes sobre o comportamento da proteína em cada mutação estudada, seja ela em homo ou em heterocigose e estes dados talvez possam servir para uma melhor distinção entre a enzima de indivíduos normais, heterocigotos e homocigotos para DG.

VII.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aerts JM, Hollak C, Boot R, Groener A Biochemistry of glycosphingolipid storage disorders: implications for therapeutic intervention. *Philos Trans R Soc Lond B*, 2003; 358: 905-914.

Aghion H. La maladie de Gaucher dans l'enfance. Ph.D. Thesis. Paris, 1934.

Agranoff BM, Radin NW, Suomi W, Enzymic oxidation of cerebroside: studies on Gaucher's disease. *Biochim Biophys Acta*, 1962; 57: 194-196.

Aguilera B, Ghauharali-van der Vlugt K, Helmond MT, Out Jm, Donker-Koopman WE, Grocner JE, Boot RG, Renkema GH, van der Marel GA, van Boom JH, Overkleeft HS, Aerts JM. Transglycosidase activity of chitotriosidase: improved enzymatic assay for the human macrophage chitinase. *J Biol Chem*, 2003; 278: 40911-40916.

Allen MJ, Myer BJ, Khokher AM, Rushton N, Cox TM. Pro-inflammatory cytokines and the pathogenesis of Gaucher's disease: increased release of interleukin-6 and interleukin-10. *Q J Med*, 1997; 90: 19-25.

Alfonso P, Cenarro A, Pérez-Calvo JI, Giralt M, Giraldo P and Pocoví M. Mutation Prevalence among 51 Unrelated Spanish Patients with Gaucher Disease: Identification of 11 Novel Mutations. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, 2002; 29:1 35-40.

Alterini R, Rigacci L, Stafanacci S. Pseudo-Gaucher cells in the bone marrow of a patient with centrocytic nodular non-Hodgkin's Lymphoma. *Hematologica*, 1996; 81: 282-283.

Andersen MD, Jensen A, Robertus JD, Leah R, and Skriver K. 1997. Heterologous expression and characterization of wild-type and mutant forms of a 26kDa endochitinase from barley (*hordeum vulgare*). *Biochem J*, 1997 322: 815-822.

Athens JW. Desordens envolvendo o sistema de monócitos-macrófagos- "Doenças de Armazenamento". In: Wintrobe MM, Ed *Hematologica Clínica*, São Paulo, editora Manole, 1998, pp. 1787-1799.

- Barranger JA and Ginns EI. Glucosylceramide lipidoses: Gaucher disease, In Scriver CR (eds): The Metabolic Basis of Inherited disease (ed 6). New York, NY, McGraw-Hill, 1989, pp 1677-1698.
- Barranger JA and Rice E. An overview of Gaucher disease. Gaucher Clinical Perspectives, 1993; 1 (1): 1-5.
- Barranger JA, Rice E, Sakallah AS, Sansieri C, Mifflin TE, Cooper DL. Enzymatic and molecular diagnosis of Gaucher disease. Clin Lab Med, 1995, 15: 899-913.
- Barton NW, Furbish FS, Murray GJ, Garfield M, Brady RO. Therapeutic response to intravenous infusions of glucocerebrosidase in patient with Gaucher disease. Proc Nat Acad Sci USA, 1990; 87: 1913-1916.
- Barton NW, Brady RO, Dambrosia JM, Di Bisceglie AM, Doppelt SH, Hill SC, Mankin HJ, Murray GJ, Parker RJ, Argoff CE. Replacement therapy for inherited enzyme deficiency-macrophage-targeted glucocerebrosidase for Gaucher's disease. N Engl J Med, 1991; 324: 1464-1470.
- Basu A, Glew RH, Daniels LB, Clark LS: Activators of spleen glucocerebrosidase from controls and patients with various forms of Gaucher's disease. J Biol Chem, 1984; 259: 1714.
- Beutler E and Kuhl W. The diagnosis of the adult type of Gaucher's disease and its carrier state by demonstration of deficiency of β -glucosidase activity in peripheral blood leukocytes. J Lab Clin Med, 1970; 76: 747-754.
- Beutler E, Kuhl W, Trinidad F, Teplitz RL, Nadler HL. Beta-glucosidase activity in fibroblasts from homozygotes and heterozygotes for Gaucher disease. Am J Hum Genet, 1971; 23: 62-68.

- Beutler E and Saven A. Missue of marrow examination in the diagnosis of Gaucher disease. *Blood*, 1990; 76: 646-648.
- Beutler E and Gelbart T. Glucocerebrosidase (Gaucher Disease). *Human mutation*, 1996; 8: 207-213.
- Beutler E. Gaucher disease. *Arch Intern Med*, 1999; 159(8): 881-882.
- Beutler E and Grabowski GA. Gaucher disease. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. New York: McGraw-Hill; 2001 p. 3635-3668.
- Boot RG, Verhoek M, De Fost M, Hollak CE, Maas M, Bleijlevens B et al., Marked elevation of the chemokine CCL18/PARC in Gaucher disease: A novel surrogate marker for assessing therapeutic intervention. *Blood*, 2003; 103:33-39.
- Bradova V, Smid F, Ulrich-Bott B, Roggendorf W, Paton BC and Harzer K. Prosaposin deficiency: further characterization of the sphingolipid activator protein-deficient sibs. Multiple glycolipid elevation (including lactosylceramidosis), partial enzyme deficiencies and ultrastructure of the skin in this generalized sphingolipid storage disease. *Hum Genet*, 1993; 92: 143-152.
- Brady RO, Kanfer JN, Shapiro D. Metabolism of glucocerebrosidase. II Evidence of an enzymatic deficiency in Gaucher's disease. *Biochem Biophy Res Commum*, 1965; 18: 221-224.
- Brady RO and Barton NW. Enzyme replacement therapy for Gaucher's disease: critical investigations beyond demonstration of clinical efficacy (minireview). *Biochem Med and Metabol Biol*, 1994; 52: 1-9.

- Brunngraber EG, Berra B, Zambotti V. Altered levels of tissue glycoproteins, gangliosides, glycosaminoglycans and lipids in Niemann-Pick's disease. *Clin Chim Acta*, 1973, 48: 173-181.
- Burns GF, Cawley JC, Flemans RJ, Higgy KE, Worman CP, Barker CR, Roberts BE and Hayhoe FG. Surface marker and other characteristics of Gaucher's cell. *J Clin Pathol*, 1977; 30: 981-988.
- Butters TD. New therapeutics for the treatment of glycosphingolipid lysosomal diseases. *Adv Exp Med Biol*, 2003; 535: 219-226.
- Butters TD, Mellor HR, Narita K, Dwek RA and Platt FM. Small-molecule therapeutics for the treatment of glycolipid lysosomal storage disorders. *Phil Trans R Soc Lond B*, 2003; 358: 927-945.
- Cabrera-Salazar MA, O'Rourke E, Henderson N, Wessel H, Barranger JA. Correlation of surrogate markers of Gaucher disease. Implications for long-term follow up of enzyme replacement therapy. *Clin Chim Acta*, 2004; 344:101-107.
- Carroll M. Genetic heterogeneity of membrane-bound β -glucosidase in Gaucher's disease. *J Inher Met Dis*, 1981; 4:11-13.
- Chabás A, Cormand B, Grinberg D, Burguera JM, Balcells S, Merino JL, Mate I, Sobrino JÁ, González-Duarte R, Vilageliu L. Unusual expression of Gaucher's disease: Cardiovascular calcifications in three sibs homozygous for the D409H mutation. *J Med Genet*, 1995; 32: 740-742.
- Charrow J, Andersson HC, Kaplan P, Kolodny EH, Mistry P, Pastores G, Rosenbloom BE, Scott CR, Wappner RS, Weinreb NJ, Zimran A. The Gaucher Registry: demographics and

disease characteristics of 1698 patients with Gaucher disease. *Arch Intern Med*, 2000; 160: 2835-2843.

Chester MA. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) – nomenclature of glycolipids-recommendations. *Glycoconjugate J*, 1999; 16: 1-6.

Christomanou H, Aignesberg A and Linke RP. Immunochemical Characterization of two activator stimulating enzymic sphingomyelin degradation in vitro. Absence of one of them in a human Gaucher disease variant. *Biol Chem Hoppe-Seyler*, 1986; 367: 879-890.

Coelho JC and Giugliani R. Fibroblasts of skin fragments as a tool for the investigation of genetic diseases: technical recommendations. *Genet Mol Biol*, 2000; 23: 269-271.

Conzelman E and Sandoff K. Partial enzyme deficiencies: residual activities and the development of neurological disorders. *Dev Neurosci*, 1983/1984; 6: 58-71.

Cox TM. Gaucher disease: Understanding the molecular pathogenesis of sphingolipidoses. *J Inherited Metab Dis*, 2001; 24 Suppl 2: 106-21; discussion 87-88.

Cox TM. Future perspectives for glycolipids research in medicine. *Phil Trans R Soc Lond B*, 2003; 358: 967-973.

Czartoryska B, Tyłki-Szymanska A, Gorska D. Serum chitotriosidase activity in Gaucher patients on enzyme replacement therapy (ERT). *Clin Biochem*, 1998; 31: 417-420.

Czartoryska B, Tyłki-Szymanska A, Lugowska A. Changes in serum chitotriosidase activity with cessation of replacement enzyme (cerebrosidase) administration in Gaucher disease. *Clin Biochem*, 2000; 33: 147-149.

- Danks DM. Inborn errors of metabolism- A review of some general concepts. Aust. NZJ Med, 1981; 11: 309-320.
- Desnick RJ. Enzyme replacement and enhancement therapies for lysosomal diseases. J Inherited Metab Dis, 2004; 27: 385-410.
- Dvir H, Harel M, McCarthy AA, Toker L, Silman I, Futerman AH and Sussman JL. X-ray structure of human acid β -glucosidase, the defective enzyme in Gaucher disease. EMBO reports, 2003; 4: 704-709.
- Elstein D, Abrahamov A, Hadas-Halpern I, Ziram A. Withdrawal of enzyme replacement therapy in Gaucher's disease. Br J Haematol, 2000; 110:488-492.
- Erikson A. Neuronopathic forms of Gaucher disease. Workshop of the European Working Group on Gaucher Disease, Trieste, Italy, October, 1994; 13-16.
- Esplin JA. Overview: Gaucher Disease, Molecular, medicine & Therapeutics. Gaucher Clinical Perspectives, 1994; 2: 1-16.
- Fallet S, Sibille A, Mendelson R, Shapiro D, Hemann G, Grabowski GA. Enzyme argumentation in moderate to life-threatening Gaucher disease. Pediatr Res, 1992; 31: 496-500.
- Fischer G and Jatzkewitz H. The activator of cerebroside sulphatase. Purification from human liver and identification as a protein. Hoppe-Seyler Z Physiol Chem, 1975; 356: 605-613.
- Fried K. Population study of chronic Gaucher's disease. Isr J Med Sci, 1973; 9: 1396-1398.
- Furbish FS, Blair HE, Shiloach J, Pentcher PG & Brady RO. Enzyme replacement therapy in Gaucher's disease: large-scale purification of glucocerebrosidase suitable for human administration. Proc Natl Acad Sci USA, 1977; 74: 3560-3563.

Fürst W, Machleidt W and Sandhoff K. The precursor of sulfatide activator protein is processed to three different proteins. *Biol Chem Hoppe-seyler*, 1988; 369: 317-328.

Fürst W, Schubert J, Machleidt W, Meyer EH and Sandhoff K. The complete amino-acid sequences of human ganglioside GM2-activator protein and cerebroside sulfate activator protein. *Eur J Biochem*, 1990; 192: 709-714.

Furukawa K. Glycosphingolipids in engineered mice: insights into function and generation of disease models. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2004, 15.

Fusetti F, von Moeller H, Houston D, Rozeboom HJ, Dijkstra BW, Boot RG, Aerts JM, van Aalten DM. Structure of human chitotriosidase. Implications for specific inhibitor design and function of mammalian chitinase-like lectins *J Biol Chem*, 2002 Jul 12; 277(28):25537-25544.

Futerman AH and van Meer G. The cell biology of lysosomal storage diseases. *Nature Rev Mol Cell Biol*, 2004, 5(7): 554-565.

Gaucher PCE. De l'epithelioma primitif de la rate hypertrophie idiopathique de la rate sans leucemie. *Faculte de Medecine. These de Paris*, 1882, p. 31.

Gaucher Registry. Available at: <http://www.lsdregistry.net/gaucherregistry>, 2004.

- Germain DP. La maladie de Gaucher: aspects cliniques, génétiques et thérapeutiques
Gaucher disease: clinical, genetic and therapeutic aspects. *Pathologie Biologie*, 2004a;
52: 343-350.
- Germain DP. Gaucher's disease: a paradigm for interventional genetics. *Clin Genet*, 2004b;
65 (2): 77-86.
- Gimenez-Sanchez G, Childs B, Valle D. The effect of Mendelian disease on human health. In:
The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed. New York, McGraw-Hill
2000.
- Giraldo P, Pocovi M, Perez-Calvo J, Rubio-Felix D, Giral M. Report of the Spanish Gaucher'
Disease Registry: Clinical and genetic characteristics. *Haematologica*, 2000; 10: 691-709.
- Giraldo P, Cenarro A, Alfonso P, Perez-Calvo JI, Rubio-Felix D, Giral M, Pocovi M.
Chitotriosidase genotype and plasma activity in patients with type 1 Gaucher disease and
their relatives (carriers and non carriers). *Haematologica*, 2001; 86: 977-984.
- Giugliani R. Erros Inatos do Metabolismo no Período Neonatal, capítulo 58. In: Miura E,
Procianoy R. Neonatologia. Princípios e Prática, 2^a ed. Porto Alegre. Artes Médicas, 1997,
pp 254-267.
- Glew RH, Basu A, Prenc M and Remaley AT. Lysosomal storage diseases: Biology of
Disease. *Lab Invest*, 1985; 53 (3):250-269.

- Grabowski GA, Gatt S, Kruse J, Desnick RJ. Human lysosomal beta-glucosidase: Kinetic characterization of the catalytic, aglycon and hydrophobic binding sites. *Arch Biochem Biophys*, 1984; 231: 144-147.
- Grabowski GA. Gaucher disease: enzymology, genetics and treatment. In Harris H Hirschhorn K, eds. *Advances in Human Genetics*, Plenum Press, 1993; 377-441.
- Grabowski GA. Genotype-phenotype correlations in Gaucher disease. NIH Technology Assessment Conference on Gaucher disease: Current issues in diagnosis and treatment, 1995; February 27- March 1.
- Grabowski GA, Barton NW, Pastores G, Dambrosia JM, Banerjee TK, McKee MA, Parker C, Schiffmann R, Hill SC, Brady RO. Enzyme therapy in Type 1 Gaucher disease comparative efficacy of mannose-terminated glucocerebrosidase from natural and recombination sources. *Ann Intern Med*, 1995; 122: 33-39.
- Grabowski GA. Current issues in enzyme therapy for Gaucher disease. *Drugs*, 1996; Aug, 52 (2): 159-167.
- Grabowski GA and Horowitz M. Gaucher's disease: molecular, genetic and enzymological aspects. *Baillieres Clin Haematol*, 1997; 10: 635-656.
- Grace ME, Goldberg L, Berg A and Grabowski GA. Gaucher disease: dissection of the enzymatic pathology by site-directed mutagenesis and expression of acid β -glucosidase cDNAs. *Am J Hum Genet*, 1989; 45, A.190.
- Grace ME, Berg A, He GS, Goldberg L, Horowitz M, Grabowski GA. Gaucher disease heterologous expression of two alleles associated with neuronopathic phenotypes. *Am J Hum Genet*, 1991; 49: 646-655.

Grace ME, Newman KM, Scheinkert V, Berg-Fussmann A, Grabowski GA. Analysis of human acid b-glucosidase by site-directed mutagenesis and heterologous expression. *J Biol Chem*, 1993; 296: 2283-2291.

Guo Y, He W, Boer AM, Wevers RA, de Bruijn AM, Groener JE, Hollak CE, Aerts JM, Galjaard H, van Diggelen OP. Elevated plasma chitotriosidase activity in various lysosomal storage disorders. *J Inherited Metab Dis*, 1995; 18: 717-722

Halliday N, Deuel HJ, Tragerman LJ, Ward WE. On isolation of glucose-containing cerebroside from spleen in a case of Gaucher'disease. *J Biol Chem*, 1940; 132: 171-176.

Hara A, Kitazawa N, Taketomio T. Abnormalities of glycosphingolipids in mucopolysaccharidosis type III B. *J Lipid Res*, 1984; 25: 175-184.

Hiesberger T, Hüttler S, Rohlmann A, Schneider W, Sandhoffm K and Herz J. Cellular uptake of saposin (SAP) precursor and lysosomal delivery by the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). *EMBO J*, 1998; 17: 4617-4625.

Hillborg PO, Morbus Gaucher: Norbotten. *Nordisk Medicin*, 1959; 61: 303-306.

Hineno T, Sano A, Kondoh K, Ueno S, Kakimoto Y and Yoshida K. Secretion of sphingolipid hydrolase activator precursor, prosaposin. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991; 176: 668-674.

Hiraiwa M, Soeda S, Kishimoto Y and O'Brien JS. Binding and transport of gangliosides by prosaposin. *Proc Natl Sci USA*, 1992; 89: 11254-11258.

Hiraiwa M, Taylor EM, Campana WM, Darin JS and O'Brien JS. Cell death preventions, mitogen-activated protein kinase stimulation and increased sulfatide concentrations in

Schwann cells and oligodendrocytes by prosaposin and prosaptide. Proc Natl Acad Sci USA, 1997; 94: 4778-4781.

Ho MW and O'Brien JS. Gaucher's disease: deficiency of "acid" β -glucosidase and reconstruction of enzyme activity *in vitro*. Proc Natl Acad Sci USA, 1971; 68: 2810-2813.

Hollak CEM, van Weely S, van Oers MHJ, Aerts JMFG. Marked elevation of plasma chitotriosidase activity: a novel hallmark of Gaucher disease. J Clin Invest, 1994; 93: 1288-1292.

Hollak CEM, Aerts JMFG, Goudsmit R. Individualized low dose alglucerase therapy for type 1 Gaucher's disease. Lancet, 1995; 345: 1474-1478.

Hollak CEM, Maas M, Aerts JM. Clinically relevant therapeutic endpoints in type 1 Gaucher disease. J Inherited Metab Dis, 2001; 24: 97-9105 (suppl 2).

Horowitz M, Wilder S, Reiner O, Gelbart T, Beutler E. The human glucocerebrosidase gene and pseudogene: structure and evolution. Genomics, 1989; 4: 87-96.

Horowitz M and Zimran A. Mutations causing Gaucher disease. Hum Mutat, 1994, 3: 1-11.

Humphries JE and Hess CE. Gaucher's disease and acquired coagulopathy. Am J of Hematology, 1994; 45: 347-353.

Ichikawa S and Hirabayashi Y. Glucosylceramide synthase and glycosphingolipid synthesis. Trend Cell Biol, 1998; 8: 198-202.

Ida H, Renner OM, Kobayashi M, Eto Y. Effects of enzyme replacement therapy in thirteen Japanese paediatric patients with Gaucher disease. Eur J Pediatric, 2001; 160: 21-25.

- Ikonen E. Cellular pathology of NPC. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2004, 15.
- Ioannou YA, Enriquez A, Benjamin C. Gene therapy for lysosomal storage disorders. *Expert Opin Biol Ther*, 2003; 3 (5): 789-801.
- Jeyakumar M, Butters TD, Dwek RA, Platt FM. Glycosphingolipid lysosomal storage diseases. *Drugs*, 2002; 28: 343-357.
- Jones MZ, Alroy J, Rutledge JC, Taylor JW, Alvord Jr EC, Toone J et al. Human mucopolysaccharidosis III D: clinical, biochemical, morphological and immunohistochemical characteristics. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1997; 56: 1158-1167.
- Kattlove HE, Williams JC, Gaynor E, Spivack M, Bradley RM, Brady RO. Gaucher cells in chronic myelocytic leukemia: an acquired abnormality. *Blood*, 1969, 3: 379-390.
- Kishimoto Y, Hiraiwa M and O'Brien JS. Saposins: structure, function, distribution and molecular genetics. *J Lipid Res*, 1992; 33: 1255-1267.
- Klein A, Henseler M, Klein C, Suzuki K, Harzer K and Sandhoff K. Sphingolipid activator protein D (sap-D) stimulates the lysosomal degradation of ceramide *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994; 200: 1440-1448.
- Kondoh K, Hineno T, Sano A and Kakimoto Y. Isolation and characterization of prosaposin from human milk. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991; 181: 286-292.
- Koprivica V, Stone DL, Park JK. Analysis and classification of 304 mutants alleles in patients with type I and type III Gaucher disease. *Am J Med Gen*, 2000; 66: 1777-1786.
- Kornfeld R. Trafficking of lysosomal enzymes. *FASEB J* , 1987; 1(6): 462-468.

Korolenko TA, Zhanaeva SY, Falameeva OV, Kaledin VI, Filysushina EE, Buzueva II et al., Chitotriosidase as a marker of macrophage stimulation. *Bull Exp Biol Med*, 2000; 130: 948-950.

Kretz KA, Carson GS, Morimoto S, Kishimoto Y, Fluharty AL and O'Brien JS. Characterization of mutation in a family with saposin B deficiency: a glycosylation site defect. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87: 2541- 2544.

Krivit W, Shapiro EG, Peters C, Wagner JE, Cornu G, Kutzberg J. Hematopoietic stem-cell transplantation in globoid-cell leukodystrophy. *N Engl J Med*, 1998; 338:1119-1126.

Krivit W, Peters C, Shapiro EG. Bone marrow transplantation as effective treatment of central nervous system disease in globoid cell leukodystrophy, adrenoleukodystrophy, mannosidosis, fucosidosis, aspartylglucosaminuria, Hurler, Maroteaux-Lamy, and Sly syndromes, and Gaucher disease type III. *Curr Opin Neurol*, 1999; 12: 167-176.

Lacerda L, Arosa FA, Lacerda R, Cabeda J, Porto G, Amaral O, Fortuna A, Pinto R, Oliveira P, McLaren CE, Sa Miranda C, de Sousa M. T cell numbers relate to bone involvement in Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis*, 1999; 25:130-138.

Lachmann RH and Platt MF. Substrate reduction therapy for glycosphingolipid storage disorders. *Expert Opin Investig Drugs*, 2001; 10 (3): 455-466.

Lachmann RH, Grant IR, Halsall D, Cox TM. Twin pairs showing discordance of phenotype in adult Gaucher's disease. *Q J Med*, 2004; 97: 199-204.

Lewin Benjamin. *Genes VII*. Porto Alegre, Artmed, 2001. pp. 184-188.

Lieb H. Cerebrosidespeicherung bei Splenomeglie Typus Gaucher. Hoppe Seyler Z Physiol Chem, 1924; 140: 305-308.

Linke T, Wilkening G, Lansmann S, Moczall H, Bartelsen O, Weisgerber J and Sandhoff K. Stimulation of acid sphingomyelinase activity by lysosomal lipids and sphingolipid activator protein. Biol Chem , 2001a; 382: 283-290.

Linke T, Wilkening G, Sadeghlar F, Moczall H, Bernardo K, Schuchman E and Sandhoff K. Interfacial regulation of acid ceramidase activity. J Biol Chem, 2001b; 276: 5760-5768.

Lloyd KO and Furukawa K. Biosynthesis and functions of gangliosides: recent advances. Glycoconjugate J, 1998; 15: 627-636.

Maret A, Salvayre R, Samadi M, Doustle-Bazy. β -glucosidase isoenzymes in Epstein-Barr virus transformed lymphoid cell lines from normal subjects and patients with type 1 Gaucher disease. Enzyme, 1987; 37 (4): 208-217.

McKusick VA. Mendelian inheritance in man. Catalogs of autosomal dominant, recessive and X-linked phenotypes. 10 ed. Baltimore. The Johns Hopkins University Press, 1993; 2028-2031.

Mehl E and Jatzkewitz H. Eine Cerebrosidsulfatase aus Schweineniere. *Hope seyler Z Physiol Chem*, 1964; 339: 260-276.

Meikle PJ, Ravenscroft EM, Yan M. Newborn screening for lysosomal storage disorders: essential for effective therapy. In: *International Congress of Inborn Errors of Metabolism, Viena. Proceedings of the 7th International Congress of Inborn Errors of Metabolism. Viena, 1997; pp 65.*

Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE and Carey WF. Prevalence of lysosomal storage disorders. *J Am Med Assoc*, 1999; 281, 249-254.

Michelakakis H, Spanou C, Kondyli A. Plasma tumor necrosis factor- α levels in Gaucher disease. *Biochimica Biophysica Acta*, 1996; 1317: 219-222.

Michelin K, Wajner A, Goulart LS, Fachel AA, Pereira MLS, Mello AS, Souza FTS, Pires RF, Giugliani R, Coelho JC. Biochemical study on β -glucosidase in individuals with Gaucher's disease and normal subjects. *Clin Chim Acta*, 2004; 343: 145-153.

Moyses C. Substrate reduction therapy: clinical evaluation in type 1 Gaucher disease. *Phil Trans R Soc Lond B*, 2003; 358: 955-960.

Morimoto S, Martin BM, Kishimoto Y and O'Brien JS. Saposin D: sphingomyelinase activator. *Biochem Biophys Res Commun*, 1988; 156: 403-410.

- Morimoto S, Martin BM, Yamamoto Y, Kretz KA and O'Brien. Saposin A: second cerebrosidase activator protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; 86: 3389:3393.
- Morimoto S, Kishimoto Y, Tomich J, Weiler S, Ohashi T, Barranger JA, Kretz KA and O'Brien JS. Interaction of saposins, acidic lipids and glucosylceramidase. *J Biol Chem*, 1990; 265: 1933-1937.
- Murray GJ and Jin FS. Immunoelectron microscopic localization of mannose-terminal glucocerebrosidase in lysosomes of rat liver Kupffer cells. *J Histochem and Cytochem*, 1995; 43 (2): 149-158.
- Nakano T, Sandhoff K, Stümper J, Christomanou H and Suzuki K. Structure of full length cDNA coding for sulfatide activator, a co β -glucosidase and two other homologous protein: two alternate forms of the sulfatide activator. *J Biochem*, 1989; 105: 152-154.
- Neufeld EF. Lysosomal storage diseases. *A Rev Biochem*, 1991; 60: 257-280.
- Nilsson O and Svennerholm L. Accumulation of glucosylceramide and glucosylsphingosine (psychosine) in cerebrum and cerebellum in infantile and juvenile Gaucher disease. *J Neurochem Res*, 1982; 39: 709-718.
- Nowacki PM, Treacy E, Casey K, Scriver CR. MCH PKU esource Booklet for families. Montréal Children's Hospital – Division of Biochemical Genetics, 1997.
- Oberling C, Woringer P. La maladie de Gaucher chez la nourisson. *Rev Fr Pediatr*, 1927; 3: 475-532.
- O'Brien JS, Kretz KA, Dewji N, Wenger DA, Esch F and Fluharty AL. Coding of two sphingolipid activator protein (SAP 1 and SAP 2) by same genetic locus. *Science*, 1988; 241: 1098-1101.

Ohashi T, Chang MH, Weiler S, Tomich JM, Aerts JM, Tager JM, Barranger JA. Characterization of human glucocerebrosidase from different alleles. *J Biol Chem*, 1991, 266: 3661-3667.

Özkara HA, Recent advances in the biochemistry and genetics of sphingolipidoses. *Brain & Development*, 2004; 26: 497-505.

Pastores GM and Barnett NL. Substrate reduction therapy: miglustat as a remedy for symptomatic patients with Gaucher disease type 1. *Expert Opin Investig Drugs*, 2003, 12(2): 273-280.

Pastores GM, Weinreb NJ, Aerts H, Andria G, Cox TM, Giralt M, Grabowski GA, Mistry PK, Tytki-Szymanska A. Therapeutic Goals in the Treatment of Gaucher Disease. *Seminars in Hematology*, 2004; volume 41, 5: 4-14.

Peters SP, Coyle P, Glew RH. Differentiation of beta-glucocerebrosidase from beta-glucosidase in human tissues using sodium taurocholate. *Arch Biochem Biophys*, 1976, 175: 569-571.

Pires R, Sobreira EAP. Enfermedad de Gaucher tipo 1: Características clínicas em Brasil. In: Giraldo P, Giralt M, Pérez Calvo JL and Pocoví M. *Enfermedad de Gaucher*. 2ª Edición. 2004, p.247-254.

Platt FM, Jeyakumar M, Andersson U, Heare T, Dwek RA and Butters TD. Substrate reduction therapy in mouse models of the glycosphingolipidoses. *Phil Trans R Soc Lond B*, 2003; 358: 947-954.

Pollitt RS, Green A, McCabe CJ, Booth A, Coopler NJ, Leonard JV, Nicholl J, Nicholson P, Tunaley JR, Viridi NK. Neonatal screening for inborn errors of metabolism. *Hearth Technol*

Assess, 1997; 1(7): 1-202. Online Copyright © - World Wide Web URL:
<http://www.hta.nhsweb.nhs.uk>.

Robinson DB and Glew RH. Acid phosphatase in Gaucher's disease. *Clin Chem*, 1980; 26: 371-382.

Rodriguez-Lafrasse C and Vanier MT. Sphingosylphosphorylcholine in Niemann-Pick disease brain: accumulation in type A but not in type B. *Neurochem Res*, 1999; 24: 199-205.

Rosnes JS, Sharkey MF, Veille JC. Gaucher's disease in pregnancy. *Obstet Gynecol Surv*, 1996; 51: 549-558.

Saito M, Mueller OT, Rosenberg A. Multiple forms of human skin fibroblasts beta-glucosidase and activation by fibroblasts monosialoglycosphingolipids. *Prog Clin Biol Res*, 1982; 95: 385-403.

Sandhoff K and Van Echten G. Ganglioside metabolism topology and regulation. *Adv Lipid Res*, 1993; 26: 119-142.

Sandhoff K and Kolter T. Topology of glycosphingolipid degradation. *Trends Cell Biol*, 1996; 6: 98-103.

Sandhoff K, Kolter T and Harzer K. Sphingolipid activator protein. In *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, vol3, 8th edn (ed Scriver CR, Beaudet WS, Sly S and Valle D), 2001, pp.3371-3388. New York: McGraw-Hill.

Sandhoff K and Kolter T. Biosynthesis and degradation of mammalian glycosphingolipids. *Phil Trans R Soc Lond B*, 2003; 358: 847-861.

- Schapiro FB, Lingwood C, Furuya W and Grinstein S. pH-independent retrograde targeting of glycolipids to the Golgi complex. *Am J Physiol*, 1998; 274: C319-C332.
- Schifmann R and Brady RO. New prospects for the treatment of lysosomal storage diseases. *Drugs*, 2002; 62, 5: 733-742.
- Schnabel D, Schröder M and Sandhoff K. Mutation in the sphingolipid activator protein 2 in a patient with a variant of Gaucher disease. *FEBS Lett*, 1991; 284: 57-59.
- Schnabel D, Schroeder M, Furst W, Klein A, Hurwitz R, Zenk T, Weber J, Harzer K, Paton BC, Poulos A. Simultaneous deficiency of sphingolipid activator proteins 1 and 2 is caused by a mutation in the initiation codon of their common gene. *J Biol Chem*, 1992; 267: 3312-3315.
- Schueler UH, Kolter T, Kaneski CR, Blusztajn JK, Herkenham M, Sandhoff K. Toxicity of glucosylsphingosine (glucopsychosine) to cultured neuronal cells: A model system for assessing neuronal damage in Gaucher disease type 2 and 3. *Neurobiol Dis*, 2003; 14: 595-601.
- Shinoda H, Kobayashi T, Katayama M, Goto I, Nagara H. Accumulation of galactosylsphingosine (psychosine) in the twitcher mouse: determination by HPLC. *J Neurochem*, 1987; 49: 92-99.
- Sibille A, Eng CM, Kim SJ, Pastores G, Grabowski GA. Phenotype/genotype correlations in Gaucher disease type 1: clinical and therapeutic implications. *Am J Human Genet*, 1993; 52: 1094-1101.
- Sillence D and Platt FM. Glycosphingolipids and endocytic sorting. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2004, 15.

- Sorge J, West C, Westwood B, Beutler E. Molecular cloning and nucleotide sequence of human glucocerebrosidase cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985; 82:7289-7293.
- Tayama M, Soeda S, Kishimoto Y, Martin BM, Callahan JW, Hiraiwa M and O'Brien. Effects of saposins on acid sphingomyelinase. *Biochem J*, 1993; 290: 401-404.
- Taniguchi M, Shinoda Y, Ninomiya H, Vanier MT, Ohno K. Sites and temporal changes of gangliosides GM1/GM2 storage in the Niemann-Pick disease type C mouse brain. *Brain Dev*, 2001; 23: 414-421.
- Tsuji S, Martin BM, Barranger JA, Seubblefield BK, LaMarca ME and Ginns EI. Genetic heterogeneity in type 1 Gaucher disease: Multiple genotypes in Ashkenazic and non-Ashkenazic individuals. *Medical Sciences. Proc Natl Acad Sci*. 1988; 85: 2349-2353.
- Vaccaro AM, Ciaffoni F, Tatti M, Salvioli R, Barca A, Tognozzi D and Scerch C. pH-dependent conformational properties of saposins and their interactions with phospholipid membranes. *J Biol Chem*, 1995a; 270: 30576-30580.
- Vaccaro AM, Tatti M, Ciaffoni F, Salvioli R, Barca A and Scerch C. Effect of saposins A and B. Complete localization of disulfide bridges. *J Biol Chem*, 1995b, 270: 9953-9960.
- Vaccaro AM, Salvioli R, Tatti M and Ciaffoni F. Saposins and their interactions with lipids. *Neurochem Res*, 1999; 24: 307-314.
- Vielhaber G, Hurwitz R and Sandhoff K. Biosynthesis, processing and targeting of sphingolipid activator protein (SAP-) precursor in cultured human fibroblasts. Mannose 6-phosphate receptor-independent endocytosis of SAP-precursor. *J Biol Chem*, 1996 271: 32438-32446.

- Wajner A, Michelin K, Burin MG, Pires RF, Pereira MLS, Giugliani R, Coelho JC. Biochemical characterization of chitotriosidase enzyme: comparison between normal individuals and patients with Gaucher and Niemann-Pick diseases. *Clinical Biochemistry*, 2004; 37(10): 893-897.
- Walkley SU. Secondary storage of GSLs. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2004, 15.
- Wapper RS. Biochemical Diagnosis of Genetic Diseases. *Ped Ann*, 1993; 22 (5): 282-297.
- Watts RWE. A historical perspective of the glycosphingolipids and sphingolipidoses. *Philos Trans R Soc London B*, 2003; 358: 915-919.
- Wenger DA, Sattler M and Roth S. A protein activator of galactosylceramide- β -galactosidase. *Biochem Biophys Acta*, 1982; 712: 639-649.
- Whitfield PD, Nelson P, Sharp PC, Bindloss CA, Dean C, Ravenscroft EM et al., Correlation among genotype, phenotype, and biochemical markers in Gaucher disease: Implications for the prediction of disease severity. *Mol Genet Metab*, 2002; 75: 46-55.
- Wilcox WR. Inborn errors of metabolism. Online Copyright ©, 1995. World Wide Web URL: <http://www.neonatology.org/syllabus/iem.html>.
- Wilkening G, Linke T and Sandhoff K. Lysosomal degradation on vesicular membrane surfaces. Enhanced glucosylceramide degradation by lysosomal anionic lipids and activators. *J Biol Chem*, 1998; 273: 30271-30278.
- Yamashita T, Wada R, sasaki T, Deng C, Bierfreund U, Sandhoff K. A vital role for glycosphingolipid synthesis during development and differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 9142-9147.

Yaquob M and Carroll M. Isoenzymes of membrane-bound β -glucosidase in Gaucher's disease. *J Inher Met Dis*, 1980; 4: 11-13.

Zaveska® (miglustat). Package insert, 2003. San Francisco, CA, Acte-lion Ltd, 2003.

Zimran A, Sorge J, Gross E, Kubitz M, West C and Beutler E. Prediction of severity of Gaucher's disease by identification of mutations at DNA level. *Lancet*, 1989; 2:349-352.

Zimran A, Gelbart T, Westwood B, Grabowski GA and Beutler E. High Frequency of the Gaucher Disease Mutation of Nucleotide 1226 among Ashkenazi Jews. *Am J Hum Genet*, 1991; 49: 855-859.

VIII ANEXOS



HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

SERVIÇO DE GENÉTICA MÉDICA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O presente projeto de pesquisa tem como objetivo correlacionar as características cinéticas com o tipo de mutação apresentada por cada indivíduo (pais e indivíduos com Doença de Gaucher) presentes no gene da β -glicosidase.

Para a participação no estudo, será colhida amostra de sangue periférico em heparina (para análise enzimática) e sangue em EDTA para posterior extração de DNA. Os riscos e desconfortos causados pela coleta de sangue são semelhantes aos envolvidos na coleta realizada para exames laboratoriais de rotina. O material colhido será utilizado única e exclusivamente para fins de projeto de pesquisa, sendo garantido o sigilo de informações obtidas. Fica garantido ao paciente ou familiares o acesso a estas informações a qualquer momento.

Fui igualmente informada de fornecer qualquer esclarecimento e dúvidas relacionada à pesquisa, da liberdade de não participar do estudo, da segurança do sigilo e do caráter confidencial das informações.

Nome do Paciente:

Assinatura do Responsável Legal:

Nome do Pai:

Assinatura:

Nome da Mãe:

Assinatura:

Pesquisador:

**SERVIÇO DE GENÉTICA MÉDICA
HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE**

LABORATÓRIO DE REFERÊNCIA DE ERROS INATOS DO METABOLISMO

Rua Ramiro Barcelos, 2350 Cep -90035 -003- Porto Alegre- RS - fone (51) 33168309/fax:
33168010 e-mail: jcoelho@hcpa.ufrgs.br / krism@terra.com.br

**SOLICITAÇÃO DE INVESTIGAÇÃO LABORATORIAL DIRIGIDA PARA DOENÇA DE
GAUCHER**

ATENÇÃO: O preenchimento de todos os campos é imprescindível, COLABORE!!!

Paciente:

Nome:	Data de Nascimento:
Responsável:	Telefone/fax:
Endereço:	
Cidade/Estado:	Cep:

Médico:

Nome:	Telefone/fax:
Endereço:	e-mail:
Cidade/Estado:	Cep:
Data da coleta:	

Amostra:

MATERIAL BIOLÓGICO	EXAMES SOLICITADOS
<input type="checkbox"/> Urina <input type="checkbox"/> Plasma	<input type="checkbox"/> β -glicosidase
<input type="checkbox"/> Sangue com EDTA <input type="checkbox"/> Sangue Heparinizado	<input type="checkbox"/> Quitotriosidase
<input type="checkbox"/> Biópsia de Pele	<input type="checkbox"/> Outros:

História Clínica: (se necessário, use o verso):

Motivo da Solicitação:
Medicamentos em uso:
Outros casos na família? (caso positivo, faça o heredograma no verso):
Consangüinidade entre os pais? (caso positivo, faça o heredograma no verso):
Cor: () Branca () Negra () _____
Origem étnica (avós paternos e maternos do paciente):

Laudo de Resultados:

Enviar para:
<input type="checkbox"/> Genzyme - Rio de Janeiro <input type="checkbox"/> Médico ou Serviço solicitante (no endereço acima)
<input type="checkbox"/> Paciente (no endereço acima) <input type="checkbox"/> Outro (especificar no verso)

Solicitante:

Data:	Assinatura:
Enviar esta ficha junto com o material, acondicionado em isopor com gelo (não congelar), por SEDEX para o endereço indicado no alto	
(Grupo de Pesquisa em Doença de Gaucher)	

**SERVIÇO DE GENÉTICA MÉDICA
HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE**

LABORATÓRIO DE REFERÊNCIA DE ERROS INATOS DO METABOLISMO

**Rua Ramiro Barcelos, 2350 Cep -90035 -003- Porto Alegre- RS - fone (51) 33168309/fax:
33168010 e-mail: jcoelho@hcpa.ufrgs.br / krism@terra.com.br**

INVESTIGAÇÃO LABORATORIAL DIRIGIDA PARA DOENÇA DE GAUCHER

INFORMAÇÕES SOBRE A COLETA E ENVIO DE MATERIAL BIOLÓGICO:



1) Material para ensaios enzimáticos em plasma e leucócitos:

Colher pelo menos 10 mL de sangue em seringa com 0,1 mL de heparina e remeter imediatamente ao laboratório à temperatura ambiente ou resfriado.

Deve haver um extremo cuidado em não deixar o material em contato direto com o gelo, pois o congelamento provoca hemólise o que invalida o sangue para os ensaios enzimáticos. Sugerimos que a seringa fique presa à tampa da caixa e que haja uma barreira (jornal, por exemplo) entre o gelo e o material a ser analisado, para que este possa chegar ao laboratório em perfeitas condições, evitando a solicitação de novo material, o que acarretará em um menor tempo na liberação do diagnóstico laboratorial.

Observação: Enviar a seringa com agulha e tampa.

2) Biópsia de Pele para cultura de fibroblastos:

Colher, com extrema assepsia, um pequeno fragmento de pele (2-3mm) do antebraço e remetê-lo dentro de um frasco estéril contendo meio para cultura de células (tipo meio de cultura para cariótipo ou HAM F-10 em 20% de soro bovino fetal, se não houver nenhum destes, utilizar solução fisiológica estéril), ou enviar uma cultura de fibroblastos em bom estado de crescimento, não esquecendo neste último caso, de encher completamente o frasco contendo a cultura, a fim de evitar o ressecamento das células. Remeter à temperatura ambiente.

3) Material para Análise Molecular (DNA):

Colher 5 a 10 mL de sangue em EDTA, com assepsia e manter na geladeira. Enviar à temperatura ambiente ou resfriado.

Observação: Estes materiais deverão ser enviados através do correio por SEDEX, preferencialmente de segunda a quarta-feira.

(Grupo de Pesquisa em Doença de Gaucher)