

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

**ESTUDO DAS PROPRIEDADES CINÉTICAS DA ENZIMA QUITOTRIOSIDASE
HUMANA E DOS PARÂMETROS PRÓ-INFLAMATÓRIOS INTERLEUCINA 6 E
FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA EM PLASMA DE PACIENTES COM AS
DOENÇAS DE GAUCHER TIPO I, KRABBE E GANGLIOSIDOSE GM1 E DE
HETEROZIGOTOS PARA A DOENÇA DE GAUCHER TIPO I: COMPARAÇÃO COM
INDIVÍDUOS NORMAIS**

Tese de Doutorado

Alessandro Wajner

Porto Alegre

2009

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

**ESTUDO DAS PROPRIEDADES CINÉTICAS DA ENZIMA QUITOTRIOSIDASE
HUMANA E DOS PARÂMETROS PRÓ-INFLAMATÓRIOS INTERLEUCINA 6 E
FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA EM PLASMA DE PACIENTES COM AS
DOENÇAS DE GAUCHER TIPO I, KRABBE E GANGLIOSIDOSE GM1 E DE
HETEROZIGOTOS PARA A DOENÇA DE GAUCHER TIPO I: COMPARAÇÃO COM
INDIVÍDUOS NORMAIS**

Alessandro Wajner

Orientadora Profa. 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 Doutor em
Bioquímica

DEDICATÓRIA

**`A Carla meu amor, e a meus
pais queridos.**

AGRADECIMENTOS

À Janice, minha orientadora, por todos os anos harmoniosos que convivemos desde a época da iniciação científica. Sem dúvida uma pessoa maravilhosa que colaborou muito na minha carreira profissional com seus conhecimentos científicos e com suas qualidades pessoais.

Aos meus pais por todo apoio incondicional em todas as horas; por todo conhecimento passado, tanto de vida como científico, em todos esses anos de convívio harmonioso. Enfim, tenho certeza que os meus pais são a base de tudo em minha vida e sempre terei eterna gratidão por eles.

À minha namorada Carla por todos os anos de convívio amoroso, por todo apoio emocional, sendo para mim uma importante base para seguir em frente em meus estudos e também em meu sucesso profissional.

À Kristiane Michelin pela amizade cultivada em anos de convívio. A Kris é uma pessoa magnífica que passou a mim muitos conhecimentos, principalmente da Doença de Gaucher tipo I. Sem dúvida é uma das pessoas que sempre queremos ao nosso lado pelo exemplo de caráter e profissionalismo na área bioquímica.

Ao Roberto Giugliani, chefe do Serviço de Genética Médica, por todo apoio dado nestes diversos anos de convívio no Serviço de genética.

À Maira Burin, bioquímica responsável pelo Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo, por toda sustentação científica prestada quando necessitei e por dar sempre total liberdade para executar minhas práticas laboratoriais usufruindo de todos equipamentos e área física do laboratório.

À Maria Luiza Pereira, bioquímica responsável pelo laboratório de biologia molecular, por todo apoio logístico em nível de análise molecular dos pacientes com a Doença de Gaucher tipo I, sendo sempre uma pessoa atenciosa quando requeri ajuda na área de biologia molecular.

Ao Eurico Camargo e ao André Costa, ambos do Laboratório Nobel, pelo apoio na determinação dos parâmetros pró-inflamatórios em plasma de pacientes com a doença de Gaucher, Gangliosidose GM1, doença de Krabbe, heterozigotos para DG e indivíduos normais.

À Rafaela Ingrassia por toda ajuda na revisão das fichas em busca de manifestações clínicas dos pacientes.

Ao Ricardo Flores Pires, médico geneticista, colaborador do International Collaborative Gaucher Group (ICGG), agradeço por seus ensinamentos a respeito da doença de Gaucher tipo I.

A todos os médicos colaboradores que participaram deste estudo.

Aos meus colegas e parceiros de laboratório (Juarez, Régis, Marilda, Marli, Jurema, Giórgia, Jaqueline) pela companhia diária no trabalho e por todo companherismo.

Ao pessoal da secretaria Zeniara, Fabrízio, Jacira, Valdenize, Célio e Cléia por todo apoio quando precisei de auxílio em compras para pesquisa.

À Cléia, secretária do Curso de Pós-graduação, por todo auxílio administrativo e atenção quando necessitei.

Ao Mathias Azevedo Bressel por todo auxílio prestado na análise estatística de meu trabalho.

Ao meu irmão, pelo convívio, pelos ensinamentos de vida, pela companhia nestes vários anos de vida.

A todos meus familiares por acreditarem em mim, pelo convívio e por todo apoio.

Aos pacientes, pois eles são a causa para se fazer pesquisa, para se buscar um melhor diagnóstico, um melhor tratamento.

Ao CNPq e ao GPPG do HCPA pelo auxílio financeiro prestado ao meu projeto de pesquisa.

SUMÁRIO

| | |
|---|------------|
| Dedicatória..... | III |
| Agradecimentos..... | IV |
| Resumo..... | 1 |
| Abstract | 3 |
| Lista de Abreviaturas e Siglas..... | 5 |
| I.Introdução..... | 7 |
| 1.1. Erros inatos do metabolismo..... | 7 |
| 1.2. Lisossomos e Enzimas lisossômicas..... | 8 |
| 1.3. Doenças lisossômicas de depósito..... | 9 |
| 1.4. Glicosfingolípídios..... | 10 |
| 1.4.1. Biossíntese dos glicosfingolípídios..... | 12 |
| 1.4.2. Catabolismo dos glicosfingolípídios..... | 15 |
| 1.5. Esfingolipidoses..... | 15 |
| 1.5.1. Diagnóstico das Esfingolipidoses..... | 17 |
| 1.5.2.Tratamento das Esfingolipidoses..... | 19 |
| 1.6. Quitotriosidase..... | 20 |
| 1.6.1. Aspectos bioquímicos e moleculares da quitotriosidase..... | 20 |

| | |
|---|----|
| I.6.2. Doenças lisossômicas de depósito com aumento da atividade plasmática da quitotriosidase..... | 25 |
| I.6.2.1. Doença de Gaucher | 26 |
| I.6.2.1.1. Apresentação clínica..... | 26 |
| I.6.2.1.2. Alterações metabólicas..... | 27 |
| I.6.2.1.3. Aspectos genéticos..... | 27 |
| I.6.2.1.4. Diagnóstico..... | 28 |
| I.6.2.1.5. Tratamento..... | 29 |
| I.6.2.2. Doença de Krabbe..... | 29 |
| I.6.2.2.1. Apresentação clínica..... | 30 |
| I.6.2.2.2. Alterações metabólicas..... | 30 |
| I.6.2.2.3. Aspectos genéticos..... | 31 |
| I.6.2.2.4. Diagnóstico..... | 31 |
| I.6.2.2.5. Tratamento..... | 32 |
| I.6.2.3. Gangliosidose GM1..... | 33 |
| I.6.2.3.1. Apresentação clínica..... | 33 |
| I.6.2.3.2. Alterações metabólicas..... | 34 |
| I.6.2.3.3. Alterações genéticas..... | 35 |
| I.6.2.3.4. Diagnóstico..... | 35 |
| I.6.2.3.5. Tratamento..... | 36 |
| I.6.3. Outras doenças com aumento da atividade da enzima quitotriosidase..... | 36 |

| | |
|--|-----------|
| I.6.4. Uso da quitotriosidase no monitoramento do tratamento de doenças lisossômicas de depósito..... | 37 |
| I.7.Papel da inflamação sobre o fisiopatogenia do dano tecidual em pacientes com doenças neurodegenerativas e doenças lisossomais de depósito..... | 38 |
| I.7.1.Fatores pró-inflamatórios e neurodegeneração..... | 39 |
| II.Objetivos..... | 43 |
| III.Material e Métodos..... | 45 |
| III.1.Amostras de plasma..... | 45 |
| III.1.1. Determinação da atividade e propriedades cinéticas da quitotriosidase..... | 46 |
| III.1.2. Estudo da quitotriosidase em pacientes com doença de Gaucher antes e após tratamento por terapia de reposição enzimática..... | 47 |
| III.1.3. Comparação entre os níveis plasmáticos dos fatores pró-inflamatórios IL-6 e TNF- α com a atividade e as propriedades cinéticas da quitotriosidase, com a atividade da β -glicosidase, β -galactosidase e galactocerebrosidase e com algumas manifestações clínicas nos pacientes afetados pelas doenças de Krabbe e gangliosidose GM1..... | 47 |
| III.2. Coleta, Processamento e Armazenamento das amostras..... | 48 |
| III.3. Estudos bioquímicos..... | 49 |
| III.3.1. Ensaio enzimático para quitotriosidase..... | 49 |
| III.3.1.1. Soluções..... | 49 |
| III.3.1.2.Procedimento..... | 52 |
| III.3.2.Determinação do pH ótimo..... | 53 |
| III.3.3.Determinação do Km e V_{max} | 54 |
| III.3.4.Estabilidade ao calor..... | 55 |

| | |
|--|-----------|
| III.4. Parâmetros inflamatórios: Determinação das concentrações plasmáticas de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e da interleucina 6 (IL-6)..... | 55 |
| III.4.1. Preparação dos padrões..... | 56 |
| III.4.2. Preparação do anticorpo ligado às microesferas..... | 56 |
| III.4.3. Preparação dos controles, tampão de lavagem e soro matrix..... | 56 |
| III.4.4. Técnica de determinação das concentrações plasmáticas de IL-6 e TNF- α .. | 57 |
| III.5. Considerações éticas..... | 59 |
| III.6. Análise estatística..... | 59 |
| IV. Resultados..... | 61 |
| IV.1. Comparação entre a atividade da enzima quitotriosidase em plasma de indivíduos normais, pacientes com as doenças de Gaucher tipo I (DG), Krabbe (DK), gangliosidose GM1 (GM1) e heterozigotos para a doença de Gaucher tipo I (HG)..... | 61 |
| IV.2. Determinação do pH ótimo da enzima quitotriosidase em plasma de indivíduos normais, pacientes com a doença de Gaucher tipo I (DG), doença de Krabbe (DK), gangliosidose GM1 (GM1) e heterozigotos para a doença de Gaucher tipo I (HG)..... | 63 |
| IV.3. Determinação do K_m e V_{max} da enzima quitotriosidase em plasma de indivíduos normais, pacientes com as doenças de Gaucher tipo I (DG), Krabbe (DK), gangliosidose GM1 (GM1) e heterozigotos para a doença de Gaucher tipo I (HG)..... | 67 |
| IV.4. Estudos de estabilidade térmica para a enzima quitotriosidase em plasma de indivíduos normais, pacientes com as doenças de Gaucher tipo I (DG), doença de Krabbe (DK), gangliosidose GM1 (GM1) e heterozigotos para a doença de Gaucher tipo I (HG)..... | 76 |
| IV.5. Estudos das propriedades cinéticas da enzima quitotriosidase em plasma de indivíduos com doença de Gaucher tipo I em tratamento e sem tratamento..... | 80 |

| | |
|--|-----|
| IV.6. Comparação entre as propriedades bioquímicas da enzima quitotriosidase (QT) em plasma de indivíduos normais, pacientes com as doenças de Gaucher tipo I (DG), Krabbe (DK), gangliosidose GM1 (GM1) e heterozigotos para a doença de Gaucher tipo I (HG)..... | 82 |
| IV.7. Determinação da atividade da quitotriosidase e das concentrações dos fatores pró-inflamatórios interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) em plasma de indivíduos normais, pacientes com as doenças de Gaucher tipo I (DG), Krabbe (DK), gangliosidose GM1 (GM1) e heterozigotos para a DG (HG)..... | 86 |
| IV.8. Estudo das associações entre a idade, a atividade e propriedades cinéticas da enzima quitotriosidase (QT) com os fatores pró-inflamatórios IL-6 e TNF- α em plasma, bem como com as atividades das enzimas β -glicosidase, galactocerebrosidase e β -galactosidase em leucócitos de indivíduos com as doenças de Gaucher tipo I (DG), Krabbe (DK) e gangliosidose GM1 (GM1) e heterozigotos para a doença de Gaucher tipo I (HG)..... | 90 |
| IV.9. Estudo da influência do sexo, alterações de tônus, retardo neuropsicomotor e convulsões sobre a atividade e as propriedade cinéticas da enzima quitotriosidase (QT), bem como sobre os fatores pró-inflamatórios IL-6 e TNF- α em plasma de indivíduos normais e com as doenças de Gaucher tipo I (DG), Krabbe (DK), gangliosidose GM1 (GM1) e heterozigotos para doença de Gaucher tipo I (HG)..... | 93 |
| V.Discussão | 105 |
| V.1. Sensibilidade e eficácia do método enzimático para detecção de homozigotos e heterozigotos para a doença de Gaucher tipo I, doença de Krabbe e gangliosidose GM1..... | 105 |

| | |
|--|------------|
| V.2. Quitotriosidase (QT): O biomarcador auxiliar no diagnóstico laboratorial para a DG, DK e GM1 e para avaliação do tratamento de reposição enzimática para a DG..... | 106 |
| V.3 Atividade e propriedades cinéticas da quitotriosidase (QT) nas doenças de Gaucher tipo I (DG), Krabbe (DK), gangliosidose GM1 (GM1), heterozigotos para a DG (HG) e indivíduos normais (controles)..... | 109 |
| V.4 Efeito do tratamento com reposição enzimática sobre as propriedades cinéticas da QT em pacientes com DG..... | 111 |
| V.5.Inflamação sistêmica e neuroinflamação como determinantes da patogênese nas doenças de Gaucher tipo I, Krabbe e gangliosidose GM1..... | 112 |
| V.6. Correlação entre os níveis plasmáticos de IL-6 e TNF- α com as atividades, β -glicosidase, galactocerebrosidase e β -galactosidase em leucócitos, bem como com a atividade e as propriedades cinéticas da QT no plasma nas doenças de Gaucher tipo I, Krabbe e gangliosidose GM1..... | 122 |
| V.7. Estudo da influência do sexo, alterações de tônus, retardo neuropsicomotor e convulsões sobre a atividade e as propriedade cinéticas da enzima quitotriosidase (QT) e sobre os fatores pró-inflamatórios IL-6 e TNF- α em plasma de indivíduos normais e com as doenças de Gaucher tipo I (DG), Krabbe (DK), gangliosidose GM1 (GM1) e heterozigotos para doença de Gaucher tipo I (HG)..... | 124 |
| V.8.Considerações finais..... | 125 |
| VI.Conclusões..... | 126 |
| VII.Perspectivas..... | 130 |
| VIII. Referências Bibliográficas..... | 131 |

| | |
|---|------------|
| IX. Lista de Tabelas e Figuras..... | 155 |
| X Anexos..... | 164 |
| Anexo 1: Termo de consentimento livre e esclarecido | 164 |
| Anexo 2: Ficha de solicitação de investigação laboratorial para DG..... | 165 |
| Anexo 3: Informações sobre coleta e envio de material biológico | 166 |
| Anexo 4 : Artigo publicado | 167 |

I.1.RESUMO

Um aumento acentuado da atividade da quitotriosidase (QT) tem sido encontrado em plasma de pacientes afetados por várias esfingolipidoses, incluindo a doença de Gaucher tipo I (DG), a doença de Krabbe (DK) e a gangliosidose GM1 (GM1). Na DG, causada pela deficiência da enzima glicocerebrosidase, a QT é considerada um marcador auxiliar no diagnóstico desta enfermidade. Já nas DK e GM1 causadas, respectivamente pelas deficiências na atividade das enzimas galactosilceramidase e β -galactosidase, há um aumento moderado da atividade da QT.

O objetivo inicial do presente trabalho foi o de caracterizar as propriedades cinéticas da enzima quitotriosidase em plasma de pacientes com as DG tipo I, DK, GM1 e heterozigotos para a DG tipo I (HG), bem como comparar essas propriedades entre os vários grupos e com as de indivíduos normais. Verificamos inicialmente que nos pacientes com DG tipo I a atividade plasmática da QT apresentou-se muito acima da normalidade (em média 600 vezes), o mesmo ocorrendo em indivíduos com DK (em média 12 vezes) e com GM1 (em média 15 vezes). No que se refere às propriedades cinéticas, observamos que o pH ótimo da QT dos pacientes com DK e GM1 foi superior ao dos controles, enquanto a QT de homozigotos (DG) e heterozigotos para DG (HG) teve um pH ótimo inferior ao dos controles. Além disso, o maior Km observado para a QT foi observado em pacientes com GM1, seguido daquele com DG, que foram muito superiores aos Km de todos os outros grupos (DK, HG e controles), refletindo uma menor afinidade da enzima pelo substrato nos pacientes com GM1 e DG. Além disso, o Km dos pacientes com DK e HG foram, respectivamente, superior e inferior ao dos controles. Já no que se refere à velocidade máxima (V_{max}) observou-se um aumento acentuado desse parâmetro no grupo DG tipo I, seguindo-se do GM1 e DK, relativamente aos grupos controle e HG. Esses achados foram semelhantes aos encontrados para a atividade da QT nos grupos estudados. Finalmente verificamos que a QT de indivíduos normais é muito mais termoestável relativamente à QT dos pacientes com DG tipo I, DK e GM1, bem como ao grupo HG.

É possível que as variações das propriedades cinéticas da QT entre os vários grupos analisados em relação aos controles e também aos HG possam potencialmente representar marcadores bioquímicos simples e rápidos na diferenciação de indivíduos homozigotos para algumas dessas doenças lisossomais, bem como de HG com indivíduos normais. Estes resultados indicam, portanto, que indivíduos normais podem ser diferenciados dos HG através do pH ótimo, Km e termoestabilidade da QT.

O próximo objetivo de nossa investigação foi comparar as propriedades cinéticas da quitotriosidase em pacientes com a DG tipo I não tratados e em tratamento com terapia de reposição enzimática. Verificamos que a atividade da enzima apresentou um decréscimo ao longo do tratamento e que o Km se elevou significativamente em relação àquele do início do tratamento, enquanto as outras propriedades (V_{max} , pH ótimo e termoestabilidade) não foram alteradas. Embora não se tenha uma explicação no momento para o aumento do Km com o tratamento, podemos supor que isoenzimas da QT com uma afinidade menor ao substrato (maior Km) pudessem ser mais expressas no sangue dos pacientes tratados.

Também medimos e comparamos os níveis dos fatores pró-inflamatórios interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) no plasma de pacientes com DG tipo I, DK, GM1, HG e de indivíduos normais. Observamos que tanto a IL-6

quanto o TNF- α apresentaram concentrações plasmáticas aumentadas nos pacientes com DG tipo I, DK e GM1, bem como nos HG relativamente aos controlos. O aumento verificado nas concentrações plasmáticas de TNF- α nos pacientes afetados por DG tipo I, GM1 e DK foi aproximadamente de 3 a 4 vezes superior ao dos controlos. Já as concentrações plasmáticas de IL-6 nesses mesmos pacientes foram superiores a dos controlos na ordem de magnitude de 3 (DG tipo I e HG), 5 (GM1) e 15 (DK) vezes, indicando que esse parâmetro é mais sensível que o TNF- α na diferenciação entre os indivíduos normais e os com as doenças lisossomais estudadas. Esses achados indicam uma ativação do sistema imunológico a nível sistêmico nos pacientes com as doenças lisossomais acima descritas, bem como nos HG.

Além disso, observamos que os níveis plasmáticos de IL-6 e TNF- α não estavam correlacionados com a atividade e as propriedades bioquímicas da QT, bem como com as atividades da β -glicosidase, galactocerebrosidase e β -galactosidase, indicando que o processo inflamatório sistêmico detectado no plasma dos pacientes com DG tipo I, DK e GM1 por níveis elevados de IL-6 e TNF- α não está associado à atividade ou às propriedades cinéticas da QT e com a atividade das enzimas deficientes nestas doenças.

Também investigamos associações entre o sexo, algumas manifestações clínicas comuns encontradas nos pacientes com DK, GM1 e entre a atividade e as propriedades cinéticas da QT com os níveis das citocinas IL-6 e TNF- α em plasma desses indivíduos. Verificamos que o sexo não alterou significativamente nenhum desses parâmetros. Já nos pacientes com GM1 a presença de hepatomegalia associou-se a uma elevação da atividade e da V_{max} da QT, indicando que esse sinal clínico possa estar relacionado a uma ativação do sistema imunológico. Ainda nos pacientes com GM1, foi verificado que a presença de convulsões nos mesmos associou-se a uma menor V_{max} da QT e a níveis baixos de TNF- α . Nenhuma outra associação significativa nesses parâmetros pode ser verificada nos pacientes com DK e GM1.

I.2.ABSTRACT

Sphingolipidoses are lysosomal storage disorders characterized by the accumulation of sphingolipids in one or more tissues of the affected individuals as a result of a primary deficiency in activity of lysosomal enzymes or their activating proteins involved in routes of degradation. A high elevation of chitotriosidase enzyme has been found in plasma of patients affected by several sphingolipidoses, such as Gaucher Disease type 1 (GD), Krabbe Disease (KD) and GM1 Gangliosidosis. In GD, caused by deficiency of glucocerebrosidase enzyme, chitotriosidase (CT) activity is very high in plasma of affected patients, been considered a useful marker in the diagnosis of this disease. On the other hand, in DK and GM1, due respectively to a deficiency in the galactocerebrosidase enzyme and β -galactosidase enzyme, there is a moderate increase of CT activity.

The initial objective of this study was to characterize the kinetic properties of chitotriosidase enzyme in plasma of patients with GD type I, KD, GM1 and heterozygotes for GD type I (HG) and compare these properties among the various groups and with those of normal subjects. We noticed initially that in patients with GD, CT activity was much higher than in normal individuals (600 times on average), the same occurred in DK patients (increased 12 times on average) and GM1 patients (increased 15 times on average). Concerning the kinetic properties, we observed that the optimum pH of CT in patients with KD and GM1 was higher than in controls, whereas homozygotes and heterozygotes for GD the CT had an optimum pH lower than that of controls. Moreover, the highest K_m of CT was observed in GM1 patients, followed that with DG, which were much higher than the K_m of all other groups (DK, HG and controls), reflecting a lower affinity of the enzyme by the substrate in patients with GM1 and DG. Furthermore, the K_m of patients with KD and HG were respectively higher and lower than of controls. Besides, regarding to the V_{max} , there was an increase of this parameter in GD type I, followed by GM1 and KD, relatively to controls and HG. These findings were similar to those found for CT activity in the groups studied. Finally, we noted that CT activity of normal individuals was much more stable to heating, compared to CT of patients with GD, KD and GM1, and HG group.

It is possible that the changes in the kinetic properties of CT between different groups in relation to controls and also to HG could potentially represent rapid and simple biochemical markers in the differentiation of individuals homozygous for some of these lysosomal diseases, as well as HG from normal subjects. These results indicate therefore that normal individuals can be distinguished from HG through optimum pH, K_m and thermostability of the CT.

The next objective of our research was to compare the kinetic properties of CT in patients with GD type I under enzyme replacement therapy (imiglucerase) from those without treatment. We found that the enzyme activity was decreased and the K_m increased significantly during treatment, while the other properties (V_{max} , optimum pH and thermostability) were not altered by treatment. Although at the moment we do not have an explanation for an increase of CT with treatment, we may presume that CT isoenzymes with a lower affinity to the substrate (increased K_m) are more expressed in blood of treated patients.

We also measured and compared the levels of the pro-inflammatory interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in plasma of patients with DG type I, DK, GM1, HG and normal individuals. We observed that both IL-6 as TNF- α concentrations were significantly increased in plasma from patients with type I DG, DK and GM1, as well as in HG compared with controls. The increase observed in plasma concentrations of TNF- α in patients affected by type I DG, GM1 and DK was approximately 3 to 4 times higher than that of controls. Furthermore, the plasma concentrations of IL-6 in these patients were higher than controls in the order of magnitude of 3 (type I DG and HG) , 5 (GM1) and 15 (GM1) times, indicating that this parameter is more sensitive than TNF- α in the differentiation between normal subjects and patients with the lysosomal diseases studied. These findings indicate an activation of the immune system at the systemic level in patients with the lysosomal diseases above described, as well as in HG.

We also observed that IL-6 and TNF- α were not correlated with the activity and biochemical properties of CT, as well as with the activities of β -glucosidase, galactocerebrosidase and β -galactosidase, indicating that the systemic inflammatory process found in plasma of patients with GD type I, KD and GM1 detected by high serum levels of IL-6 and TNF- α is not associated with the activity and the kinetic properties of QT and with the activity of the enzymes deficient in these diseases.

We also investigated associations between sex, some clinical manifestations found in patients with KD, GM1 and between the activity and the kinetic properties of CT and the levels of cytokines IL-6 and TNF- α in plasma of these individuals. We verified that the sex did not significantly alter any of these parameters. Furthermore, in GM1 patients, the presence of hepatomegaly was associated with an elevation of QT activity and Vmax, indicating that this clinical sign may be related to an activation of the immune system. Still in GM1 patients, we observed that the presence of seizures was associated with a decreased CT Vmax and TNF- α . No other significant alteration in these parameters could be verified in patients with DK and GM1.

I.2.LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A: base adenina

β-gli: β-glicosidase

C: base citocina

Cer: ceramida

DG: doença de Gaucher tipo I

DK: doença de Krabbe

DLD: doença lisossômica de depósito

DNP: doença de Niemann-Pick

EC: enzyme classification (classificação das enzimas)

ECA: enzima conversora da angiotensina

EIM: Erros Inatos do Metabolismo

G: base guanina

Gal: galactose

Gal-Cer: galactosilceramida

GALC: galactosilceramidase

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

HG: heterozigoto para doença de Gaucher tipo I

HPLC: cromatografia líquida de alta performance

IL-6: interleucina 6

IL12: interleucina 12

IL18: interleucina 18

Km: constante de Michaelis-menten

L-Fuc: fucose

LAMP: proteína de membrana associada a lisossomo
LDM: leucodistrofia metacromática
Man: manose
MHC Classe I : antígeno classe I do Complexo de Histocompatibilidade Principal
MHC Classe II: antígeno classe II do Complexo de Histocompatibilidade Principal
MIP-1 α : proteína inflamatória de macrófagos 1- α
M6P: manose-6-fosfato
NK: natural killer
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
PPCA: proteína de proteção a catepsina a
QT: quitotriosidase
RER: retículo endoplasmático rugoso
RNPM: retardo neuropsicomotor
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
TNF- α : fator de necrose tumoral alfa
TRE: terapia de reposição enzimática
TRS: terapia de redução de substrato
TRAP: fosfatase ácida tartarato resistente
 μ M: micromolar
V_{max}: Velocidade máxima

I. INTRODUÇÃO

I.1. Erros inatos do metabolismo

Os erros inatos do metabolismo (EIM) correspondem a um grupo de doenças genéticas causadas pela alteração ou ausência de síntese ou degradação de uma proteína, geralmente uma enzima, afetando seu funcionamento normal (Scriver et al, 2001).

O termo EIM foi proposto por Sir Archibald Garrod em 1902. Garrod, através de seus estudos sobre a alcaptonúria, pentosúria, albinismo e cistinúria, observou que os indivíduos afetados apresentavam concentração anormal de substâncias endógenas, sugerindo a presença de defeitos pontuais no metabolismo dessas moléculas (Waber,1990). Na década de 40, Beadle e Tatum desenvolveram a idéia de que o processo metabólico se desdobra em etapas, cada uma delas controlada por uma enzima específica. Essa nova teoria fortaleceu a hipótese de Garrod acerca da existência dos EIM (Mueller e Young,1995).

Segundo Sinclair (1982), os EIM podem ser classificados de acordo com a repercussão celular e metabólica do defeito associado:

- 1) EIM envolvendo distúrbios do transporte como, por exemplo, as deficiências de dissacaridases, defeito no transporte de magnésio e a doença de Hartnup.
- 2) EIM envolvendo distúrbios de armazenamento, degradação e secreção como, por exemplo, as doenças lisossômicas de depósito (DLD).
- 3) EIM envolvendo distúrbios da síntese como a hiperplasia adrenal congênita que possui um defeito na síntese do cortisol.

4) EIM envolvendo distúrbios do metabolismo intermediário como a hiperfenilalaninemias, tirosinemias e homocistinúria.

Segundo Wapper (1993), os EIM são na sua grande maioria, de herança autossômica recessiva havendo um risco de 25% de nascer um indivíduo afetado quando os pais são heterozigotos. Alguns EIM 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 individualmente é rara, mas quando associados podem chegar a 1 caso para cada 500-1000 nascidos vivos (Nowacki et al., 1997, Giugliani, 1997).

I.2. Lisossomos: enzimas lisossomais

Lisossomos são organelas citoplasmáticas ácidas as quais contêm numerosas enzimas hidrolíticas capazes de degradar a maioria das moléculas biológicas. Estas organelas estão envolvidas na morte de agentes infecciosos, tais como bactérias e também lipoproteína de baixa mobilidade (Kornfeld, 1987; Neufeueld, 1991). 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).

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 um grupo diferente de vesículas (Kornfeld, 1987).

Este receptor que se dissocia da enzima é reciclado podendo ser utilizado várias vezes. Caso não ocorra acidificação, não há dissociação do complexo enzima-receptor e 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. Doenças Lisossômicas de Depósito

As doenças lisossômicas de depósito (DLD) compreendem um grupo de aproximadamente 50 EIM caracterizados pelo armazenamento anormal de uma ou mais macromoléculas nos lisossomos. A maioria delas ocorre ou pela deficiência em uma única enzima lisossomal, ou de um cofator essencial à atividade da enzima lisossômica ou ainda por um defeito de proteínas ativadoras (Neufeld, 1991; Wilcox, 1995; Aerts et al., 2003; Ginzburg et al., 2004; Sawkar et.al., 2006).

As DLD são individualmente raras na população, mas em conjunto têm uma incidência aproximada de 1 caso para cada 5000 recém-nascidos vivos (Meikel et al., 1997).

As DLD podem ser divididas em quatro grandes grupos de acordo com a natureza do substrato acumulado (Watts, 2003):

a) Esfingolipidoses: deficiência na degradação de esfingolipídios contendo três ou menos resíduos de carboidratos;

b) Mucopolissacaridoses: deficiência de hidrolase lisossomal ou sulfatase lisossomal que conduz ao acúmulo de glicosaminoglicanos nos lisossomos e sua excreção na urina;

c) Glicoproteínoses: deficiência na clivagem seqüencial de resíduos de açúcares dos carboidratos das glicoproteínas;

d) Grupo heterogêneo formado por outras DLDs clinicamente intermediárias entre esfingolipidoses e mucopolissacaridoses, como a mucopolidose.

A maior parte das DLDs possui uma variada heterogeneidade clínica – o mesmo gene mutado pode causar uma série de fenótipos, variando desde os casos mais brandos e tardios da doença até a forma aguda, de morte precoce. A atividade residual da enzima já foi descrita como sendo um dos fatores que influencia a patogênese da doença. A ausência de qualquer atividade residual enzimática está relacionada a um quadro mais grave da doença, enquanto que pequenas taxas de atividade podem retardar o surgimento dos sintomas. Entretanto, diversos casos com uma atividade residual relativamente alta foram associados a fenótipos graves da doença, indicando que não há uma correlação exata entre a atividade enzimática e a gravidade do quadro fenotípico (Sawkar, 2006).

I.4. Glicoesfingolipídios

Os glicoesfingolipídios (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 degradados dentro dos lisossomos (Van Meer e Sprong, 2004; Sillence e Platt, 2004). Os GELs colaboram nas propriedades físico-

químicas da membrana celular, possuindo importantes funções em um grande número de processos de regulação celular, embora nosso conhecimento sobre o exato papel *in vivo* desses compostos é ainda incompleto. De qualquer forma, são essenciais à vida, visto até o presente momento não ter sido descritas doenças genéticas com déficit da síntese dos GELs (Yamashita et al., 1999; Furukawa, 2004). No entanto, são conhecidos vários defeitos genéticos na degradação dos GELs, envolvendo deficiências de enzimas lisossomais responsáveis pelo seu catabolismo.

Os GELs 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 próxima. Se umas 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 dos GELs (Yamashita et al., 1999; Furukawa, 2004). Estas desordens no armazenamento de GELs pertencem ao grupo das esfingolipidoses, na qual o substrato da enzima deficiente acumula-se nos lisossomos das células

(Futerman e van Meer, 2004). Um achado interessante é que os GELs também se acumulam em algumas DLDs secundariamente ao acúmulo do material de armazenamento principal (Walkley, 2004). Por exemplo, no cérebro de pacientes com a doença de Niemann-Pick tipo A observou-se um armazenamento de gangliosídeos GM2 e GM3, enquanto que o material de armazenamento principal nesta desordem é a esfingomielina (Brungraber et al., 1973; Rodriguez-Lafrasse e Vanier, 1999). Também foi observado este fato em pacientes com a doença de Niemann-Pick tipo C e nas Mucopolissacaridoses 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 freqüência individual das DLDs do tipo esfingolipidoses não é alta, mas, juntas, constituem um grupo significativo apresentando uma freqüência de 1 em cada 18.000 nascidos vivos e representam a causa mais frequente de doenças neurodegenerativas em crianças (Meikle et al., 1999).

I.4.1. Biossíntese dos glicosfingolipídios

Os glicosfingolipídios (GELs) são sintetizados no complexo de Golgi por adição seqüencial de monossacarídeos na ceramida através da ação de glicosiltransferases (Figura 1) (Ichikiwa e Hirabayashi, 1998; Sandhoff e Kolter, 2003).

As duas principais famílias dos GELs são os 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 estes sejam particularmente

abundantes na superfície das células do sistema nervoso central (Lloyd e Furukawa 1998). Os GELs são direcionados ao lisossomo onde são degradados por uma ação seqüencial de glicohidrolases específicas (Schapiro et al.,1998; Sandhoff e Van Echten, 1993). Estas enzimas removem um GEL a cada etapa da rota de degradação (Figura 2) (Sandhoff e Kolter,1996).

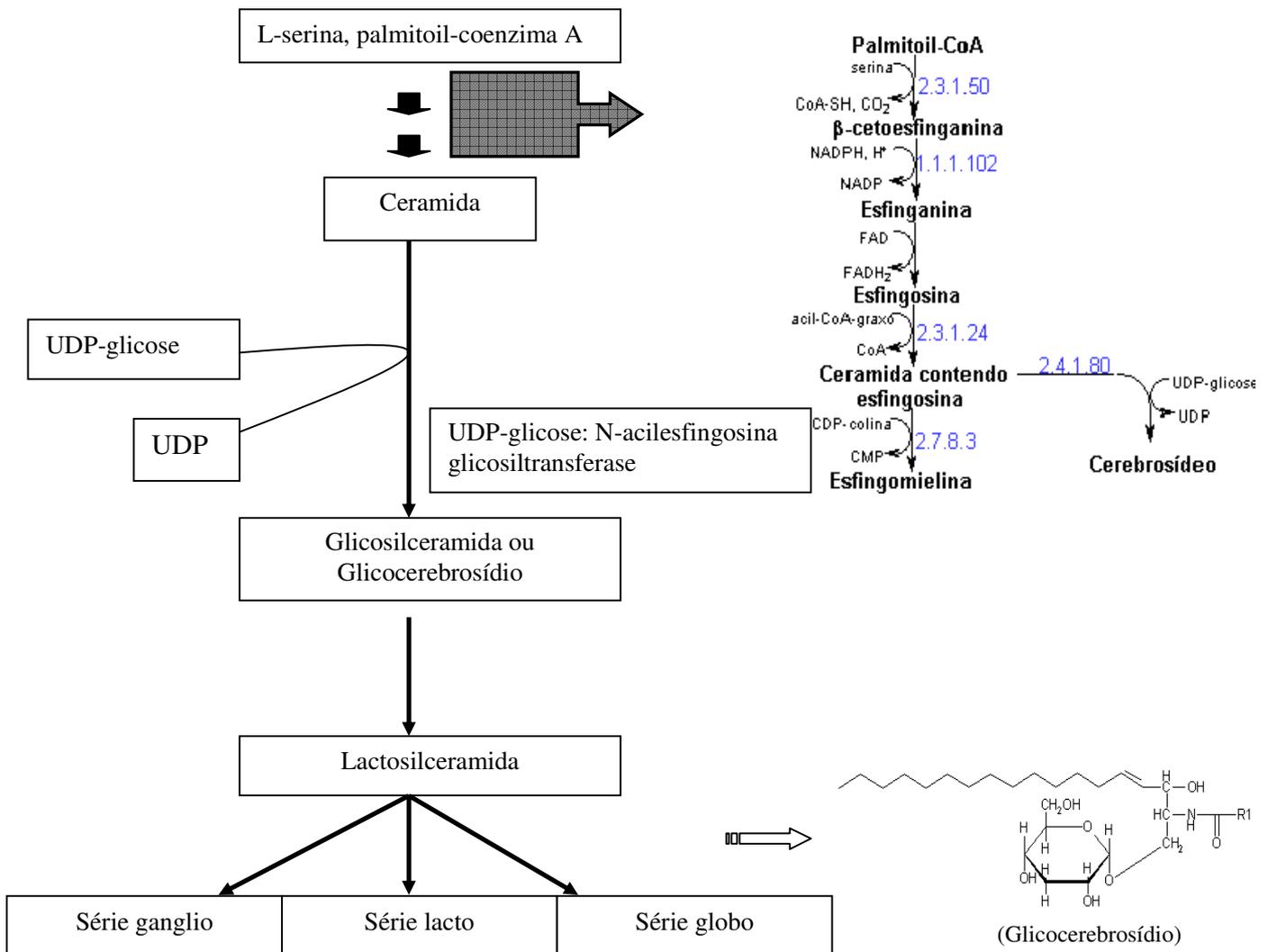


Figura I.1: Biossíntese dos GELs, enfatizando a conversão da ceramida em glicosilceramida (glicocerebrosídeo) através da ação da ceramida glicosiltransferase. Os números correspondem as enzimas responsáveis pela reação. [Adaptada de Platt et al., 2003].

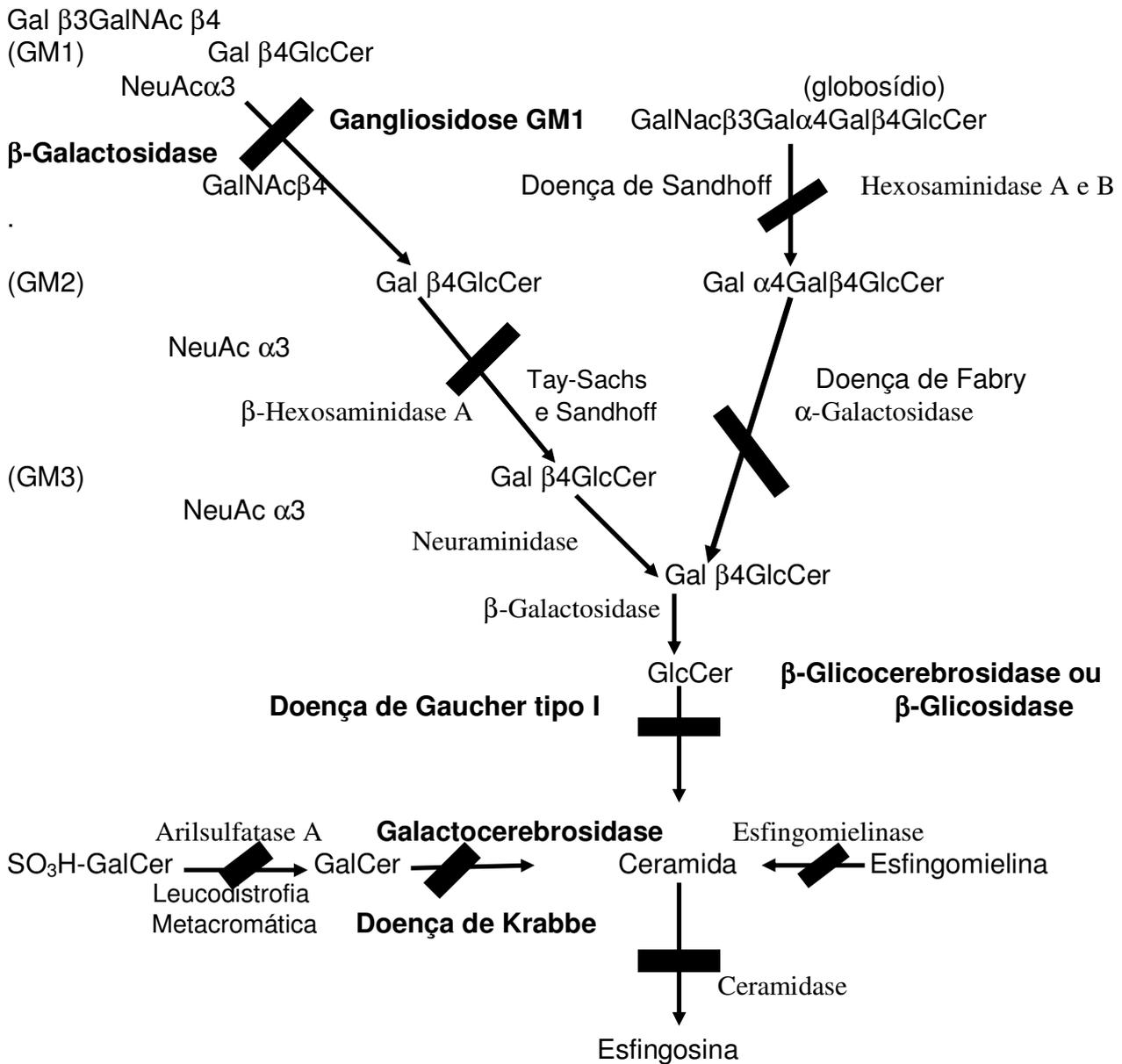


Figura 1.2: Catabolismo dos GELs e as doenças associadas a deficiências de hidrolases ácidas lisossomais. A via de degradação contém séries de enzimas sendo o resultante de uma reação o substrato para a próxima. Mutações que ocorrem nos genes que codificam para estas enzimas são responsáveis pela produção de uma 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. 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.4.2. Catabolismo dos glicosfingolípídios

Os glicosfingolípídios (GELs) são hidrolisados por enzimas lisossomais específicas que clivam o grupo funcional carboidrato da região final não-reduzida do GEL. O número de monossacarídeos na estrutura deste substrato é importante para definir se o GEL será hidrolisado através da enzima ou desta última em associação a proteínas ativadoras. O GEL que contém mais de quatro açúcares em sua cadeia de carboidrato é clivado apenas por enzimas.

De outra forma, os GELs que possuem cadeias curtas de carboidratos necessitam enzimas e uma segunda molécula para serem hidrolisados. Estas moléculas são proteínas ativadoras de esfingolípídios (SAP ou saponinas). Devido à especificidade, elas facilitam a degradação de esfingolípídios ligados à membrana por exohidrolases solúveis em água (Mehl e Jatzkewitz, 1964; Morimoto et al., 1988). São conhecidos 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 proteólise (Fürst et al., 1988; O'Brien et al., 1988; Nakano et al., 1989).

Nas DLDs caracterizadas como glicosfingolipidoses, a deficiência enzimática provoca o acúmulo de substratos específicos (GELs) nos lisossomos, levando a várias patologias (Figura I. 2).

I.5. Esfingolipidoses

Esfingolipidoses constituem um subgrupo das DLDs caracterizado pelo acúmulo de esfingolípídios em um ou mais tecidos como resultado da deficiência primária da atividade de enzimas lisossomais ou das suas proteínas ativadoras envolvidas nas rotas de degradação. Assim, cada esfingolipidose é caracterizada pelo defeito na

atividade de uma hidrolase lisossomal que degrada glicoesfingolipídios (GELs). Estas doenças são usualmente nomeadas conforme o substrato específico acumulado e representa a classe mais prevalente das DLDs. As esfingolipidoses também são consideradas como a causa mais comum de doenças neurodegenerativas pediátricas (Ginzburg et al., 2004). Atualmente, das mais de 50 DLDs conhecidas, aproximadamente um quarto destas doenças é causado por defeito na degradação de esfingolipídios (Kacher e Futermann, 2006).

Depois da descoberta dos lisossomos por Duve e da demonstração da primeira enzima lisossomal defeituosa por Hers em 1963, a primeira deficiência enzimática de uma esfingolipidose foi caracterizada em 1965. Além disso, todas as outras enzimas lisossomais deficientes nestas doenças foram demonstradas nas últimas três décadas. Em 1984, a primeira proteína ativadora foi detectada e dessa forma se expandiu o conceito de esfingolipidoses. Nos anos posteriores, outros trabalhos levaram ao conhecimento dos domínios funcionais moleculares das enzimas lisossomais.

As esfingolipidoses são DLD progressivas e podem ser classificadas com os tipos (variantes) infantil, juvenil e adulto de acordo com o início da doença e com a atividade residual das enzimas envolvidas. 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 monossacarídeos dos GELs nos lisossomos. Com exceção da doença de Fabry, que possui herança ligada ao X, todas as outras esfingolipidoses possuem herança autossômica recessiva (Platt et al., 2003).

Este grupo inclui as doenças de Gaucher tipos 1, 2 e 3, doença de Fabry, doença de Tay Sachs, doença de Sandhoff, gangliosidose GM1 e doença de Krabbe. Com exceção da doença de Gaucher tipo 1, todas estão associadas com o acúmulo de GELs no sistema nervoso (Platt et al., 2003). É provável que o envolvimento neurológico na maioria das esfingolipidoses se deva à presença de grandes quantidades de GELs no cérebro.

De uma forma geral, a apresentação clínica das esfingolipidoses é muito heterogênea, sendo que a evolução clínica dessas varia entre as mesmas e também dentro de cada distúrbio. Os mecanismos exatos de tal variação não são bem conhecidos, mas provavelmente dependem da quantidade e do tipo de GEL acumulado e da cascata patológica secundária a este acúmulo, levando à morte neuronal.

A atividade residual de cada enzima específica varia com as várias mutações dos genes envolvidos. Atividades enzimáticas residuais servem como referência para a gravidade das manifestações clínicas, mas em alguns casos a severidade da doença pode ser independente da atividade residual da enzima. De uma forma geral, variantes clínicas dessas doenças com início na infância apresentam baixa ou nenhuma atividade residual da enzima. Os indivíduos com a forma juvenil têm atividade enzimática detectável, mas em baixo nível, enquanto que na forma adulta há uma maior atividade enzimática (Platt et al., 2003).

1.5.1. Diagnóstico das esfingolipidoses

A variabilidade da apresentação clínica entre as diferentes esfingolipidoses e mesmo dentro da mesma doença, bem como a sintomatologia clínica inespecífica e a

falta de laboratórios de referência para o diagnóstico indicam que a frequência desses distúrbios é subestimada.

Uma vez que as esfingolipidoses representam um grupo importante de doenças neurometabólicas progressivas, devemos lembrar destas enfermidades toda vez que estamos diante de um quadro de regressão neurológica (Arita, 2002).

Por outro lado, o diagnóstico dessas doenças é fundamentalmente laboratorial. A pesquisa de linfócitos vacuolizados e inclusões citoplasmáticas em leucócitos do sangue periférico, assim como a procura de células de acúmulo na medula óssea são procedimentos úteis para o seu diagnóstico.

Atualmente o diagnóstico definitivo da maioria dessas doenças pode ser realizado por método de análise das atividades enzimáticas e biologia molecular. Isso permitiu não somente a identificação precisa das várias esfingolipidoses e suas variantes, como facilitou a identificação de portadores e tornou-se mais prático o diagnóstico pré-natal (Arita, 2002).

A tabela I.1 mostra as principais esfingolipidoses com os defeitos enzimáticos e o GEL acumulado.

Pouco se conhece sobre os mecanismos patogênicos responsáveis pela progressão clínica e que expliquem os achados bioquímicos das esfingolipidoses, apesar dessas doenças já terem sido descritas há várias décadas e uma ampla gama de funções terem sido atribuídas aos GELs (Bektas e Spiegel, 2004). No entanto, modelos destas doenças em camundongos têm facilitado a elucidação da patogênese e conseqüentemente o desenvolvimento de estratégias terapêuticas (Ozkara, 2004).

Tabela I.1. Esfingolipidoses: defeitos enzimáticos e glicoesfingolipídios (GEL) acumulados

| Doença | Defeito enzimático | GEL acumulado |
|------------------------------|---------------------------|--|
| Gaucher | glicocerebrosidase | glicosilceramida, GM1, GM2,GM3, GD3 |
| Krabbe | galactocerebrosidase | galactosilceramida |
| Gangliosidose-GM1 | β -galactosidase | GM1, GM2 , GM3 |
| Niemann-Pick A e B | esfingomielinase | esfingomielina,GM2, GM3 |
| Fabry | α -galactosidase A | globotriaosilceramida |
| Leucodistrofia Metacromática | arilsulfatase A | glicoproteínas sulfatadas, glicolipídios e GM2 |

Já foi proposto que os GELs acumulados nos lisossomos escapam dos mesmos e ativam cascatas celulares moduladoras através da interação com enzimas de síntese de fosfolipídios e proteínas envolvidas na homeostase do cálcio. Isto pode estar relacionado com o estímulo de apoptose e respostas de inflamação (Ginzburg et al., 2004; Raas-Rothschild et al., 2004).

I.5.2. Tratamento das esfingolipidoses

Diferentes estratégias terapêuticas têm sido desenvolvidas para o tratamento das esfingolipidoses, tais como a terapia de reposição enzimática (TRE), a terapia gênica (TG), o transplante de medula óssea (TMO), a terapia com chaperonas químicas e a terapia de redução de substrato (TRS). O objetivo destas terapias é restabelecer a

atividade enzimática nos lisossomos. Isto não é simples para aquelas esfingolipidoses com envolvimento do sistema nervoso central (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; Rorhbach e Clarke, 2007; Suzuki, 2008). Um outro aspecto importante é prevenir o aparecimento da doença através do diagnóstico pré-natal, quando possível.

I.6. Quitotriosidase

I.6.1. Aspectos bioquímicos e moleculares da quitotriosidase

A quitotriosidase (QT), uma quitinase (EC 3.2.1.14) integrante da família de 18 glicosilhidrolases (Aguilera et al., 2002), tem capacidade de hidrolisar quitina. É uma enzima secretada por macrófagos ativados do organismo (Hollak et al., 1994), sendo que, sob condições patológicas específicas, estes macrófagos podem produzir grandes quantidades desta enzima (Hollak et al., 1994; Malaguarnera et al., 2004).

Quitina é um glicopolímero de N-acetilglicosamina, estando presente como componente estrutural em diversas espécies de seres vivos, como por exemplo, na parede celular de fungos, nematódeos, protozoários e no exoesqueleto de diversos insetos. A QT humana exhibe uma sequência homóloga a outras quitinases de vírus, plantas, bactérias, fungos, nematódeos e insetos (van Eijk et al., 2005; Zheng et al., 2005).

Fusetti e colaboradores (2002) sugeriram que a QT, que é encontrada em diversas espécies de invertebrados, bactérias, fungos, insetos, plantas, vírus,

protozoários e parasitas, aja como um inibidor com potencial quimioterapêutico nos seres humanos. Neste particular, Vinetz e colaboradores (2000) verificaram que a quitinase do *Plasmodium falciparum* é requerida para invasão desse parasita no intestino do mosquito transmissor da malária. Suspeita-se também que a QT tenha função de defesa do organismo humano contra patógenos compostos de quitina, pois ela possui a capacidade de degradar tanto a quitina coloidal como a quitina da parede celular do fungo patogênico *Cândida albicans* (Fusetti et al., 2002). Esta hipótese também foi levantada no estudo de Choi e colaboradores (2001) que demonstraram que pessoas com deficiência na atividade da QT eram mais suscetíveis a infecções por nematódeos.

A figura I.3 mostra a reação catalisada pela QT.

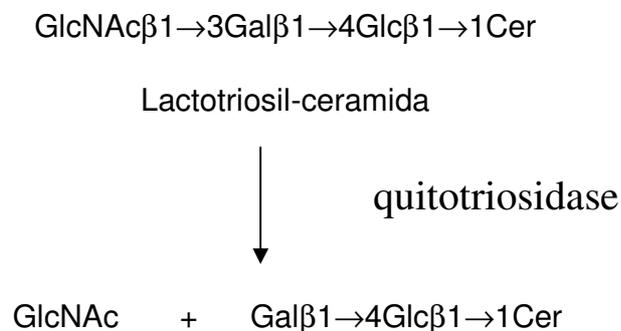


Figura I.3.: Reação da quitotriosidase (Guo et al., 1995; Aguilera et al., 2003)
(Gal=galactose; Glc=glicose; Cer=ceramida; GlcNac=N-acetilglicosamina)

Foi também descrita por Boot e colaboradores (2001) a existência de uma segunda quitinase da família das glicosilhidrolases encontrada em mamíferos chamada de amcase (AMC). Em contraste com a QT, a AMC é extremamente estável em meio

ácido e apresenta um segundo pH ótimo. Esta enzima está localizada no trato gastrointestinal e nos pulmões e tem a função de digestão e/ou defesa humana. A AMC tem capacidade de degradar quitina presente em conchas e na parede celular de fungos. Esta enzima, assim como a QT, possui um domínio catalítico N-terminal com 39 kDa e um domínio C-terminal de ligação à quitina separado por uma região de dobradiça (Boot et al., 2001).

Em seres humanos, há duas isoformas distintas da QT; uma possui 50 kDa com dois PI de 7,2 e 6,5 e a outra possui 39 kDa com um PI de 8,0 (Boot et al., 1995). Renkema e colaboradores (1997) observaram que na extensão C-terminal da isoforma de 50 kDa estão presentes ácidos siálicos contendo glicanos ligados ao oxigênio, responsáveis pelos pontos isoelétricos heterogêneos desta isoforma. A maior parte da isoforma de 50 kDa é secretada como tal, mas parte dela é transformada na isoforma de 39 kDa por uma proteólise na carboxila terminal, com o posterior acúmulo desta isoforma (39 kDa) nos lisossomos. Além disso, foi verificado que o domínio da carboxila terminal da isoforma de 50 kDa é responsável pela forte ligação entre a enzima e a quitina, um achado que não é visto na isoforma de 39 kDa. Assim, apenas a isoforma de 50 kDa pode se ligar a partículas de quitina.

Tjoelker e colaboradores (2000) mostraram, que 49 aminoácidos da porção C-terminal da QT são fundamentais para a ligação da enzima à quitina, sendo esta porção importante para direcionar a enzima para seu substrato. Também foi constatado que o domínio de ligação à quitina depende, para sua funcionalidade, da estabilidade estrutural da enzima que é mantida por ligações internas de dissulfeto e que este domínio possui uma atividade antifúngica independente da atividade catalítica da enzima (Tjoelker et al., 2000).

Por sua vez, Quintana e colaboradores (2006), utilizando a técnica de eletroforese dimensional em gel, identificaram cinco isoformas diferentes da QT em plasma de pacientes com DG. Os autores demonstraram uma correlação entre essas isoformas e a atividade enzimática da QT.

Boot e colaboradores (1998) observaram que o gene da QT está situado no cromossomo 1q31-q32 e consiste de 20 kilobases distribuídas em 12 exons. Estes autores verificaram que alguns indivíduos são homozigotos para uma mutação no gene da QT. Esta mutação consiste na duplicação de 24 pares de base no exon 10 e resulta em uma deficiência na atividade desta enzima. Esta mutação provoca a formação de um novo sítio de clivagem, gerando um RNA mensageiro com uma deleção de 87 nucleotídeos. Um em cada 20 indivíduos é completamente deficiente na atividade da enzima, enquanto que em torno de 35 % dos indivíduos são heterozigotos para esta deficiência. Além disso, também foi descrito por estes pesquisadores que macrófagos cultivados de indivíduos homozigotos para deficiência da QT possuem pouca quantidade de RNA mensageiro e não secretam a enzima (Boot et al., 1998). Além disso, Masoud e colaboradores (2002) observaram que esta mutação não se correlaciona com nenhuma condição patológica, sendo todos os indivíduos homozigotos para esta mutação, saudáveis.

Além disso, Choi e colaboradores (2001) verificaram que indivíduos do sul da Índia deficientes na atividade da QT possuíam uma maior suscetibilidade a infecções por nematódeos, mostrando a importância da enzima na defesa contra patógenos. Neste particular, nematódeos patogênicos sintetizam quitina em vários estágios de sua vida e a QT parece interferir neste processo. Por outro lado, estudos em crianças com leucemia mielóide aguda mostraram uma correlação positiva entre infecções por

bactérias gram-negativas e a existência da duplicação em 24pb no gene da QT. O risco destas infecções aumentou em crianças que possuíam esta mutação (Lehrnbecher et al., 2005). Estas observações indicam um importante papel da QT no controle de doenças infecciosas endêmicas causadas por patógenos contendo quitina, como nematódeos, fungos e bactérias.

Gianfrancesco e Musumeci (2004) analisaram o DNA de roedores e macacos com a finalidade de verificar a existência do gene que codifica para a enzima QT. Verificaram a presença do gene nestas espécies, mostrando que a QT foi conservada durante a escala evolutiva. Além disso, observaram que não foi encontrada nos primatas a duplicação de 24 pares de base, ou seja, a mutação que determina a deficiência de atividade da QT. Esses resultados indicam que esse polimorfismo tenha sido criado durante a evolução humana.

No que diz respeito às propriedades cinéticas da QT, foram descritas algumas características cinéticas da enzima no plasma de indivíduos normais. Guo e colaboradores (1995) determinaram como 5,2 o pH ótimo da enzima e que a mesma era estável, armazenando-se amostras de plasma por até oito anos a -80°C . Além disso, estes pesquisadores verificaram que a QT também possui sua atividade aumentada em quatro doenças de depósito lisossômico (doenças de Krabbe, Gangliosidose-GM1 e Niemann-Pick tipo A e B), postulando-se então que os esfingolipídios acumulados poderiam ter a capacidade de estimular os macrófagos a produzir a QT (Guo et al., 1995). Além disso, Den Tandt e colaboradores (1997) observaram que a atividade enzimática da QT em amostras plasmáticas de indivíduos normais era estável mesmo quando incubada por 24 horas a 45°C , enquanto que a

uma temperatura de 50 °C por 24 horas a enzima teve um decréscimo de 5 % em sua atividade residual.

Em nosso trabalho anterior verificamos que a atividade da QT em pacientes com as doenças de Gaucher e Niemann-Pick era, respectivamente, 600 vezes e 30 vezes maior comparada à de indivíduos normais (Wajner et al., 2004). Além disso, observamos diferenças significativas nos parâmetros pH ótimo, Vmax e termoestabilidade entre todos os grupos analisados. Já, o Km da QT em indivíduos normais foi diferente daquele de pacientes com as doenças de Gaucher e de Niemann-Pick que não diferiram entre si.

Apesar desses estudos, não se sabe ainda as funções da QT em seres humanos e tampouco são conhecidos os mecanismos exatos pelos quais a QT é produzida em alta quantidade na DG e em outras esfingolipidoses ou se nestas situações ela possui as mesmas propriedades cinéticas bioquímicas da enzima de indivíduos normais. Acredita-se, no entanto, que a QT secretada pelos macrófagos é um reflexo de uma resposta inflamatória nessas doenças.

1.6.2. Doenças lisossômicas de depósito com aumento da atividade plasmática da quitotriosidase

O aumento acentuado da atividade da quitotriosidase tem sido encontrado em plasma de pacientes afetados por várias esfingolipidoses, incluindo a doença de Gaucher tipo I, a doença de Krabbe e a gangliosidose GM1 (Barone et al., 2007).

I.6.2.1. Doença de Gaucher

Na doença de Gaucher, uma DLD causada pela deficiência da enzima glicocerebrosidase, a enzima QT geralmente está com sua atividade muito aumentada no plasma dos pacientes afetados, sendo assim um marcador auxiliando no diagnóstico desta enfermidade. Nesta doença, devido à deficiência da glicocerebrosidase, ocorre um acúmulo de glicosilceramida nos lisossomos localizados dentro de macrófagos que aumentam de volume e passam a ser chamados de células de Gaucher. Estas células se acumulam principalmente no baço, fígado e na medula óssea, ocorrendo consequentemente hepatoesplenomegalia, bem como anemia e trombocitopenia (Chen e Wang, 2008).

I.6.2.1.1. Apresentação clínica

Três variantes desta enfermidade são conhecidos.

-Doença de Gaucher tipo I (DG tipo 1) é a forma mais prevalente chamada de não-neuropática que se caracteriza pela ausência de envolvimento neurológico.

-DG tipo 2, é uma forma mais rara chamada de neuropática aguda, caracterizando-se pelo aparecimento prematuro de um comprometimento neurológico severo, reduzindo a expectativa de vida para 2 ou 3 anos (Athens, 1998; Chen e Wang, 2008).

-DG tipo 3, chamada de doença neuropática sub-aguda ou crônica, caracterizando-se por uma progressão lenta com envolvimento neurológico (Beutler e Grabowski, 2001).

I.6.2.1.2. Alterações metabólicas

O defeito metabólico primário desta doença está no bloqueio do metabolismo lisossomal de glicosilceramida (glicocerebrosídeo) e glicosilesfingosina. Na quase totalidade dos pacientes este defeito se deve a deficiência da β -glucosidase (glicocerebrosidase, glicosilceramidase). Raros casos do tipo 3 da doença são devidos à deficiência da saposina (SAP) SAP-C, necessária para a hidrólise in vivo de glicosilceramida. O glicocerebrosídeo acumula-se massivamente no fígado e baço de todos os pacientes com os três tipos da doença. A fisiopatologia da doença é ainda pouco conhecida (Vellodi, 2005). No entanto, a glicosilesfingosina, um composto altamente citotóxico, bem como o Ca^{2+} e respostas inflamatórias parecem estar envolvidas nesta enfermidade.

I.6.2.1.3. Aspectos genéticos

A doença, com exceção da que se acompanha de deficiência da SAP-C, é causada por mutações no gene da β -glucosidase ácida (cromossomo 1q21). N370S, a mutação mais comum em judeus Ashkenazim, também é frequentemente encontrada em populações caucasianas. A mutação N370S está sempre associada a um fenótipo não neuropático, mesmo quando associada a outro alelo mutante. A patogenicidade da enfermidade varia largamente entre os pacientes com o mesmo genótipo, incluindo homozigotos para N370S (Sidransky, 2004; Amato et al., 2004; Lachmann et al., 2004). A segunda mutação mais frequente, L444P está mais associada com os tipos II e III. Alelos complexos causados por rearranjos genéticos são mais frequentemente

associados a formas mais severas, incluindo formas perinatais letais (Mignot et al, 2003).

I.6.2.1.4. Diagnóstico

Quando um paciente apresenta esplenomegalia não explicada, geralmente encaminha-se este indivíduo com suspeita de DG para o diagnóstico laboratorial. Duas características importantes para o diagnóstico da doença são a presença de níveis elevados de fosfatase ácida no soro e a presença de células de Gaucher na medula óssea. As células de Gaucher devem ser diferenciadas de macrófagos gigantes que são observados em enfermidades como leucemia mielóide crônica, talassemias, algumas leucemias agudas e outras. Estes macrófagos são menores, menos numerosos e não formam acúmulos (Giraldo et al., 2001). Para o diagnóstico confirmatório da doença, realiza-se a medida da atividade da enzima glicocerebrosidase em leucócitos (Beutler e Kuhl, 1970) ou em fibroblastos (Beutler et al., 1971; Ho et al., 1972; Hultberg et al., 1973) utilizando-se o substrato artificial fluorogênico. Indivíduos afetados possuem atividade enzimática muito diminuída ou até ausente.

No soro, os níveis de quitotriosidase, enzima conversora de angiotensina, fosfatase ácida tartarato resistente e a quemoquina CCL18/park, estão tipicamente muito elevados. Esses marcadores são utilizados para monitorar pacientes em tratamento.

O diagnóstico pré-natal também pode ser realizado em amostras de vilosidade coriônica ou líquido amniótico (Athens, 1998; Beutler e Grabowski, 2001).

I.6.2.1.5. Tratamento

O tratamento para DG baseia-se na terapia de reposição enzimática (TRE), transplante de medula óssea (TMO) e mais recentemente na terapia de redução de substrato (TRS).

A TRE baseia-se em infusões quinzenais de uma enzima produzida pela técnica do DNA recombinante utilizando-se culturas de células de ovários de hamster chinês (Genzyme.com), a imiglucerase (Aerts et al., 2006; Rohrbach e Clarke, 2007; Weinreb, 2008; Charrow, 2009).

A morbidade e mortalidade referente ao TMO limitaram seu uso para pacientes com DG tipo 1. Para pacientes com a doença neuropática crônica este procedimento pode corrigir o defeito metabólico, melhorando o comprometimento hematológico e visceral. Em alguns pacientes foi descrita uma estabilização do comprometimento ósseo e dos sintomas neurológicos (Cabello e Colombo, 2003).

Na TRS, uma pequena molécula, o miglustat (N-butyldeoxynojirimycin), inibe a síntese de substratos acumulados na DG garantindo que a atividade residual da enzima mutante seja suficiente para evitar o estoque patológico (Jakóbkiewicz-Banecka et al., 2007).

I.6.2.2. Doença de Krabbe

Outra DLD onde há um aumento moderado na atividade da quitotriosidase é a doença de Krabbe ou leucodistrofia globóide. A causa desta enfermidade é a deficiência na atividade da enzima galactosilceramidase, não ocorrendo assim a clivagem de galactosilceramida em galactose e ceramida.

I.6.2.2.1. Apresentação clínica

A DK leva à desmielinização do sistema nervoso central e periférico. Sua incidência é estimada em 1 para 100.000 a 200.000 recém-nascidos vivos. A forma clássica infantil ocorre em 85 % dos casos. Nesta, a doença começa a se manifestar nos primeiros seis meses de vida (Hagberg et al., 1969). Os sintomas iniciais incluem aumento de irritabilidade, choro, vômitos e dificuldades com a alimentação, hiperestesia, espasmos tônicos precipitados por luz ou barulho e sinais de neuropatia periférica. Mais tarde ocorrem episódios hipertônicos seguidos de opistótono com membros superiores flexionados e membros inferiores estendidos. Com a progressão da doença ocorre a perda da visão, seguido da perda de função bulbar e hipotonia. A morte é causada pela hiperexia, complicações respiratórias ou aspiração, classicamente antes dos 2 anos de vida, podendo ocorrer mais tardiamente. O diagnóstico clínico da doença de início tardio é mais difícil.

I.6.2.2.2. Alterações metabólicas

A DK é causada pela deficiência da enzima galactosilceramidase (ou galactocerebrosidase), uma enzima lisossomal que cataboliza a galactosilceramida, o principal componente lipídico da mielina, além de catabolizar a lactosilceramida e a galctosilesfingosina. Para a degradação da galactosilceramida, necessita-se adicionalmente a saposina A (SAP-A), tendo sido identificado um caso da doença causado pela deficiência desta proteína (Spiegel et al., 2005). A deficiência da galactosilceramidase leva a um acúmulo de galactosilceramida nas células globóides (macrófagos multinucleares) encontradas em lesões desmielinizantes da substância

branca e também do metabólito tóxico galactosilesfingosina nos oligodendrócitos e nas células de Schwann. A psicossina, um composto altamente apoptótico aumentado no cérebro de pacientes, é considerada possuir um papel importante na patogênese da doença, especialmente no início com a destruição dos oligodendrócitos, que é uma característica da forma infantil da doença concomitante com a falta de mielinização (Suzuki et al., 1998).

I.6.2.2.3. Aspectos genéticos

O gene da galactosilceramidase (GALC) está localizado na região q31 do cromossomo 14. O complexo 502T/Del, um alelo mutante que está associado a uma grande deleção e a um polimorfismo, parece provir da Suécia e está associado a 50% dos alelos mutantes em boa parte dos países europeus e nos EUA. Os variantes T513M e Y551S são também freqüentes. O genótipo G270D é comum em pacientes de início tardio (Wenger et al., 2000).

I.6.2.2.4. Diagnóstico

O diagnóstico definitivo é fundamentalmente realizado através da medida de atividade da enzima galactocerebrosidase em leucócitos e fibroblastos. Indivíduos afetados possuem atividade enzimática diminuída (Wenger et al., 2000). No entanto, há sintomas e sinais clínicos que devem levar à investigação diagnóstica da DK. Assim, a velocidade de condução nervosa motora é consistentemente baixa nas formas infantil e juvenil, mas pode ser normal em pacientes adultos. A ressonância magnética nuclear mostra áreas de imagens em T2 que se correlacionam bem com áreas de desmielinização e acúmulo de células globóides (Husain et al., 2004). Nos casos de

início tardio, as imagens T2 podem mostrar áreas de hiperintensidade mais localizadas ou em poucos casos podem aparecer normais (Barone et al., 1996; Loes et al., 1999). Nos casos infantis típicos, a tomografia computadorizada mostrou atrofia cerebral difusa com hipodensidade da substância branca. Calcificações podem ser encontradas no tálamo, no gânglio basal e na substância branca periventricular. Potenciais evocados do tronco cerebral também foram estudados (Aldosari et al., 2004).

O diagnóstico confirmatório é realizado medindo a atividade da galactosilceramidase em leucócitos ou em cultura de fibroblastos, utilizando um substrato radioativo natural ou um substrato fluorogênico. O diagnóstico pré-natal também é realizável.

I.6.2.2.5. Tratamento

Na literatura já foram descritos estudos com transplante de células tronco hematopoiéticas em pacientes com a forma tardia da doença de Krabbe ou diagnosticados antes do aparecimento de sintomas neurológicos. Foi observada uma melhora relativa destes pacientes com esse tratamento (Wenger et al., 2000). Transplante de medula óssea alogênico ou transplante de sangue de cordão umbilical podem ser efetivos para a prevenção do aparecimento ou para travar a progressão da doença nos casos de início tardio (Krivit et al., 1998; Peters et al., 2003; Boelens, 2006). Por outro lado, a experiência de transplante de medula óssea em pacientes infantis sintomáticos é muito pobre. Em pacientes infantis clássicos que foram diagnosticados na fase pré-natal, o transplante de sangue de cordão umbilical alterou a história natural da doença de forma favorável.

I.6.2.3. Gangliosidose GM1

Pacientes com gangliosidose GM1 (GM1), uma doença causada pela deficiência da enzima β -galactosidase, também possuem um aumento moderado na atividade da enzima quitotriosidase.

GM1 é um monosialogangliosídeo que constitui aproximadamente 20% dos gangliosídeos do cérebro normal, aumentando de 80% a 90% nesta doença. Este substrato se acumula, principalmente, no fígado e baço. A doença é dividida em três formas clínicas: infantil, juvenil e adulta (Cabello e Colombo, 2003; Brunetti-Pierri e Scaglia, 2008).

I.6.2.3.1. Apresentação clínica

Landing et al. (1964) e O'Brien et al. (1965) foram os primeiros a descreverem a GM1 infantil, enfatizando suas características de lipidose neurovisceral e que partilhava características das doenças de Tay-Sachs e doença de Hurler. As formas com depósito neuronal foram reconhecidas mais tarde. Na forma infantil clássica (tipo 1) as crianças são sempre hipotônicas nos primeiros dias ou semanas de vida, com pequeno controle da cabeça. O atraso no desenvolvimento neurológico é observado aos 3 a 6 meses de idade. Dificuldades na alimentação e déficit de crescimento são comuns na doença. Muitos infantes têm edema facial e periférico. Nos casos típicos, características dismórficas podem estar presentes muito cedo ou se desenvolverem com o tempo, como, por exemplo, face atípica, macroglossia moderada, gengivas hipertróficas e ponte nasal deprimida. A hepatomegalia e a esplenomegalia tardia quase sempre estão presentes. Cifoescoliose dorsolombar é também comum. Uma mancha vermelho-cereja

na mácula é encontrada em 50% dos casos, mas raramente antes dos 6 meses de vida. Uma rápida regressão neurológica é comum depois do primeiro ano de vida, com convulsões generalizadas, distúrbios de deglutição, descerebração e morte muitas vezes antes dos 2 anos de idade.

A forma infantil tardia (tipo 2) inicia geralmente entre os 12 e 18 meses de vida com o aparecimento de uma instabilidade para sentar, ficar em pé ou dificuldade para locomoção (Lyon et al., 1996). O termo forma adulta foi empregado para designar a forma crônica de início tardio da GM1 que inicia na infância tardia, adolescência ou na vida adulta. Os sinais mais comuns desta forma são a disartria e os sinais extrapiramidais, principalmente a distonia (Muthane et al., 2004).

1.6.2.3.2. Alterações metabólicas

A gangliosidose GM1 é causada pela deficiência da enzima lisossomal β -galactosidase ácida que cliva glicoconjugados que possuem uma ligação galactosídica terminal e é necessária também para degradação não somente do gangliosídeo GM1, como também de outros glicoesfingolipídios, oligossacarídeos contendo galactose e sulfatos de queratan. Como consequência, as formas mais graves apresentam características de lipidose neuronal, mucopolissacaridose e oligossacaridose. A β -galactosidase ácida faz parte de um complexo lisossomal multienzimático associado à neuraminidase, à proteína de proteção catepsina a (PPCA) e à n-acetil-galactosamina-6-sulfato-sulfatase (Pshezhetsky e Ashmarina, 2001). Este fato explica o fenótipo clínico similar à galactosialidose, uma condição distinta causada pela deficiência da PPCA, que acarreta uma deficiência secundária da β -galactosidase e sialidase ácida (neuraminidase).

Nos tecidos dos pacientes com GM1, três grupos principais de metabólitos acumulados são identificados: o esfingolípido gangliosídeo GM1, oligossacarídeos derivados de glicoproteínas e sulfato de queratan. Um acúmulo exacerbado de GM1 é encontrado no tecido cerebral. Oligossacarídeos compostos de galactose foram encontrados no fígado e na urina. Sulfato de queratan e outros mucopolissacarídeos acumulam-se no fígado e no baço.

I.6.2.3.3. Alterações genéticas

Aproximadamente 50 mutações foram descritas no gene da β -galactosidase ácida, GLB1 (cromossomo 3 p21.33). Por outro lado, não há uma correlação significativa entre o tipo e lugar da mutação com um fenótipo específico.

I.6.2.3.4. Diagnóstico

O diagnóstico enzimático é realizado através da medida da atividade da enzima β -galactosidase em amostra de leucócitos e fibroblastos através de um substrato artificial fluorogênico ou cromogênico. Indivíduos afetados possuem atividade enzimática diminuída (Suzuki et al., 2001). Linfócitos vacuolizados no exame radiológico ósseo contendo anormalidades típicas de doença de Hurler podem sugerir o diagnóstico de GM1. Na forma infantil, a tomografia computadorizada do crânio e a ressonância magnética geralmente mostram resultados inespecíficos como atrofia difusa do sistema nervoso central (SNC) e perdas de mielina na substância branca. Na forma adulta estão presentes lesões no gânglio basal. Um bom teste de orientação para o diagnóstico são as análises de oligossacarídeos urinários. Na forma infantil clássica, a excreção deste

metabólito é massiva, sendo um achado patognomônico. No entanto, a excreção de oligossacarídeos pode ser menor nas formas com neurodegeneração.

O diagnóstico pré-natal para esta condição também é possível (Suzuki et al., 2001).

I.6.2.3.5. Tratamento

Não há tratamento específico para esta doença. No entanto, a distonia parece melhorar pela administração oral de trihexilfenidil em adultos (Suzuki et al., 2001). Além disso, uma terapia com redução do substrato acumulado usando miglustat tem sido utilizada como uma abordagem terapêutica potencial para ensaios clínicos nas formas de início tardio.

I.6.3. Outras doenças com aumento de atividade da enzima quitotriosidase

Além das DLDs, há outras situações patológicas em que a atividade da QT está elevada (Barone et al., 1999, 2003, 2007). Barone e colaboradores (1999) observaram que na beta-talassemia também ocorre um aumento plasmático na atividade da enzima QT comparável ao visto na DG. O estudo mostrou que 13 de 70 pacientes com beta-talassemia maior possuíam aumento na atividade da QT.

Barone e colaboradores (2003) observaram que crianças africanas com sintomatologia aguda da malária possuíam uma atividade mais aumentada da QT, quando comparada a crianças africanas e caucasianas saudáveis. O estudo concluiu que o aumento da atividade da QT poderia ser o resultado de uma ativação do sistema retículo-endotelial pelo armazenamento de glicolipídios de membrana nos macrófagos.

Estas observações reforçam o papel da QT no controle de doenças endêmicas causadas por patógenos contendo quitina, como nematódeos e fungos. Neste mesmo sentido, Malaguarnera e colaboradores (2003) verificaram em áreas endêmicas para o *Plasmodium falciparum* na África (Burkina Faso e Benin) um aumento da frequência da heterozigotidade para o alelo mutante da deficiência da QT relacionado com um maior número de casos de malária e também de pacientes com anomalias genéticas relacionadas a esta doença. Estas observações sugerem que na África e possivelmente em outros países subdesenvolvidos o gene da QT mantém uma relevante função na defesa imunológica, ativando a resposta por monócitos-macrófagos.

Além disso, Brunner e colaboradores (2007) verificaram um aumento significativo dos níveis plasmáticos da atividade da QT na forma ativa da sarcoidose, uma doença granulomatosa crônica, e propuseram a medida dos níveis plasmáticos dessa enzima para monitorar o tratamento desta enfermidade.

1.6.4. Uso da quitotriosidase no monitoramento do tratamento de doenças lisossômicas de depósito

Como visto anteriormente, um aumento na atividade da QT plasmática ocorre em várias esfingolipidoses. No entanto, dentre elas, a única que possui tratamento comercial disponível é a DG (Charrow, 2009). Nesta doença, a medida da atividade da QT tem sido útil para o acompanhamento do tratamento com TRE nos pacientes afetados (Maire et al., 2007; Weinreb, 2008). À medida que os pacientes respondem ao tratamento, a enzima QT vai diminuindo sua atividade até atingir um valor, ainda acima da normalidade, mas muito inferior àquele do início do tratamento (Isman et al., 2008). Paralelamente, durante os primeiros meses de tratamento se observa uma diminuição

no tamanho dos órgãos afetados e uma melhora no quadro sanguíneo dos pacientes com DG (Hollak et al., 1994).

I.7. Papel da inflamação sobre o fisiopatogenia do dano tecidual em pacientes com doenças neurodegenerativas e doenças lisossomais de depósito

Embora a genética e a bioquímica das DLDs tenham sido muito estudadas, a investigação do papel da resposta imunológica nestas doenças tem recebido pouca atenção. Neste sentido, a evolução dessas doenças, bem como a resposta ao tratamento das mesmas, quando possível, pode estar relacionada ao sistema imunológico. Apesar da compreensão de que o acúmulo de substratos específicos (lipídios) devido às deficiências enzimáticas esteja relacionado com a patogênese dessas doenças, pouco se conhece sobre o papel da ativação do sistema imune devido ao acúmulo dessas macromoléculas. Novas estratégias terapêuticas para as DLDs têm sido utilizadas eficazmente ou experimentalmente, tais como a TRE, a TRS e a terapia gênica, com a finalidade de reduzir a concentração dos substratos tóxicos acumulados. Entretanto, o conhecimento da relação da eficiência desses tratamentos inovadores com a resposta imunológica é rudimentar para a maioria das DLDs.

A verificação de altas concentrações plasmáticas da quitotriosidase em várias DLDs e a verificação de que a síntese dessa enzima é feita por macrófagos ativados indicam um possível papel de um processo inflamatório sistêmico ou cerebral (neuroinflamatório) na patogênese destas doenças. Neste contexto, convém enfatizar que a neuroinflamação é observada em várias patologias neurodegenerativas, incluindo algumas DLDs, nas quais ocorre recrutamento de monócitos e macrófagos do sangue periférico para o sistema nervoso central (Wu et al., 2000; Mizukami et al., 2002).

I.7.1. Fatores pró-inflamatórios e neurodegeneração

As células do sistema imunológico, especialmente os macrófagos e linfócitos T, quando estimulados fabricam elevadas concentrações de vários compostos, chamados de fatores pró-inflamatórios, tais como a interleucina 6 (IL-6), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e outras citocinas.

A IL-6 é produzida por monócitos, macrófagos, linfócitos e fibroblastos e induz à produção de linfócitos B, à proliferação de linfócitos T, à ativação do mecanismo natural de morte celular e à citotoxicidade. Alguns estudos têm demonstrado aumento da concentração plasmática de IL-6 em pacientes com infecção pulmonar (Schutte et al. 1996; Montón et al, 1996), sugerindo que a ação da IL-6 não é somente local, mas também ocorre a nível sistêmico (Heinrich et al., 1990).

O fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) é uma citocina secretada pelos macrófagos, monócitos, linfócitos e neutrófilos. As ações do TNF- α são numerosas e afetam muitos tipos celulares. Macrófagos em repouso podem ser induzidos por TNF- α para sintetizar IL-1 e prostaglandina E2. TNF- α pode, em conjunto com outras citocinas inflamatórias, induzir a produção de proteínas de fase aguda de hepatócitos durante a resposta inflamatória. Adicionalmente ele estimula a expressão dos antígenos classe I e II do Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC Classe I e Classe II), bem como a expressão de várias citocinas e dos fatores estimuladores de colônias de granulócitos e/ou macrófagos (G e/ou GM-CSF). O TNF- α age através de dois tipos de receptores (TNF-R1 e TNF-R2 ou CD120a e CD120b, respectivamente).

Acredita-se que esses fatores pró-inflamatórios são responsáveis pela febre, anorexia, mal-estar e outros sintomas que ocorrem em infecções ou inflamações

agudas e crônicas e que são decorrentes da comunicação por múltiplas vias das células do sistema imunológico que se encontram no sangue periférico com o cérebro (Konsman et al., 2002). No entanto, apesar de muitas investigações nos últimos 20 anos, não se conhece ainda todos os mecanismos moleculares e celulares que mediam essas inter-relações do sangue com o SNC, resultando nas anormalidades metabólicas e nos sintomas clínicos de infecção (Dantzer e Kelley, 2007). Entretanto, sabe-se que a IL-1 β , a IL-6 e o TNF- α gerados na periferia penetram no cérebro pela barreira hematoencefálica através de transportadores presentes nas células endoteliais (Banks, 2005), estimulando as células da micróglia, que estimulam os macrófagos residentes cerebrais e os astrócitos a sintetizar as citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α pelo SNC que por sua vez sinalizam os neurônios a produzir hipertermia e os outros sinais característicos do processo inflamatório, além de provocar morte neuronal (Konsman et al., 2000; Combrinck et al., 2002; Turrin e Rivest, 2004).

Assim, as citocinas podem atuar no cérebro através de um ou mais dos seguintes mecanismos: ruptura da barreira hematoencefálica, penetração no cérebro ou síntese no SNC. As células cerebrais capazes de secretar citocinas são a micróglia, os astrócitos, as células endoteliais e os neurônios. Há evidências também do envolvimento de citocinas periféricas na inflamação cerebral. A barreira hematoencefálica é permeável às células da linhagem imune, fagócitos mononucleares derivados da periferia, linfócitos T, células naturais Killer e leucócitos polimorfonucleares que produzem e secretam citocinas, todos podendo contribuir para a inflamação do SNC.

As células da micróglia são muito sensíveis a alterações da homeostase cerebral em resposta a antígenos, microorganismos e células danificadas e quando ativadas

proliferam rapidamente, além de produzir citocinas em grandes quantidades, resultando desta forma em um processo inflamatório intenso. Neste particular, um papel crítico da inflamação tem sido postulado ocorrer em doenças neurodegenerativas progressivas, tais como, por exemplo, na doença de Alzheimer em que foi constatada a presença de micróglia ativada (McGeer et al., 2006). Foi também verificado que infecções sistêmicas aceleram o déficit cognitivo desses pacientes e que a chance de desenvolver essa doença aumenta em 100% relativamente à população geral em indivíduos submetidos a infecções sistêmicas (Holmes et al., 2003; Yp et al., 2006). Um processo autoimune inflamatório levando a desmielinização e inflamação generalizada do SNC também foi verificado na esclerose múltipla (Bauer et al., 2001). No que se refere às DLDs, foi demonstrado em um modelo de gangliosidose GM2 que o recrutamento de macrófagos no SNC é mediado pela proteína inflamatória de macrófagos 1- α (MIP-1 α) que está envolvida na patogênese dessa doença.

Defeitos genéticos da atividade das enzimas β -galactosidase, galactocerebrosidase e β -glicosidase têm efeitos devastadores sobre o SNC, resultando na gangliosidose GM1, doença de Krabbe e doença de Gaucher tipo II e III, respectivamente, que são o foco de nossa presente investigação. Na GM1 ocorrem alterações primárias de neurônios que se tornam distendidos e com corpos citoplasmáticos membranosos, enquanto astrócitos e a microglia também parecem vacuolizados. Neste particular, foi demonstrado que o acúmulo anormal de gangliosídeo GM1, o achado bioquímico mais importante dessa doença, provoca apoptose neuronal em um modelo em camundongo de GM1 (Tesitore et al., 2004). Por outro lado, este acúmulo provoca uma resposta neuroinflamatória associada com a ativação de marcadores inflamatórios e citocinas que, por sua vez, ativam a micróglia e macrófagos

no sítio de apoptose (Jeyakumar et al., 2003). Já na doença de Krabbe ocorre acúmulo do lipídio tóxico psicossina devido à deficiência da atividade da enzima galactocerebrosidase. O acúmulo de psicossina em oligodendrócitos provoca a morte de células neurais, levando à desmielinização (Suzuki, 1998). Também foi observado em um modelo animal de doença de Krabbe que o acúmulo de psicossina induz citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-6), além de ativar a enzima óxido nítrico sintase com subsequente produção de óxido nítrico e seus derivados tóxicos (Giri et al., 2002).

II.OBJETIVOS

Geral

O presente trabalho objetivou fundamentalmente determinar a atividade e as propriedades cinéticas da enzima quitotriosidase em plasma de pacientes com a doença de Krabbe, gangliosidose GM1, doença de Gaucher tipo I e heterozigotos para a doença de Gaucher tipo I que pudessem servir como marcadores diagnósticos para distinguir essas várias entidades patológicas. Almejamos também estudar a associação dos fatores pró-inflamatórios IL-6 e TNF- α com a atividade e as propriedades dessa enzima e a atividade da β -glicosidase, β -galactosidase e galactocerebrosidase bem como a associação de inflamação sistêmica com as principais manifestações clínicas nestas doenças.

Específicos

1. Determinar e comparar a atividade da enzima quitotriosidase no plasma de pacientes com as doenças de Gaucher tipo I, Krabbe, gangliosidose GM1, heterozigotos para a doença de Gaucher tipo I e em indivíduos normais.
2. Determinar e comparar o Km, velocidade máxima, pH ótimo e termoestabilidade da enzima quitotriosidase no plasma de pacientes com as doenças de Gaucher tipo I, Krabbe, gangliosidose GM1, heterozigotos para a doença de Gaucher tipo I e em indivíduos normais.
3. Determinar e comparar a atividade da enzima quitotriosidase em plasma de pacientes com a doença de Gaucher tipo I submetidos ou não ao tratamento de reposição enzimática.

4. Determinar e comparar o Km, velocidade máxima, pH ótimo e termoestabilidade da enzima quitotriosidase em plasma de pacientes com a doença de Gaucher tipo I submetidos ou não ao tratamento de reposição enzimática.
5. Determinar e comparar os níveis dos parâmetros inflamatórios fator de necrose tumoral alfa e interleucina 6 no plasma de pacientes com as doenças de Gaucher tipo I, Krabbe, gangliosidose GM1, heterozigotos para a doença de Gaucher tipo I e em indivíduos normais.
6. Estabelecer associações entre os parâmetros inflamatórios fator de necrose tumoral alfa e interleucina 6 com a atividade e as propriedades cinéticas da enzima quitotriosidase no plasma de pacientes com as doenças de Gaucher tipo I, Krabbe, gangliosidose GM1, heterozigotos para a doença de Gaucher tipo I e em indivíduos normais.
7. Estabelecer associações entre os parâmetros inflamatórios fator de necrose tumoral alfa e interleucina 6 com a atividade das enzimas β -glicosidase (pacientes com doença de Gaucher tipo I), β -galactosidase (pacientes com gangliosidose GM1) e galactocerebrosidase (pacientes com doença de Krabbe).
8. Correlacionar os parâmetros inflamatórios fator de necrose tumoral alfa e interleucina 6 e a atividade e as propriedades cinéticas da enzima quitotriosidase com as principais manifestações clínicas nas doenças de Krabbe e gangliosidose GM1.

III. MATERIAL E MÉTODOS

População

A população em estudo foi constituída de pacientes com as doenças de Gaucher tipo I (DG), Krabbe (DK) e gangliosidose GM1 (GM1) atendidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre e em outros hospitais brasileiros, cujas amostras foram enviadas ao Serviço de Genética Médica do HCPA para avaliação diagnóstica, bem como de heterozigotos obrigatórios para a doença de Gaucher tipo I (HG) e de indivíduos (crianças e adultos) normais.

Critérios de inclusão

Foram considerados elegíveis para a pesquisa todos os pacientes diagnosticados com DG tipo I, DK, GM1, e HG, bem como indivíduos normais (controles) com idade semelhante ao dos vários grupos de pacientes.

Critérios de exclusão

Pacientes ou controles com doença reumática, processos infecciosos ou inflamatórios.

Pacientes ou controles que não assinaram o termo de consentimento informado.

III.1. Amostras de plasma

A amostra estudada foi composta por três grupos diferentes. No primeiro grupo estudou-se a atividade e as propriedades cinéticas da enzima quitotriosidase em

pacientes com doença de Gaucher tipo I (DG), doença de Krabbe (DK), gangliosidose GM1 (GM1), heterozigotos para doença de Gaucher tipo I (HG) e controles, ou seja, indivíduos saudáveis. O segundo grupo foi composto de pacientes com a doença de Gaucher tipo I não tratados e após tratamento com terapia de reposição enzimática por três meses, estudando-se nesse grupo a atividade e as propriedades cinéticas da enzima quitotriosidase. No último grupo, constituído de pacientes com doença de Gaucher tipo I (DG), doença de Krabbe (DK) e gangliosidose GM1 (GM1), heterozigotos para doença de Gaucher tipo I (HG) e indivíduos saudáveis (controles), estudou-se a associação entre os fatores pró-inflamatórios interleucina 6 e fator de necrose tumoral alfa com a atividade e as propriedades cinéticas da enzima quitotriosidase, bem como com as atividades das enzimas β -glicosidase, galactocerebrosidase e β -galactosidase e com algumas manifestações clínicas.

III.1.1. Determinação da atividade e propriedades cinéticas da quitotriosidase

Para o estudo bioquímico e cinético da quitotriosidase, contou-se com os seguintes grupos de indivíduos:

- I. Grupo controle: 29 indivíduos saudáveis
- II. Pacientes com doença de Gaucher tipo I (DG) (27 indivíduos)
- III. Pacientes com doença de Krabbe (DK) (9 indivíduos)
- IV. Pacientes com gangliosidose GM1 (GM1) (19 indivíduos)
- V. Heterozigotos para doença de Gaucher tipo I (HG) (19 indivíduos)

III.1.2. Estudo da quitotriosidase em pacientes com doença de Gaucher antes e após tratamento por terapia de reposição enzimática

O segundo estudo foi composto de 4 pacientes com a doença de Gaucher tipo I não tratados e após três meses de tratamento com terapia de reposição enzimática.

III.1.3. Comparação entre os níveis plasmáticos dos fatores pró-inflamatórios IL-6 e TNF- α com a atividade e as propriedades cinéticas da quitotriosidase, com a atividade da β -glicosidase, β -galactosidase e galactocerebrosidase e com algumas manifestações clínicas nos pacientes afetados pelas doença de Krabbe e gangliosidose GM1

Compararam-se os níveis plasmáticos dos fatores pró-inflamatórios IL-6 e TNF- α com a atividade e as propriedades cinéticas da quitotriosidase, a atividade da β -glicosidase, β -galactosidase e galactocerebrosidase bem como com algumas manifestações clínicas comuns em cada grupo de indivíduos, na tentativa de detectar associações que pudessem esclarecer a patofisiologia dos portadores dessas doenças.

Este grupo consistiu de:

- I. Grupo controle: 22 indivíduos saudáveis
- II. Pacientes com doença de Gaucher tipo I (DG) (21 indivíduos)
- III. Pacientes com doença de Krabbe (DK) (13 indivíduos)
- IV. Pacientes com doença de gangliosidose GM1 (GM1) (31 indivíduos)
- V. Heterozigotos para doença de Gaucher tipo I (HG) (14 indivíduos)

Os grupos controle foram compostos de indivíduos sadios que fizeram doação de sangue no banco de sangue do HCPA, de indivíduos do Serviço de Genética Médica do HCPA, bem como de crianças cujo sangue foi coletado no Serviço de Patologia do HCPA com permissão dos pais ou responsáveis. O material dos pacientes foi oriundo do Serviço de Genética Médica do HCPA, onde o diagnóstico foi realizado. As amostras de sangue do grupo HG foram obtidas de pais de pacientes com DG. Destes indivíduos coletou-se sangue para posterior separação do plasma para análise. As amostras não foram identificadas após a coleta. Todos os pacientes ou seus responsáveis que participaram do estudo assinaram um termo de consentimento. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo comitê de ética do GPPG/HCPA.

III.2. Coleta, Processamento e Armazenamento das amostras

- Coleta:

A amostra de sangue total foi obtida por punção venosa em seringa heparinizada, e posteriormente separou-se plasma para medida da atividade da enzima quitotriosidase.

- Processamento e Armazenamento:

A amostra de sangue total com volume de 5 mL foi centrifugada a 400 *g* por 10 minutos para completa separação entre o plasma e os outros componentes sanguíneos. A amostra foi identificada, mantendo-se o anonimato, e armazenada em freezer a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

III.3. Estudos bioquímicos

III.3.1. Ensaio enzimático para quitotriosidase

III.3.1.1. Soluções

- **Ácido cítrico 0,2M:**

-Ácido cítrico 3,84g

Dissolvido em 100mL de água destilada. Mantida em geladeira.

- **Albumina 10mg/mL**

-Albumina bovina 100mg

Dissolvida em 10mL de água destilada. Mantida em geladeira.

- **4-Metilumbeliferil- β -D-N-N'-N''-triacetilquitotriosideo (substrato)**

Foram preparadas duas soluções-mãe de 0,026 mM e 0,1 mM do substrato 4-Metilumbeliferil- β -D-N-N'-N''-triacetilquitotriosideo. Para solução-mãe 0,026 mM, foram pesados 1mg do substrato artificial, diluiu-se em 23 mL de tampão citrato 100mM-fosfato-200 mM e completou-se o volume até 50 mL com água destilada. Para solução-mãe 0,1mM foram pesados 1mg de substrato artificial, diluiu-se em 5,98 de tampão citrato 100 mM-fosfato-200 mM e completou-se o volume até 13 mL com água destilada. O material foi mantido em agitação por algumas horas até a completa dissolução. De acordo com a tabela III.1, foram realizadas as diluições com o substrato, com um volume final de 550 μ L.

Tabela III.1: Preparação do substrato da reação em diversas concentrações (0,00125mM a 0,026mM)

| CONCENTRAÇÃO FINAL (mM) | SOLUÇÃO-MÃE 0,026 mM (μL) | ÁGUA DESTILADA (μL) |
|------------------------------------|---|---|
| 0,00125 | 26 | 524 |
| 0,0019 | 40 | 510 |
| 0,0025 | 53 | 497 |
| 0,0038 | 80 | 470 |
| 0,0050 | 106 | 444 |
| 0,0062 | 131 | 419 |
| 0,0075 | 159 | 391 |
| 0,010 | 211 | 339 |
| 0,020 | 423 | 127 |
| 0,026 | 550 | 0 |

Para as curvas de substrato para os cálculos de K_m e V_{max} foram utilizadas concentrações do substrato nas concentrações de 0,0012 a 0,1 mM.

- **β -Metilumbeliferona (curva-padrão):**

Foi preparada uma solução-mãe 25 mM, pesando 49,5 mg de β -Metilumbeliferona, diluída em 10 mL de água destilada. Retirou-se 100 μ L de solução-mãe 25 mM, que foi diluída em 10 mL de água destilada (solução 250 μ M). A solução

250 μM foi mantida no freezer. Para curva-padrão, esta solução foi descongelada e diluída, de acordo com a tabela III.2., para o preparo de soluções finais. Estas soluções finais foram divididas em alíquotas de 0,2mL/cada, mantidas no freezer, sendo descongeladas somente para o uso.

Tabela III.2.: Concentrações de β -Metilumbeliferona para curva-padrão

| CONCENTRAÇÃO FINAL NO MEIO (nM) | SOLUÇÃO 250μM (μL) | ÁGUA DESTILADA (μL) |
|--|---|--|
| 0,5 | 20 | 1980 |
| 1 | 40 | 1960 |
| 2 | 80 | 1920 |
| 3 | 120 | 1880 |

- **Tampão citrato 100 mM-fosfato 200 mM pH 5,2**

-Solução 1: ácido cítrico 0,2 M- 3,84 g de ácido cítrico anidro dissolvidos em 100 mL de água destilada

-Solução 2: fosfato dissódico (Na_2HPO_4) 0,4 M- 2,84 de Na_2HPO_4 dissolvidos em 50 mL .

Foram misturados 23,3 mL da solução 1 com 26,7 mL da solução 2, adicionou-se mais ou menos 40 mL de água , ajustou-se ao pH 5,2 e completou-se até o volume de 100 mL com água destilada.

- **Tampão glicina-hidróxido de sódio 0,5 M pH 10,3**

-glicina 37,53 g

-hidróxido de sódio 12,5 g

Dissolvido em 800 mL de água destilada. O pH foi ajustado com NaOH 10M
Foi completado com água destilada até um volume final de 1000 mL. Mantido em geladeira.

III.3.1.2.Procedimento

A atividade da enzima quitotriosidase foi medida, em plasma, de acordo com a técnica de Hollak e colaboradores (1994), conforme descrito abaixo:

1. Os ensaios bioquímicos foram todos executados em banho de gelo com o intuito de conservar a integridade das amostras e do substrato.

2. As amostras plasmáticas foram pré-tratadas com ácido cítrico 0,2 M (50 μ L de plasma e 5 μ L de ácido). Nas amostras do grupo DG, procedeu-se uma diluição prévia (1:50) com albumina 1% para assegurar as condições de saturação do substrato, o que não foi feito para os indivíduos afetados pelas outras esfingolipidoses estudadas.

3. O substrato 4-metilumbeliferil- β -D-N,N',N''-triacetilquitotriosideo 0,026 mM foi pesado e diluído em tampão citrato 100 mM fosfato 200 mM pH 5,2, e congelado em tubos de eppendorf.

4. Em seguida, foram executadas as dosagens de acordo com o quadro abaixo:

| | Tubo teste (μL) | Tubo branco (μL) |
|------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| Amostra acidificada ou c/ albumina | 5 | - |
| Água destilada ou albumina | - | 5 |
| Substrato diluído | 100 | 100 |

5. Os tubos foram homogeneizados manualmente e incubados em banho-maria a 37°C por 15 minutos.

6. A reação enzimática foi interrompida com a adição de 1mL de tampão glicina-NaOH pH 10,3 em cada tubo.

7. Foi preparada uma curva-padrão de β -metilumbeliferona, de acordo com item III.3.1.1.. A leitura da fluorescência foi executada em um espectrofluorômetro Hitachi em comprimento de onda de 450 nm de emissão e 365 nm de excitação. O resultado foi expresso em nmol/h/mL.

III.3.2. Determinação do pH ótimo

Para determinação do pH ótimo, utilizou-se a mesma técnica de medida da atividade da quitotriosidase; a diferença foi a variação do pH do substrato 4-metilumbeliferil- β -D-NN'N''-triacetilquitotriosideo na concentração de 0,026mM, conforme a escala abaixo:

pH: 3,5 ; 4,0; 4,2; 4,4; 4,6; 4,8; 5,0; 5,2; 5,4; 5,6; 5,8; 6,0; 6,2; 6,4 e 6,8

Foi realizada a curva do pH ótimo para todas as amostras de plasma dos indivíduos normais e pacientes afetados pelas DG, DK e GM1 e heterozigotos para a DG.

III.3.3. Determinação do K_m e V_{max}

Para a determinação da curva de Michaelis-Menten (curva de substrato), foram utilizadas concentrações que variaram de 1,25 μM a 100 μM . O pH do substrato utilizado foi o já pré-estabelecido em estudos anteriores. Determinou-se a linearidade e, logo a seguir, calculou-se a constante de Michaelis-Menten (K_m) e a velocidade máxima (V_{max}) através de concentrações de substrato que variaram conforme o grupo de indivíduos estudado. Os valores destas constantes foram calculados de acordo com a curva de Lineweaver e Burk (1934).

Para a determinação do K_m e V_{max} , foram escolhidos os intervalos de concentração de substrato que constam na tabela III.3 para cada grupo de indivíduos.

Tabela III.3: Intervalos de concentração de substrato utilizados para a determinação do K_m e V_{max} da quitotriosidase em plasma dos grupos estudados.

| Enzima quitotriosidase | Intervalo de concentração de substrato (μM) |
|---------------------------------|--|
| Doença de Krabbe | 2,0-5,5 |
| Doença de Gaucher tipo I tipo I | 1,25-7,5 |
| Doença Gangliosidose GM1 | 3,0-10 |
| Heterozigoto para DG | 1,0-4,5 |

III.3.4. Estabilidade ao calor

Para o estudo de termoestabilidade da quitotriosidase, o plasma de cada indivíduo foi pré-incubado a 60 °C por 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 e 25 minutos antes da adição do substrato na concentração de 2,6 µM. Após a adição do substrato, a reação foi realizada a 37 °C por 15 minutos e interrompida com a adição de tampão glicina-NaOH pH 10,3. O tubo controle com atividade da enzima considerada como 100 % não foi incubado a 60 °C, mas conservado em banho de gelo. A atividade residual das amostras pré-incubadas a 60 °C foi calculada em percentagem do controle (100 %).

III.4. Parâmetros inflamatórios: Determinação das concentrações plasmáticas do fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e da interleucina 6 (IL-6)

O fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e a interleucina 6 (IL-6) foram determinadas no plasma de pacientes com as doenças de Gaucher tipo I, Krabbe e gangliosidose GM1, bem como em heterozigotos para a doença de Gaucher tipo I e em indivíduos normais (controles) através da técnica de enzimoimunoensaio por quimioluminescência com o *kit* de alta sensibilidade para determinação de citocinas Lincoplex (Linco Research, Millipore, USA). Convém salientar que os pacientes com doença de Gaucher tipo I não estavam recebendo qualquer tratamento quando da coleta de sangue para a determinação dos níveis plasmáticos de TNF-α e IL-6. O *kit* tem capacidade para 96 testes (placa com 96 espaços), porém 12 espaços foram utilizados para o desenvolvimento da curva padrão (duplicata para seis pontos-concentrações) da mesma forma que as amostras.

O princípio do desenvolvimento dos testes é baseado em uma reação do tipo antígeno-anticorpo. Inicialmente foram preparados todos os reagentes e foi

desenvolvida a curva padrão a partir de rediluições dos reagentes TNF- α e IL-6, definindo-se 6 pontos com concentrações progressivamente menores (0,13; 0,64; 3,2; 16,0; 80,0 e 2.000,0 pg/mL).

III.4.1. Preparação dos padrões

A um frasco de polipropileno contendo padrões de IL-6 e TNF- α liofilizados foi adicionado 1,0 mL de água destilada de modo a se obter uma concentração final de 2.000 pg/mL de cada citocina. Uma diluição seriada deste padrão com 200 μ L de tampão de ensaio (PBS 50 molar, pH 7,4, contendo EDTA 25 mmolar, 0,08% de azida sódica, 0,05% de Tween 20 e 1% de BSA) foi preparada em tubos de polipropileno previamente rotulados, de modo a se obter concentrações de 0,13; 0,64; 3,2; 16,0; 80,0 e 2.000,0 pg/mL. Como ponto 'zero' foi usado o próprio tampão. Durante a preparação da diluição cada tubo foi agitado em vortex por 10 segundos para homogeneização.

III.4.2. Preparação do anticorpo ligado às microesferas

Cada frasco contendo IL-6 e TNF- α acoplados a microesferas de poliestireno foi sonificado por 30 segundos. 150 μ L do conteúdo de cada frasco foram misturados e levados a 3 mL com o mesmo tampão usado na preparação dos padrões.

III.4.3. Preparação dos controles, tampão de lavagem e soro matrix

Trinta minutos antes do início da técnica, reconstituiu-se os controles – 1 frasco de cada - I e II com 250 μ L de água deionizada. A seguir o tampão de lavagem foi preparado por diluição de 10 vezes, colocando 270 mL de água bidestilada em 30 mL do tampão concentrado. O soro matrix foi preparado adicionando 5 mL de água

deionizada no frasco do soro, após o que foi homogeneizado. Após 10 min, este soro foi congelado a -20 °C para utilização futura.

III.4.4. Técnica de determinação das concentrações plasmáticas de IL-6 e TNF- α

Todos os reagentes estavam a 22 °C.

1. Uma placa de microtitulação foi diagramada no Luminex® XMAP® Technology plataforma (Luminex Corporation, Texas, USA) com as posições de cada padrão controle e amostras.

2. Em placa de microtitulação foram adicionados 200 uL do tampão de ensaio em cada orifício (poço) da microplaca para pré-umidificá-la. A placa foi coberta com papel alumínio e ficou sob agitação por 10 minutos.

3. O tampão de ensaio foi removido sob vácuo (FANEM/Diapump, modelo 089-CA, São Paulo, Brasil).

4. Vinte e cinco uL das microesferas previamente sonicadas por 30 segundos foram adicionados a cada poço da microplaca.

5. O líquido foi removido sob vácuo e 50 uL do tampão de ensaio foram adicionados no poço 'zero' da curva padrão. A seguir 50 uL do tampão de ensaio foram adicionados nos poços correspondentes às amostras.

6. Vinte e cinco uL de padrões e controles foram então adicionados nos respectivos poços e logo após 50 uL de soro diluente livre de citocinas que acompanha o kit foram adicionados na curva padrão e controles.

7. Cincoenta uL de amostra foram adicionados em cada poço.

8. A placa foi coberta com papel alumínio e incubada sob agitação (Agitador de microplacas Heidolph Titratamax 100, Uniscience, São Paulo, Brasil) por 1h à

temperatura ambiente (20-25 °C), 16h a 4 °C e mais 1h à temperatura ambiente sob agitação.

9. Após o líquido dos poços foi removido sob vácuo.

10. A microplaca foi lavada 2 vezes com 200 uL do tampão de lavagem, filtrando-se a vácuo entre cada lavagem. O excesso de líquido foi removido contra papel-toalha.

11. Cincoenta uL de anticorpos de alta sensibilidade biotinilados anti-IL-6 e anti-TNF- α foram adicionados a cada poço.

12. A microplaca foi coberta com papel alumínio e incubada sob agitação por 30 minutos à temperatura ambiente (20-25 °C).

13. Cincoenta uL de solução streptavidina-ficoeritrina foram adicionados a cada poço .

14. A microplaca foi então coberta com papel alumínio e incubada sob agitação por 30 minutos à temperatura ambiente (20-25 °C) e após o conteúdo de cada poço foi removido a vácuo.

15. A microplaca foi lavada 2 vezes com 200 uL do tampão de lavagem, filtrando-se a vácuo entre cada lavagem. O excesso de líquido foi removido com papel-toalha.

16. Cem uL de líquido foram adicionados em cada poço para ressuspensão das microesferas e a micropacaplaca foi coberta com papel alumínio e agitada por 5 minutos.

17. A microplaca foi finalmente levada ao Luminex® para aspiração e leitura fluorimétrica das amostras.

III.5. Considerações éticas

Toda pesquisa realizada em seres humanos visa o mínimo de intervenções possíveis. Assim, todas as amostras obtidas a partir do material enviado ao nosso laboratório pelos médicos assistentes vieram acompanhadas de um termo de consentimento assinado pelo responsável ou mesmo pelo paciente. Os pais ou responsáveis pelos pacientes foram devidamente informados e orientados, conforme formulário de consentimento pós-informação (Anexo I). Não foram admitidos no estudo pacientes ou controles sem o consentimento dos pais ou responsáveis legais. O projeto foi aprovado pelo Grupo de pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, através da Comissão Científica e da Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde e foi protocolado com o número 05-309.

III.6. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média ou média \pm desvio padrão, quando a distribuição era paramétrica, ou como média e intervalo de variação, ou então como mediana e percentis 25 e 75 nos casos com distribuição não paramétrica. Para a comparação entre as médias dos cinco grupos estudados (indivíduos normais e pacientes com DG tipo I, GM1, DK e heterozigotos para DG), utilizou-se o teste de análise de variância (ANOVA) de uma via ou o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Nos casos em que o F foi significativo, foi utilizado o teste de Tukey (variâncias homogêneas) ou Dunnet (variâncias não homogêneas) para a comparação entre as médias com distribuição normal dos vários grupos ou pelo teste de Student-Newman-Keuls para análise não paramétrica. Para a comparação de duas médias, utilizou-se o teste paramétrico *t* de Student para amostras independentes ou o

teste não paramétrico de Mann-Whitney. Os coeficientes de correlação de Pearson (estatística paramétrica) ou Spearman (estatística não-paramétrica) também foram empregados nos estudos de associação. Somente os valores estatísticos significantes de F, *t*, *r*, *r_s* e qui-quadrado (χ^2) com suas significâncias foram mostrados no texto. Toda a análise estatística foi realizada através do programa de estatística SPSS/PC+, versão 13, sendo o nível de significância fixado como $p < 0,05$.

IV. RESULTADOS

Os resultados iniciais da presente investigação com pacientes com as doenças de Gaucher tipo I (DG), Krabbe (DK) e gangliosidose GM1 (GM1), heterozigotos para a doença de Gaucher tipo I (HG) e de indivíduos normais (controles) foram relacionados à atividade e às propriedades cinéticas da quitotriosidase no plasma desses indivíduos e publicados recentemente (Wajner et al., 2007 – Anexo 4).

A seguir descreveremos detalhes destes resultados que não aparecem no artigo científico referido acima e que ajudam a melhor entender os métodos bioquímicos (abordagem bioquímica) utilizados para a medida e comparação entre a atividade e as propriedades cinéticas da quitotriosidase.

IV.1. Comparação entre a atividade da enzima quitotriosidase em plasma de indivíduos normais, pacientes com as doenças de Gaucher tipo I (DG), Krabbe (DK), gangliosidose GM1 (GM1) e heterozigotos para a doença de Gaucher tipo I (HG)

A figura IV.1 ilustra as atividades médias da QT transformadas em função logarítmica em plasma de indivíduos normais, homozigotos para DG, DK, GM1 e heterozigotos para a DG. Verificou-se que as atividades médias desta enzima nos pacientes com DG, DK e GM1 foram aproximadamente 600, 12 e 15 vezes maiores, respectivamente, em comparação à atividade da enzima nos controles. As atividades encontradas nos quatro grupos de pacientes homozigotos estudados foram estatisticamente diferentes do grupo controle e dos heterozigotos para DG, grupo este que não diferiu dos controles ($F(5,112)= 37,68$; $p < 0,0001$). Pode-se ainda observar a

sobreposição das atividades da QT nos controles e HG, e a maior atividade nos vários grupos de pacientes estudados com ênfase para os pacientes com DG.

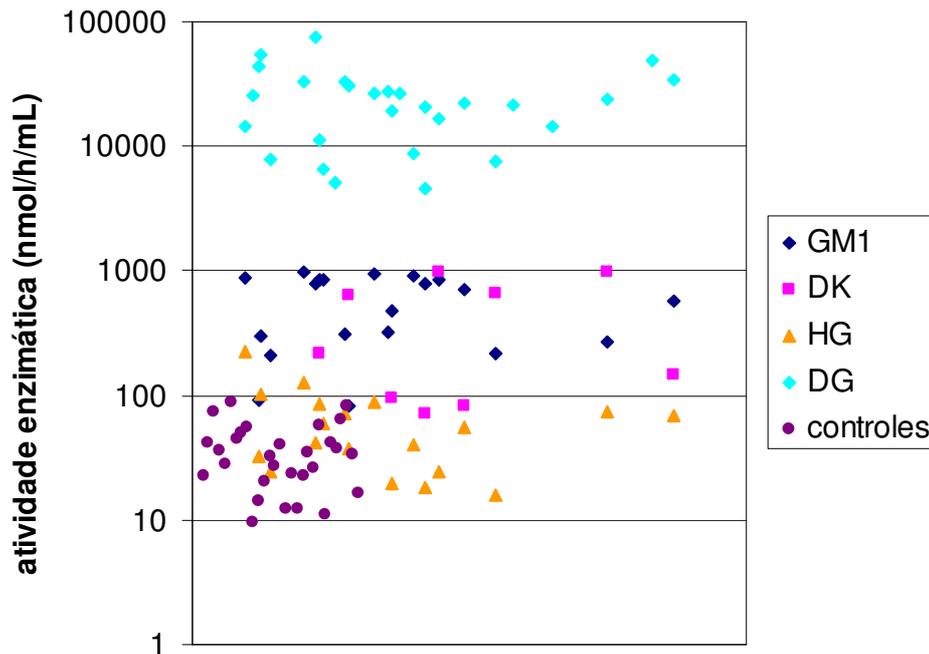


Figura IV.1.: Atividade plasmática da quitotriosidase (QT) em indivíduos normais (n=29), em homocigotos para doença de Gaucher tipo I (DG, n=27), doença de Krabbe (DK, n=9) e gangliosidose GM1 (GM1, n=19), bem como em heterocigotos para DG (HG n=19). Os resultados estão expressos em escala logarítmica.

IV.2. Determinação do pH ótimo da enzima quitotriosidase em plasma de indivíduos normais, pacientes com a doença de Gaucher tipo I (DG), doença de Krabbe (DK), gangliosidose GM1 (GM1) e heterozigotos para a doença de Gaucher tipo I (HG)

A determinação do pH ótimo na enzima quitotriosidase em indivíduos normais revelou a existência de uma faixa de pH ótimo variando de 4,8 a 5,4 e tendo um valor de $5,18 \pm 0,36$ (média \pm DP) (figura IV.2).

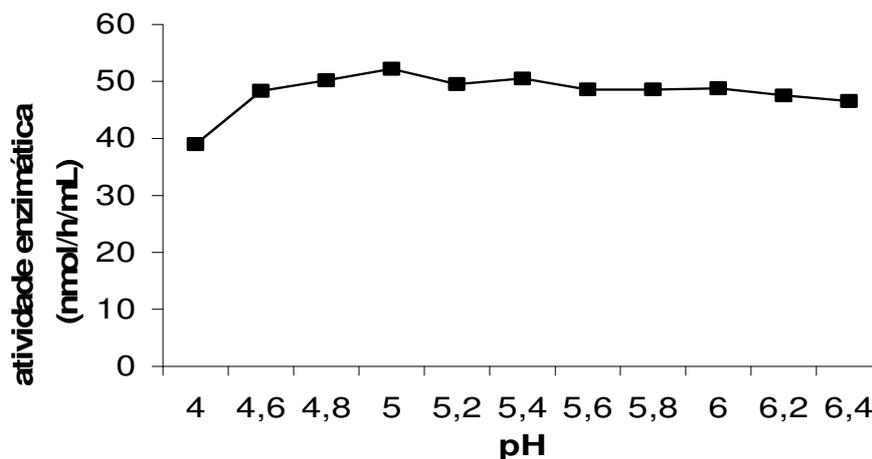


Figura IV.2.: Determinação do pH ótimo da enzima quitotriosidase em plasma de indivíduos normais (n=29). A medida da atividade foi realizada com o substrato artificial 4-metilumbeliferil- β -D-N,N',N''-triacetil-quitotriosídeo em pH variando de 4,0 a 6,4. Os resultados estão expressos como média dos indivíduos analisados.

Por outro lado, em indivíduos com DG observou-se um pH ótimo de $4,74 \pm 0,34$ (figura IV.3.), enquanto que em pacientes com DK, GM1 e HG o pH ótimo foi $5,66 \pm 0,54$ (figura IV.4), $5,67 \pm 0,26$ (figura IV.5) e $4,60 \pm 0,56$ (figura IV.6), respectivamente.

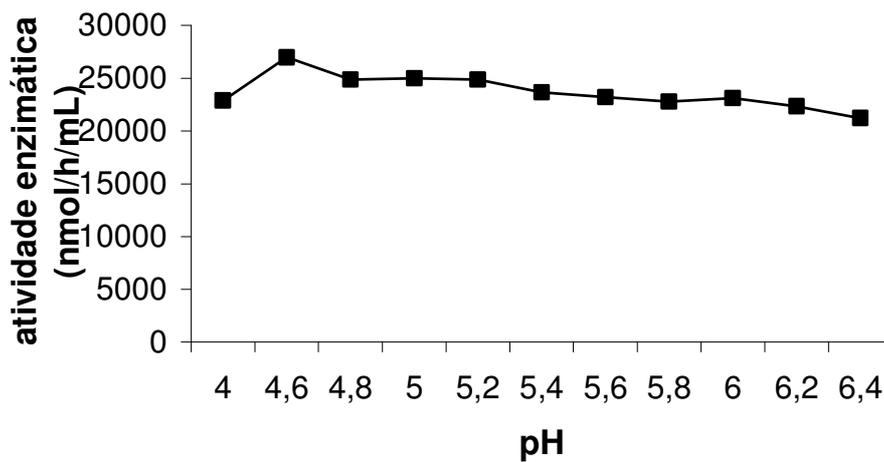


Figura IV.3: Determinação do pH ótimo da enzima quitotriosidase em plasma de indivíduos homocigotos para doença de Gaucher tipo I (DG, n=27). A medida da atividade foi realizada com o substrato artificial 4-metilumbeliferil- β -D-N,N',N''-triacetilquitotriosídeo em pH variando de 4,0 a 6,4. Os resultados estão expressos como média dos indivíduos analisados.

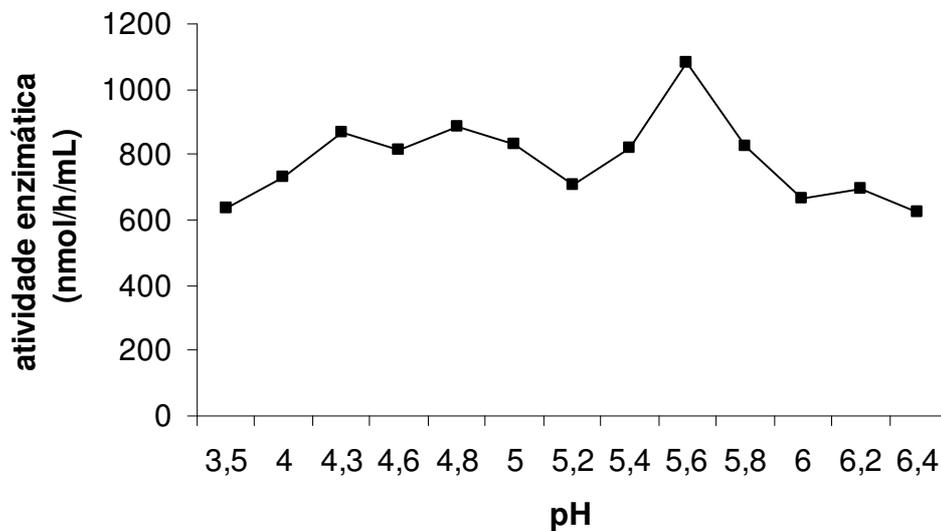


Figura IV.4: Determinação do pH ótimo da enzima quitotriosidase em plasma de indivíduos homocigotos para doença de Krabbe (DK, n=9). A medida da atividade foi realizada com o substrato artificial 4-metilumbeliferil- β -D-N,N',N''-triacetil-quitotriosídeo em pH variando de 4,0 a 6,4. Os resultados estão expressos como média dos indivíduos analisados.

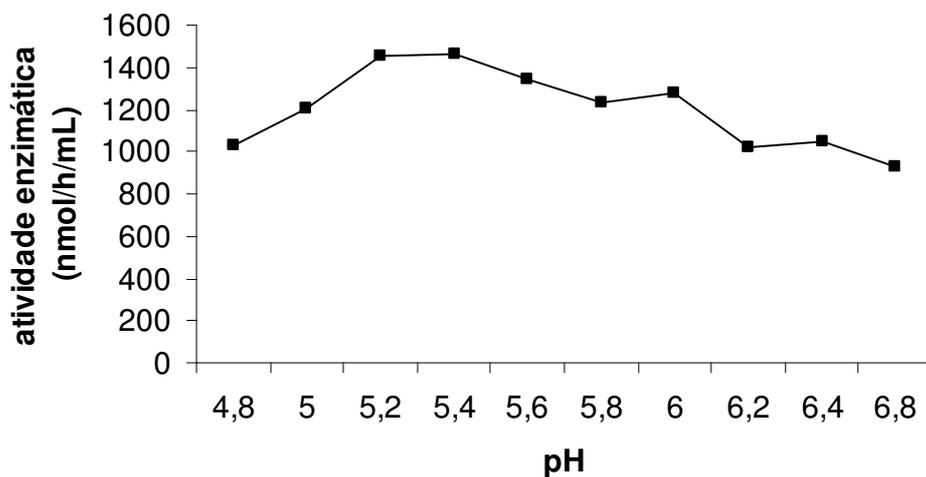


Figura IV.5: Determinação do pH ótimo da enzima quitotriosidase em plasma de pacientes com gangliosidose GM1 (GM1, n=19). A medida da atividade foi realizada com o substrato artificial em pH variando de 4,0 a 6,8. Os resultados estão expressos como média dos indivíduos analisados.

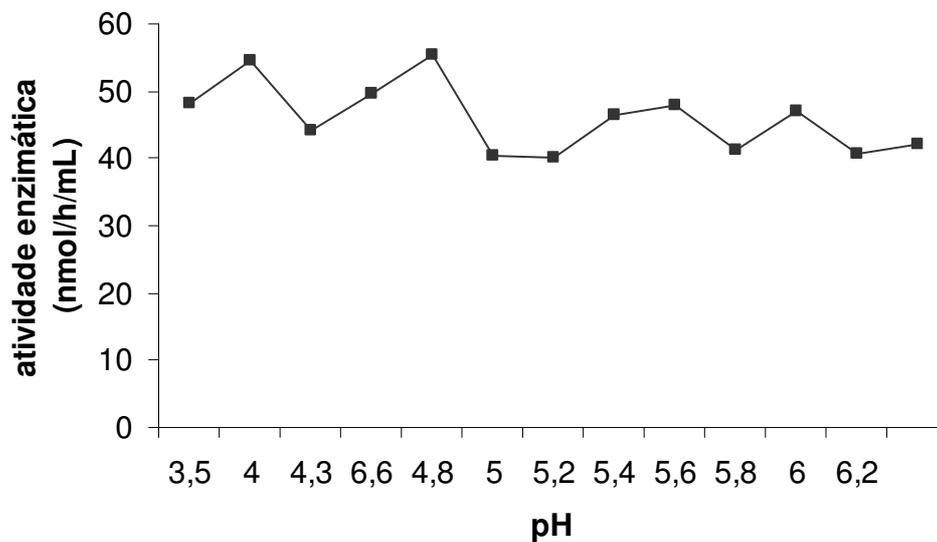


Figura IV.6: Determinação do pH ótimo da enzima quitotriosidase em plasma de indivíduos heterozigotos para doença de Gaucher tipo I (HG, n=19). A medida da atividade foi realizada com o substrato artificial 4-metilumbeliferil-N,N',N''-triacetilquitotriosídeo em pH variando de 4,0 a 6,4. Os resultados estão expressos como média dos indivíduos analisados.

A análise estatística entre as médias dos pH ótimos dos vários grupos estudados demonstrou diferenças significativas entre todos os grupos de pacientes em comparação aos indivíduos normais [$F(4,97)=26,97$ $p < 0.0001$]. Podemos verificar na figura IV.7 que o pH ótimo dos pacientes com DK e GM1 foi superior ao dos controles, enquanto os homozigotos e heterozigotos para DG tiveram um pH ótimo inferior ao dos indivíduos normais.

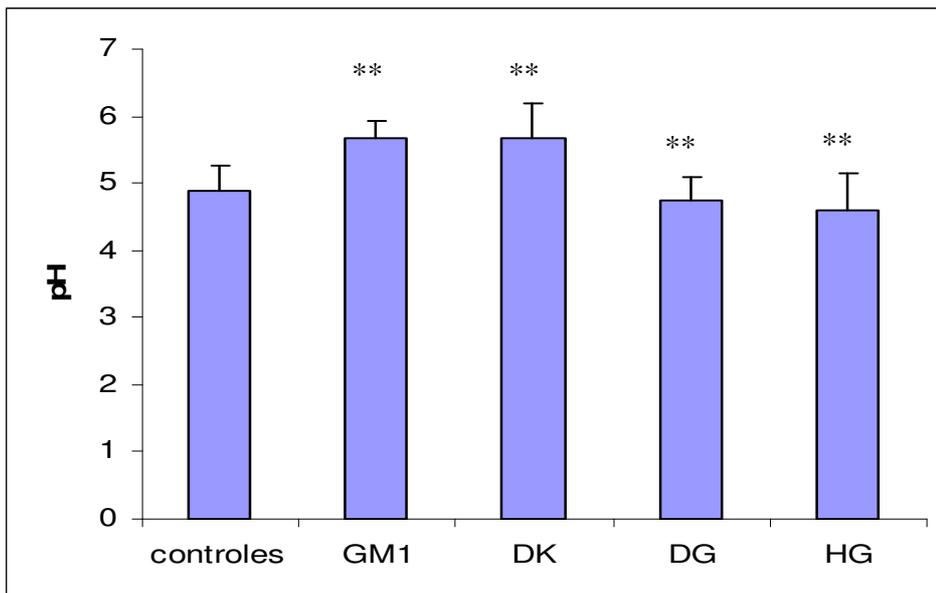


Figura IV.7. Comparação do pH ótimo da enzima quitotriosidase em plasma de indivíduos normais e pacientes com gangliosidose GM1, doença de Krabbe (DK) e de Gaucher tipo I (DG) e heterozigotos para a doença de Gaucher tipo I (HG). ** $p < 0,01$, significativamente diferente dos controles (ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey).

IV.3. Determinação do K_m e V_{max} da enzima quitotriosidase em plasma de indivíduos normais, pacientes com as doenças de Gaucher tipo I (DG), Krabbe (DK), gangliosidose GM1 (GM1) e heterozigotos para a doença de Gaucher tipo I (HG)

Para a determinação da curva de substrato (Michaelis-Menten) em indivíduos normais, bem como em pacientes com DG, DK e GM1 e heterozigotos para a DG utilizaram-se concentrações de substrato que variaram de 0,00125 mM a 0,1 mM. Estes dados estão representados nas figuras IV.8 , IV.9, IV.10, IV.11 e IV.12.

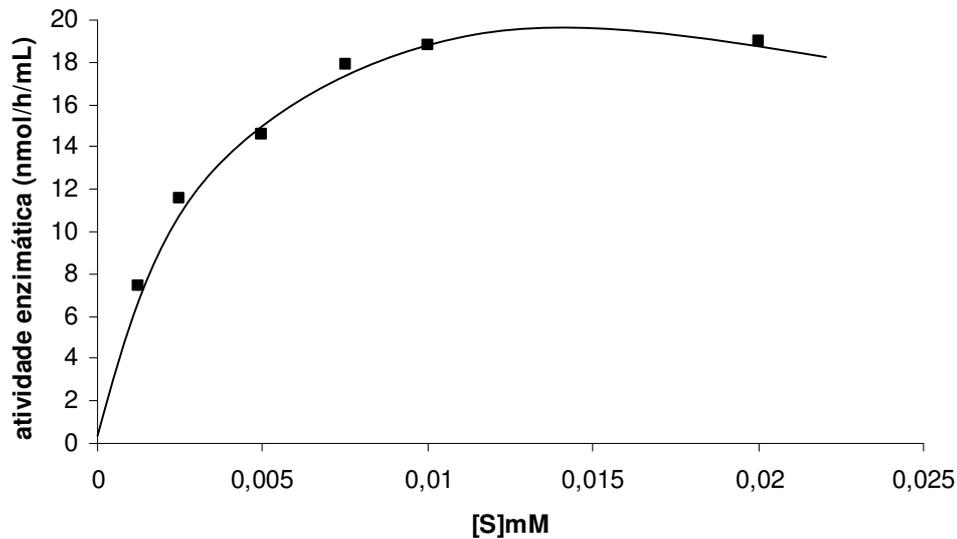


Figura IV.8.: Efeito de diferentes concentrações de substrato (4-metilumbeliferil- β -D-N,N',N''-triacetilquitotriosídeo) sobre a atividade da enzima quitotriosidase de plasma de indivíduos normais. Representação gráfica de Michaelis-Menten. A figura refere-se aos dados de um experimento típico.

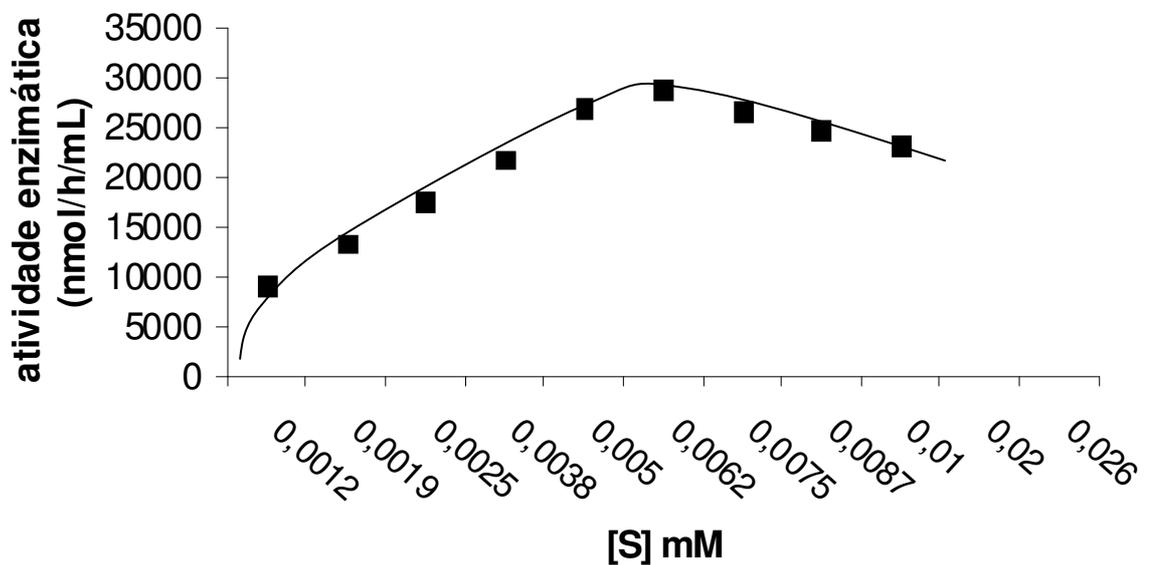


Figura IV.9.: Efeito de diferentes concentrações de substrato (4-metilumbeliferil-N,N',N''-triacetilquitotriosídeo) sobre a atividade da enzima quitotriosidase de plasma de indivíduos homocigotos para a doença de Gaucher tipo I. Representação gráfica de Michaelis-Menten. A figura refere-se aos dados de um experimento típico.

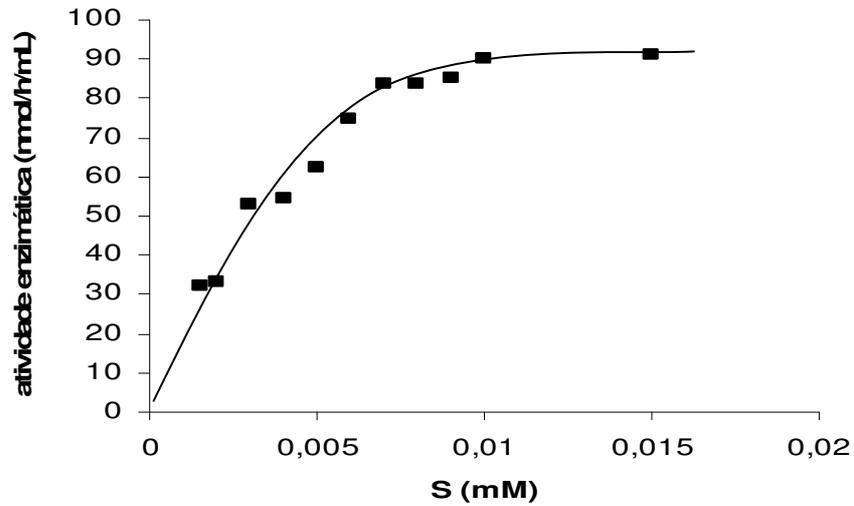


Figura IV.10.: Efeito de diferentes concentrações de substrato (4-metilumbeliferil- β -D-N,N',N''-triacetil-quitotriosídeo) sobre a atividade da enzima quitotriosidase de plasma de pacientes com doença de Krabbe. Representação gráfica de Michaelis-Menten. A figura refere-se aos dados de um experimento típico.

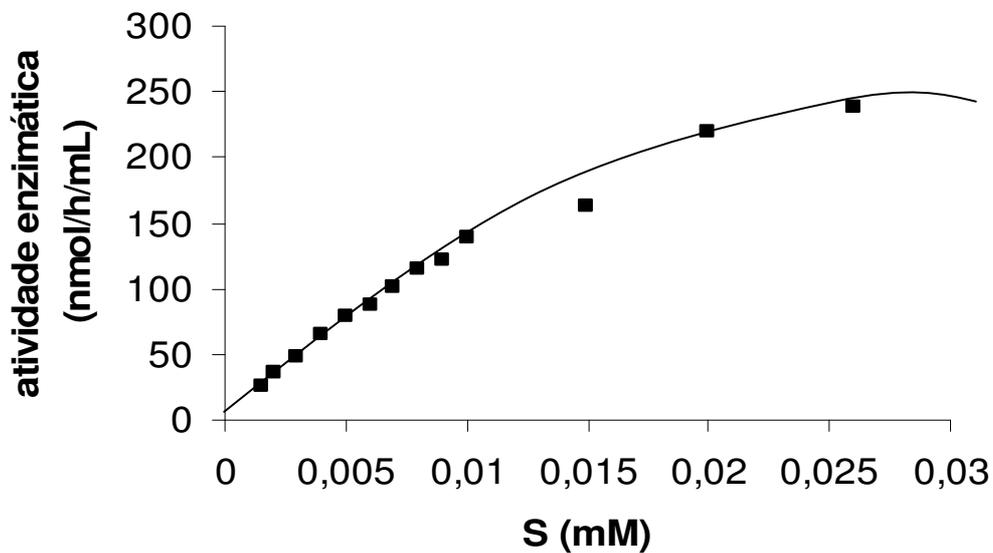


Figura IV.11.: Efeito de diferentes concentrações de substrato (4-metilumbeliferil- β -D-N,N',N''-triacetil-quitotriosídeo) sobre a atividade da enzima quitotriosidase de plasma de pacientes com gangliosidose GM1. Representação gráfica de Michaelis-Menten. A figura refere-se aos dados de um experimento típico.

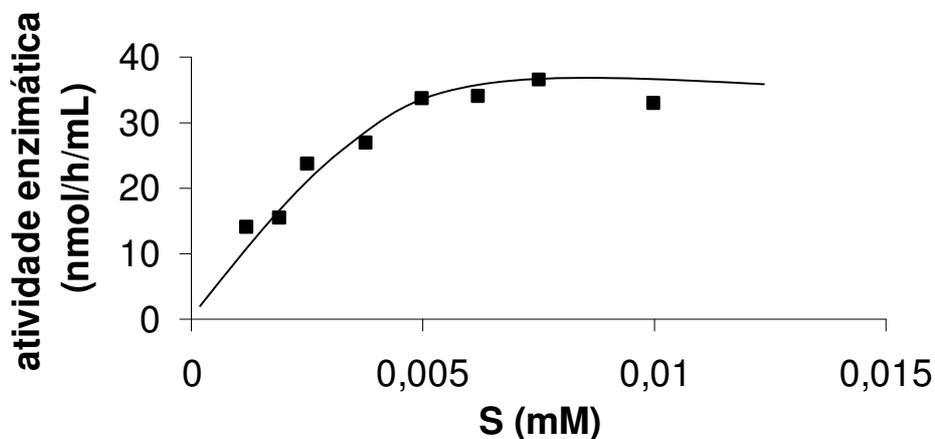


Figura IV.12. Efeito de diferentes concentrações de substrato (4-metilumbeliferil- β -D-N,N',N''-triacetil-quitotriosídeo) sobre a atividade da enzima quitotriosidase de plasma de heterozigotos para doença de Gaucher tipo I. Representação gráfica de Michaelis-Menten. A figura refere-se aos dados de um experimento típico.

A curva de Michaelis-Menten mostra que a linearidade da atividade da quitotriosidase em indivíduos normais estava entre 0,00125 mM e 0,0075 mM (Figura IV.8), ou seja, nesta faixa de concentrações a atividade da enzima variou linearmente de acordo com a concentração de substrato. Em indivíduos com DG a faixa de linearidade estava entre 0,00125 mM e 0,0075 mM (Figura IV.9), em indivíduos com a DK estava entre 0,0020 mM e 0,0055 mM (Figura IV.10), em indivíduos com GM1 entre 0,003 a 0,01 mM (Figura IV.11) e nos indivíduos heterozigotos para a DG (HG) estava entre 0,001 mM e 0,0045 mM (Figura IV.12).

O passo seguinte foi calcular a V_{max} e a constante de Michaelis-Menten (K_m) a partir do gráfico de Lineweaver e Burk. O K_m da quitotriosidase em plasma de indivíduos normais foi $4,7 \pm 1,7 \mu\text{M}$, enquanto que em pacientes com DG o K_m foi de

$19,8 \pm 8,7 \mu\text{M}$, em pacientes com DK foi de $6,5 \pm 1,4 \mu\text{M}$ e em pacientes com GM1 foi de $35 \pm 9,3 \mu\text{M}$. Já nos heterozigotos para DG (HG) esta constante foi de $3,8 \pm 0,98 \mu\text{M}$. Por outro lado, a V_{max} dos controles foi de 81 nmol/h/mL (Figura IV.13), enquanto que em pacientes com DG (Figura IV.14), DK (Figura IV.15) e GM1 (Figura IV.16) e heterozigotos para DG (HG) (Figura IV.17) foi de 54327 nmol/h/mL , 472 nmol/h/mL , 1233 nmol/h/mL e 99 nmol/h/mL , respectivamente.

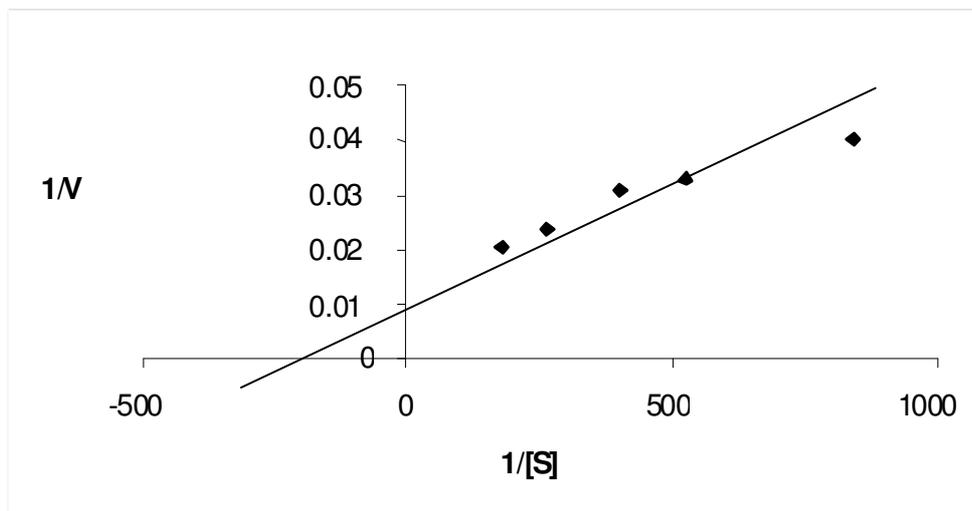


Figura IV.13.: Determinação do K_m e da V_{max} para a enzima quitotriosidase em plasma de indivíduos normais ($n=29$). Representação de Lineweaver-Burk de um experimento representativo.

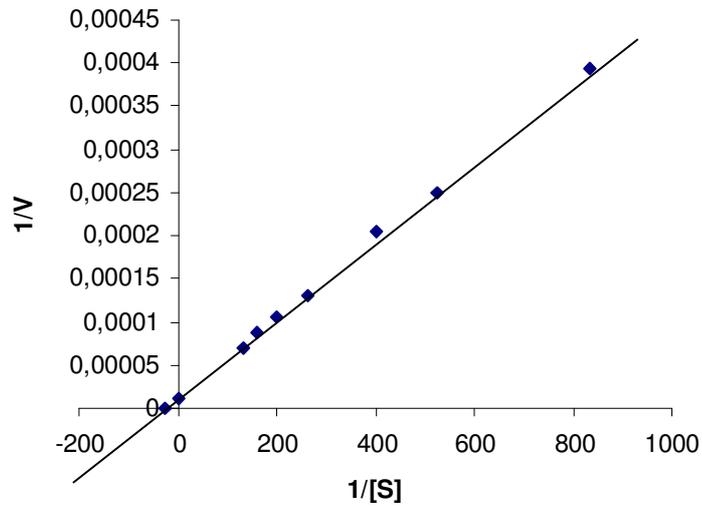


Figura IV.14.: Determinação do K_m e da V_{max} para a enzima quitotriosidase em plasma de indivíduos com doença de Gaucher tipo I ($n=27$). Representação de Lineweaver-Burk de um experimento representativo.

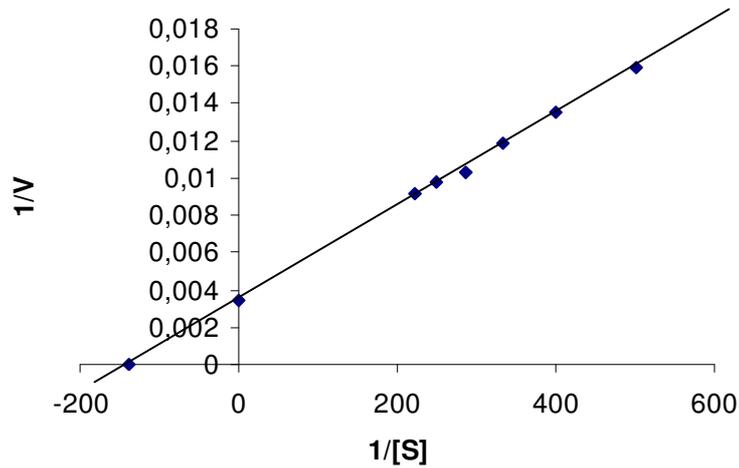


Figura IV.15. Determinação do K_m e da V_{max} para a enzima quitotriosidase em plasma de indivíduos homocigotos para doença de Krabbe ($n=9$). Representação de Lineweaver-Burk de um experimento representativo.

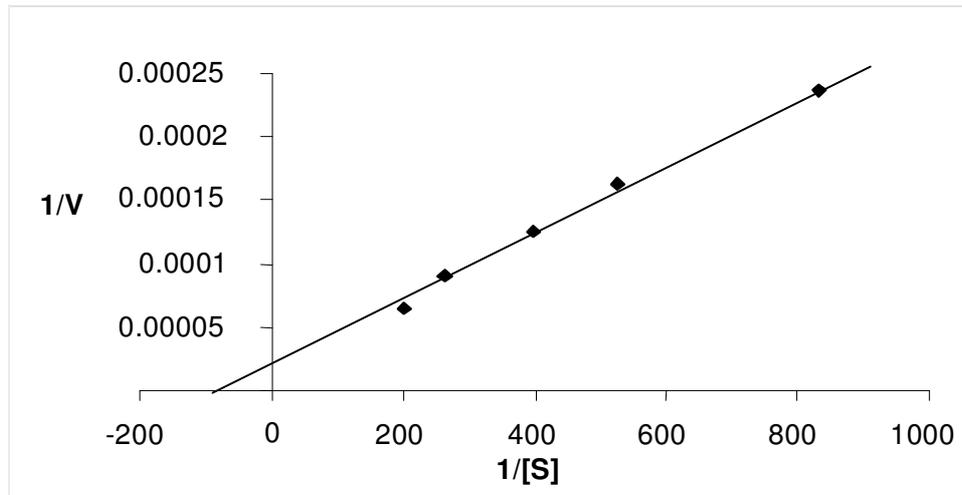


Figura IV.16.: Determinação do K_m e da V_{max} para a enzima quitotriosidase em plasma de indivíduos homocigotos para gangliosidose GM1 (n=19). Representação de Lineweaver-Burk de um experimento representativo.

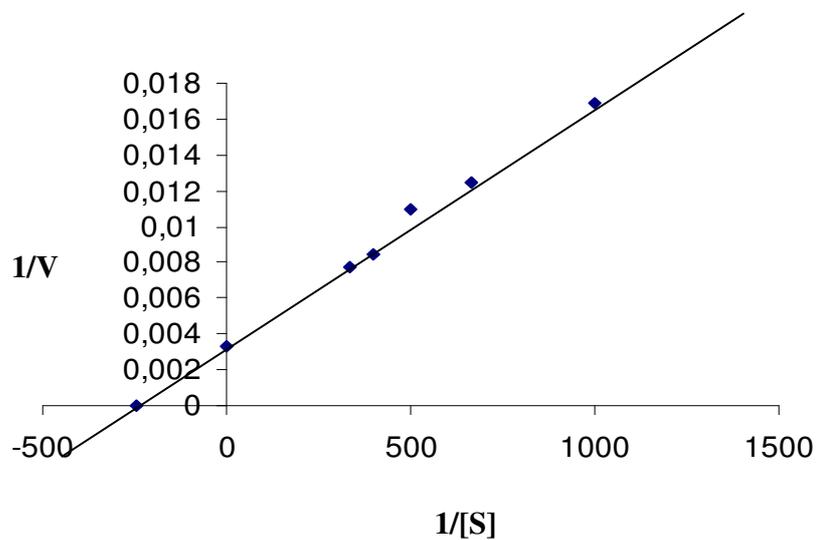


Figura IV.17. Determinação do K_m e da V_{max} para a enzima quitotriosidase em plasma de indivíduos heterocigotos para doença de Gaucher tipo I (n=19). Representação de Lineweaver-Burk de um experimento representativo.

A tabela IV.1 ilustra melhor estes dados. Podemos verificar na tabela que a maior V_{max} ocorreu nos pacientes com DG, seguindo-se dos pacientes com GM1 e DK que foram significativamente maiores do que a V_{max} dos controles e heterozigotos para DG [$F(4,110)=65,96$; $p < 0,0001$]. No parâmetro V_{max} , houve diferença significativa entre os cinco grupos estudados. As curvas de Km e V_{max} , baseada em Lineweaver e Burk podem ser vistas nas figuras IV.13, IV.14., IV.15., IV.16. e IV.17.

Tabela IV.1. Velocidade máxima (V_{max} , nmol/h/mL) da enzima quitotriosidase em plasma de indivíduos normais, pacientes com a doença de Gaucher tipo I (DG), doença de Krabbe (DK), gangliosidose GM1 (GM1) e heterozigotos para doença de Gaucher tipo I (HG).

| | Média | Faixa de variação |
|------------------------------|---------|-------------------|
| Controles (n = 29) | 81,7 | 9,5-87 |
| Pacientes com DG (n=27) | 54327** | 8807-126534 |
| Pacientes com DK (n = 9) | 472** | 116-965 |
| Pacientes com GM1(n = 19) | 1233** | 248-2067 |
| Heterozigotos para DG (n=19) | 99 | 21-299 |

Os resultados estão expressos como média e faixa de variação. ** $p < 0,001$, significativamente diferente de todos os outros grupos (ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey).

A figura IV.18. mostra a constante de Michaelis (Km) nos vários grupos estudados. Pode-se observar na figura que o Km dos pacientes com GM1 foi muito superior ao dos outros grupos, seguindo-se o Km dos pacientes com DG. Já o Km dos pacientes com

DK foi pouco superior ao dos controles e o Km dos heterozigotos para DG foi moderadamente menor do que o dos controles [F(4,110)=87,37; p < 0,0001].

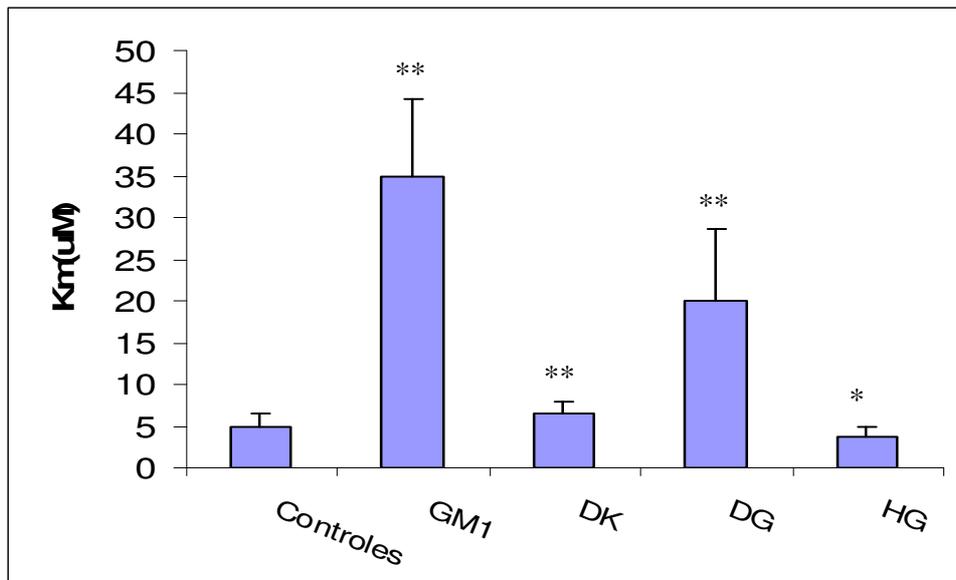


Figura IV.18. Constante de Michaelis (Km) da enzima quitotriosidase em plasma de indivíduos normais (controles, n=29), pacientes com gangliosidose GM1 (GM1, n=19), doença de Krabbe (DK, n=9), doença de Gaucher tipo I (DG, n=27) e heterozigotos para doença de Gaucher tipo I (HG, n=19). A média e o desvio padrão estão representados nas barras. * p < 0,05, ** p < 0,01 significativamente diferente dos controles (ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey).

IV.4. Estudos de estabilidade térmica para a enzima quitotriosidase em plasma de indivíduos normais, pacientes com as doenças de Gaucher tipo I (DG), doença de Krabbe (DK), gangliosidose GM1 (GM1) e heterozigotos para a doença de Gaucher tipo I (HG)

Para os estudos de termoestabilidade, amostras de plasma foram pré-incubadas a 60 °C por 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 ou 25 minutos. Após a pré-incubação, foi adicionado o substrato à reação, onde se procedeu a incubação normal a 37 °C por 15 minutos para a medida da atividade da QT.

A figura IV.19. mostra a termoestabilidade da QT em plasma de controles, afetados pela DG e heterozigotos para a DG (HG). A figura mostra que a atividade residual da QT em plasma do grupo controle foi de $95,4 \pm 7,7\%$ após 1 minuto de pré-incubação, comparada com amostras não submetidas a este tratamento térmico (100% de atividade) e $91,24 \pm 6,42\%$ após 2 minutos de pré-incubação. Após 3, 4, 5, 10, 15 e 25 minutos de pré-incubação a 60 °C, as atividades residuais da QT foram de $86,5 \pm 20\%$, $80,1 \pm 18,8\%$, $77,9 \pm 15,7\%$, $58,1 \pm 12,6\%$, $45,9 \pm 9,4\%$ e $42,3 \pm 9,8\%$, respectivamente. Pode-se observar também na mesma figura, que a atividade residual da QT em plasma de indivíduos com DG foi de $87,1 \pm 17,8\%$ e $68,6 \pm 18,8\%$ após 1 e 2 minutos de pré-incubação, respectivamente. Após 3, 4, 5, 10, 15 e 25 minutos as atividades residuais foram de $52,3 \pm 20,4\%$; $44,4 \pm 18,6\%$; $38,2 \pm 17,7\%$; $21,6 \pm 12,2\%$; $15,0 \pm 9,7\%$ e $12 \pm 9,9\%$, respectivamente. Nesta figura verifica-se que as atividades residuais da QT em plasma de indivíduos HG foram de $90,8 \pm 8,2\%$; $81,8 \pm 11,1\%$; $78,3 \pm 12,9\%$; $66,8 \pm 12,9\%$ e $62,4 \pm 17,3\%$ após 1, 2, 3, 4 e 5 minutos de pré-incubação,

respectivamente. Após 10, 15 e 25 minutos de pré-incubação as atividades residuais da QT foram de $36,9 \pm 15,5\%$; $26 \pm 12,9\%$ e $19,2 \pm 11,1\%$, respectivamente.

Por outro lado, a comparação entre o grupo DG e o grupo controle mostrou que a partir de dois minutos de pré-incubação ocorreu uma diferença significativa entre estes grupos (tempo 2: $F(2,70)=20,40$; $p < 0,05$; tempo 3: $F(2,68)=39,04$; $p < 0,001$; tempo 4: $F(2,70)=36,73$; $p < 0,001$; tempo 5: $F(2,70)=50,25$; $p < 0,001$; tempo 10: $F(2,72)=57,95$; $p < 0,001$; tempo 15: $F(2,71)=57,39$; $p < 0,001$ e tempo 25: $F(2,68)=34,2$ $p < 0,001$). Similarmente, ocorreu uma diferença significativa entre o grupo HG e o grupo controle nos tempos 2, 3, 4, 5, 10, 15 e 25 minutos (tempo 2: $F(2,70)=20,40$; $p < 0,001$; tempo 3: $F(2,68)=39,04$; $p < 0,01$; tempo 4: $F(2,70)=36,73$; $p < 0,01$; tempo 5: $F(2,70)=50,25$; $p < 0,01$; tempo 10: $F(2,72)=57,95$; $p < 0,01$; tempo 15: $F(2,71)=57,39$; $p < 0,01$; tempo 25: $F(2,68)=34,19$; $p < 0,01$).

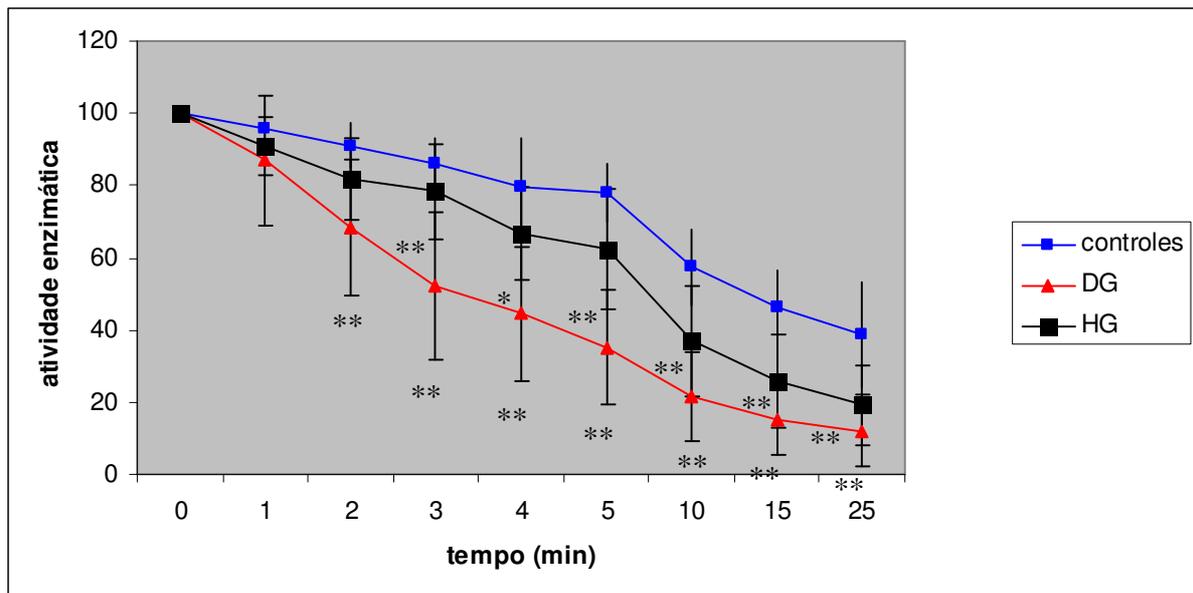


Figura IV.19.: Perfil de inativação da atividade da enzima quitotriosidase de plasma de indivíduos normais (n=29), homozigotos para DG (n=27) e heterozigotos para DG (n=19) pelo calor (60 °C) através de pré-incubação por 1 a 25 minutos. A atividade da quitotriosidase para cada tempo foi expressa em relação à porcentagem da atividade inicial. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão dos grupos de indivíduos analisados. * $p < 0,05$ e $p < 0,01$, significativamente diferente dos indivíduos normais (ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey).

Na figura IV.20 verificamos que as atividades residuais da QT em plasma de indivíduos com DK foram de $89,9 \pm 10,9\%$; $75,5 \pm 17,2\%$; $69 \pm 17,1\%$; $61,3 \pm 17,3\%$; $57,2 \pm 15,1\%$; $34,1 \pm 12\%$; $23,6 \pm 13,5\%$ e $18,7 \pm 12\%$ após 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 e 25 minutos de pré-incubação. Verificamos também que a partir de 2 minutos de pré-incubação houve uma diferença significativa entre este grupo de pacientes e o grupo controle (tempo 2: $t(37)=4,289$, $p < 0,001$; tempo 3: $t(37)=4,51$, $p < 0,001$; tempo 4: $t(37)=3,50$, $p < 0,01$; tempo 5: $t(37)=5,49$, $p < 0,001$; tempo 10: $t(36)=5,46$, $p < 0,001$; tempo 15: $t(36)=4,40$, $p < 0,001$ e tempo 25: $t(31)=4,92$, $p < 0,001$)

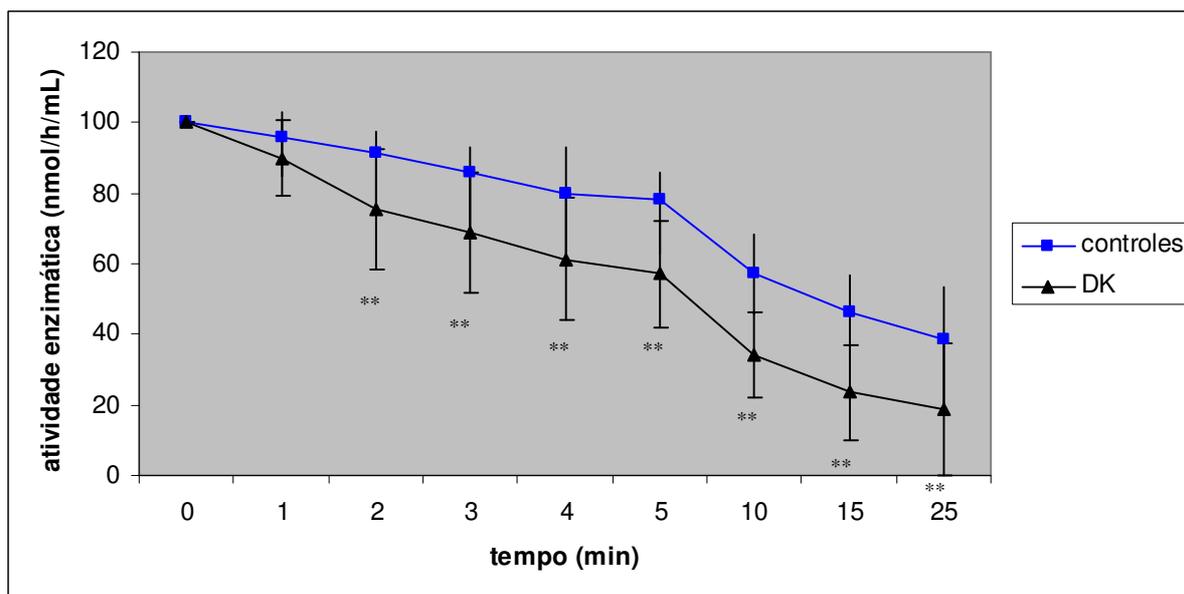


Figura IV.20. Perfil de inativação da atividade da enzima quitotriosidase de plasma de indivíduos normais (n=29) e homocigotos para DK (n=9) pelo calor (60 °C) através de pré-incubação por 1 a 25 minutos. A atividade da quitotriosidase para cada tempo foi expressa em relação à porcentagem da atividade inicial. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão dos grupos de indivíduos analisados. ** p < 0,01, significativamente diferente dos indivíduos normais (Teste t de Student para amostras independentes).

Na figura IV.21. verificamos que as atividades residuais da QT em plasma de indivíduos com GM1 foram de $89,9 \pm 10,9\%$; $75,5 \pm 17,2\%$; $69 \pm 17,2\%$; $61,3 \pm 17,3\%$; $57,2 \pm 15,1\%$; $34,1 \pm 12\%$; $23,6 \pm 13,5\%$ e $18,7 \pm 12\%$ após 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 e 25 minutos de pré-incubação, respectivamente. Também verificamos que a partir de 2 minutos de pré-incubação houve uma diferença significativa entre este grupo de pacientes e o grupo controle (tempo : t(37)=4,29 , p < 0,001; tempo 3: t(37)=4,51 , p < 0,001; tempo 4: t(37)=3,50 , p < 0,01; tempo 5: t(37)=5,49, p<0,001; tempo 10: t(36)=5,46, p < 0,001; tempo 15: t(36)=4,40, p < 0,001 e tempo 25: t(31)=4,92, p < 0,001) .

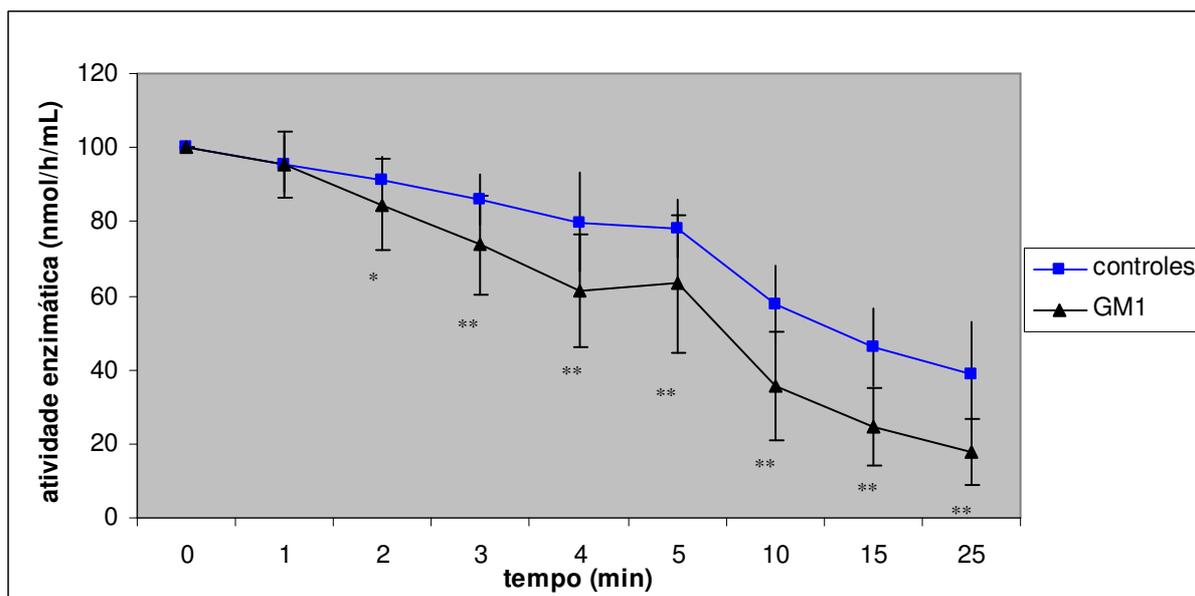


Figura IV.21. Perfil de inativação da atividade da enzima quitotriosidase de plasma de indivíduos normais (n=29) e homocigotos para GM1 (n=19) pelo calor (60 °C) através de pré-incubação por 1 a 25 minutos. A atividade da quitotriosidase para cada tempo foi expressa em relação à porcentagem da atividade inicial. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão dos grupos de indivíduos analisados. * p < 0,05 e ** p < 0,01, diferente dos indivíduos normais (Teste t de Student para amostras independentes).

IV.5. Estudos das propriedades cinéticas da enzima quitotriosidase em plasma de indivíduos com doença de Gaucher tipo I em tratamento e sem tratamento

Para esse estudo, utilizamos amostras de quatro pacientes com a doença de Gaucher tipo I. Investigamos se as propriedades bioquímicas da quitotriosidase (K_m , V_{max} , pH ótimo e termoestabilidade) em plasma de pacientes com doença de Gaucher tipo I variavam quando em tratamento com a terapia de reposição enzimática (TRE) de imiglucerase. Neste particular, as amostras de sangue foram coletadas de pacientes quando diagnosticados e após três meses de tratamento com TRE. Verificamos que nos pacientes em tratamento o K_m aumentou significativamente ($t(6)=2,94$; $p < 0,05$),

enquanto as outras propriedades cinéticas da enzima não variaram significativamente (V_{max} : $t(6)=0,63$; $p > 0,05$; pH ótimo: $t(4)=0,32$ $p > 0,05$; termoestabilidade 10 minutos: $t(4)=0,606$ $p > 0,05$; termoestabilidade 15 minutos: $t(4)=0,67$ $p > 0,05$; termoestabilidade 25 minutos: $t(4)=0,13$ $p > 0,05$) (Tabela IV.2).

Tabela IV.2. Propriedades bioquímicas da enzima quitotriosidase em plasma de pacientes com a doença de Gaucher tipo I (DG) sem e com tratamento por terapia de reposição enzimática (TRE)

| Propriedades | DG sem TRE | DG com TRE | Probabilidade |
|---|-------------------|------------------|---------------|
| | Média (FV) | Média (FV) | |
| Km (μ M) | 23,7 (21-28) | 37,5 (27- 45) | * |
| V_{max} (nmol/h/mL) | 4976 (1802-13495) | 3156 (2173-4024) | NS |
| pH ótimo | 5,1 (4,8-5,6) | 5,2 (4,8-5,5) | NS |
| Termoestabilidade a 60 °C (% do tempo zero) | | | |
| 10 minutos | 70,7 (56,2-76) | 58,6 (21,5-76,4) | NS |
| 15 minutos | 70,4 (42,3-85) | 52,3 (11,5-91,8) | NS |
| 25 minutos | 52,5 (33,5-68) | 49,3 (6,8-82,1) | NS |

Os resultados estão expressos como média e faixa de variação (FV). * $p < 0,05$ significativamente diferente do grupo sem tratamento por TRE (teste t de Student para amostras dependentes)

Os próximos passos de nossa investigação visaram o estudo em outros grupos de pacientes: com as doenças de Gaucher tipo I (DG), Krabbe (DK), gangliosidose GM1 (GM1) e heterozigotos para a doença de Gaucher tipo I (HG) e em indivíduos normais. Procurou-se inicialmente comparar as propriedades bioquímicas da QT entre os vários grupos e após associar as mesmas e algumas manifestações clínicas prevalentes desses pacientes com os fatores pró-inflamatórios interleucina 6 e fator de necrose tumoral alfa.

IV.6. Comparação entre as propriedades bioquímicas da enzima quitotriosidase (QT) em plasma de indivíduos normais, pacientes com as doenças de Gaucher tipo I (DG), Krabbe (DK), gangliosidose GM1 (GM1) e heterozigotos para a doença de Gaucher tipo I (HG)

A seguir, analisamos cada uma das propriedades bioquímicas apresentadas anteriormente comparando os diversos grupos de indivíduos entre si.

As tabelas IV.3., IV.4., IV.5. e IV.6. mostram, respectivamente, os parâmetros pH ótimo, Km, Vmax e termoestabilidade após 15 min a 60 °C da QT nos vários grupos estudados. Como a termoestabilidade da QT nos tempos 2 a 25 min variou de maneira semelhante, escolhemos apenas um tempo de incubação a 60 °C (15 minutos) para esta comparação.

Verificamos que o pH ótimo da enzima foi significativamente maior nos pacientes com DK e GM1 e menor nos com DG e HG em relação aos controles (tabela IV.3). Verificamos ainda que não houve diferença entre o pH ótimo da enzima entre os pacientes com DG e HG, bem como entre os grupos DK e GM1.

Tabela IV. 3. Comparação entre o pH ótimo da enzima quitotriosidase (QT) em plasma de indivíduos normais e pacientes com as doenças de Gaucher tipo I (DG), Krabbe (DK) e gangliosidose GM1 (GM1) e heterozigotos para a doença de Gaucher tipo I (HG)

| Grupo | N | Média | EPM | Probabilidade |
|-----------|----|-------|-------|---------------|
| Controles | 22 | 5,19 | 0,055 | |
| DG | 21 | 4,72 | 0,067 | ** |
| HG | 11 | 4,57 | 0,168 | *** |
| DK | 13 | 5,65 | 0,136 | ** |
| GM1 | 31 | 5,57 | 0,063 | ** |

Os resultados estão expressos como média e erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada através de ANOVA de uma via seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett [$F(4,106)=26,87$, $p < 0,0001$]. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, diferente dos controles (teste de Tukey).

Encontramos também no parâmetro Km diferenças significativas entre os controles e todos os outros grupos, com os pacientes com GM1 e DG apresentando os maiores valores de Km. Por outro lado, o Km do grupo HG foi inferior ao dos controles e estes inferiores ao dos pacientes com DK (tabela IV.4). Como visto na tabela, este parâmetro foi progressivamente maior nos HG, controles, DK, DG e GM1. Esses resultados sugerem que o Km possa ser utilizado na diferenciação das DG e GM1 com a DK, e com maior importância na diferenciação entre homozigotos para a DG em relação aos HG.

Tabela IV. 4. Comparação entre o Km (μM) da enzima quitotriosidase (QT) em plasma de indivíduos normais e pacientes com as doenças de Gaucher tipo I (DG), Krabbe (DK) e gangliosidose GM1 (GM1) e heterozigotos para a doença de Gaucher tipo I (HG)

| Grupo | N | Média | EPM | Probabilidade |
|-----------|----|-------|------|---------------|
| Controles | 22 | 4,83 | 0,30 | |
| DG | 21 | 16,6 | 1,30 | *** |
| HG | 14 | 3,57 | 0,23 | * |
| DK | 12 | 6,67 | 0,35 | ** |
| GM1 | 28 | 33,9 | 1,98 | *** |

Os resultados estão expressos como média e erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada através de ANOVA de uma via seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett [$F(4,105)=84,378$, $p < 0,0001$]. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, diferente dos controles.

No que se refere à V_{max} , verificamos que esse parâmetro foi semelhante entre os controles e os HG, mas progressivamente maior nos pacientes com DK, GM1 e DG. (tabela IV.5). Os pacientes com DG apresentaram a maior V_{max} , sendo esta significativamente maior do que a V_{max} de todos os outros grupos estudados.

Tabela IV. 5. Comparação entre a V_{max} (nmol/h/mL) da enzima quitotriosidase (QT) em plasma de indivíduos normais e pacientes com as doenças de Gaucher tipo I (DG), Krabbe (DK) e gangliosidose GM1 (GM1) e heterozigotos para a doença de Gaucher tipo I (HG)

| Grupo | N | Média | EPM | Probabilidade |
|-----------|----|-------|------|---------------|
| Controles | 22 | 74,5 | 10,2 | |
| DG | 21 | 46147 | 5792 | *** |
| HG | 14 | 97,8 | 20,8 | NS |
| DK | 13 | 443 | 86,4 | * |
| GM1 | 29 | 1456 | 153 | *** |

Os resultados estão expressos como média e erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada através de ANOVA de uma via seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett [$F(4,107)=63,523$, $p < 0,0001$]. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, NS=não significativo, comparado aos controles.

Ainda relativamente às propriedades bioquímicas da QT, verificamos que houve diferenças significativas entre a termoestabilidade da enzima dos controles e todos os outros grupos estudados (DG, GM1, DK e HG). Estes últimos apresentaram uma enzima mais termolábil, sendo a menos estável a dos pacientes com DG (Tabela IV.6). No entanto, a termoestabilidade da enzima não foi estatisticamente diferente entre os grupos DG, HG, DK e HG. Estes resultados sugerem uma outra maneira de diferenciar indivíduos normais de heterozigotos para a DG.

Tabela IV. 6. Comparação da termoestabilidade da enzima quitotriosidase (QT) (15 min a 60 °C) em plasma de indivíduos normais, com as doenças de Gaucher tipo I (DG), Krabbe (DK) e gangliosidose GM1 (GM1) e heterozigotos para a doença de Gaucher tipo I (HG)

| Grupo | N | Média | EPM | Probabilidade |
|-----------|----|-------|------|---------------|
| Controles | 29 | 46,1 | 1,96 | |
| DG | 21 | 15,7 | 2,22 | *** |
| HG | 14 | 18,8 | 2,44 | *** |
| DK | 11 | 20,7 | 3,91 | *** |
| GM1 | 29 | 25,3 | 2,20 | *** |

Os resultados estão expressos em percentagem da atividade da enzima relativamente ao tempo zero (100%). A análise estatística foi realizada através de ANOVA de uma via seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey [F(4,104)=33,788, $p < 0,001$]. *** $p < 0,001$, diferente dos controles.

IV.7. Determinação da atividade da quitotriosidase e das concentrações dos fatores pró-inflamatórios interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) em plasma de indivíduos normais, pacientes com as doenças de Gaucher tipo I (DG), Krabbe (DK) e gangliosidose GM1 (GM1) e heterozigotos para a DG (HG)

As tabelas IV.7, IV.8 e IV.9 mostram respectivamente a atividade da quitotriosidase (QT) e as concentrações plasmáticas de IL-6 e TNF- α em indivíduos

normais, afetados pelas doenças de Gaucher tipo I (DG), Krabbe (DK) e gangliosidose GM1 (GM1) e heterozigotos para a DG (HG). Como estas variáveis não apresentaram distribuição normal, utilizamos testes não paramétricos para os cálculos estatísticos.

Podemos observar na tabela IV.8 que houve uma diferença significativa entre a atividade da enzima nos vários grupos. Observa-se também que a atividade da QT nos controles foi significativamente menor do que a de todos os grupos de pacientes, porém semelhante a do grupo HG, confirmando resultados já observados na literatura (Wajner et al., 2007, Guo et al., 1995). Verificamos ainda que a maior atividade da QT encontra-se nos pacientes com DG, decrescendo naqueles com GM1 e DK.

Tabela IV.7. Atividade da quitotriosidase (nmol/h/mL) em plasma de indivíduos normais, heterozigotos para a doença de Gaucher tipo I (HG) e pacientes com as doenças de Gaucher tipo I (DG), Krabbe (DK) e gangliosidose GM1 (GM1)

| Grupos | N | Mediana | Percentil 25 | Percentil 75 | Probabilidade |
|-----------|----|---------|--------------|--------------|---------------|
| Controles | 22 | 37,5 | 22,5 | 56,5 | # |
| DG | 31 | 19098 | 8013 | 27628 | *** |
| HG | 14 | 62,6 | 23,3 | 85,5 | NS # |
| DK | 13 | 216 | 103 | 819 | * # |
| GM1 | 31 | 700 | 303 | 887 | *** # |

Os resultados estão expressos como mediana. A diferença entre os grupos foi calculada pelo teste de Kruskal-Wallis [$\chi^2(4) = 27,90$ p <0,0001]. NS=não significante, *

p < 0,05, ***p < 0,001, diferente dos controles; # p < 0,001, diferente de DG (teste de Student-Newman-Keuls)

No que se refere à concentração plasmática da IL-6, verificamos que essa variável era diferente entre os grupos, sendo maior nos pacientes com DK, seguindo-se nos com GM1, DG, HG e controles (Tabela IV.8). Pode se observar na tabela que a concentração plasmática de IL-6 dos controles foi significativamente menor do que a dos DK, GM1 e DG, mas não diferiu significativamente dos HG. Verificamos ainda que não houve diferença entre essa variável nos DG e HG, e esta última era aproximadamente três vezes maior, embora não significativamente diferente do que a dos controles.

Tabela IV.8. Concentrações plasmáticas da interleucina 6 (IL-6) (pg/mL) no plasma de indivíduos normais, heterozigotos para a doença de Gaucher tipo I (HG) e afetados com as doenças de Gaucher tipo I (DG), Krabbe (DK) e gangliosidose GM1 (GM1)

| Grupos | N | Mediana | Percentil 25 | Percentil 75 | Probabilidade |
|-----------|----|---------|--------------|--------------|---------------|
| Controles | 18 | 1,87 | 1,42 | 2,24 | |
| DG | 7 | 7,05 | 1,21 | 54,7 | * |
| HG | 12 | 5,77 | 2,66 | 14,7 | NS |
| DK | 13 | 28,8 | 3,04 | 59,8 | ** |
| GM1 | 18 | 8,54 | 5,18 | 27,7 | * |

Os resultados estão expressos como mediana. A diferença entre os grupos foi calculada pelo teste de Kruskal-Wallis [χ^2 (4)= 21,618, p < 0,0001]. NS = não significativa, * p < 0,05, ** p < 0,01, diferente dos controles (teste de Student-Newman-Keuls).

No que se refere às concentrações plasmáticas de TNF- α , observamos uma diferença significativa entre todos os grupos (controles e pacientes com DG, GM1, DK e HG) (Tabela IV.9). Observa-se na tabela que todos os grupos apresentaram concentrações superiores a dos controles. Além disso, não houve diferença significativa entre os grupos GM1, DG, DK e HG.

Tabela IV.9. Concentrações plasmáticas do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (pg/mL) no plasma de indivíduos normais, heterozigotos para a doença de Gaucher tipo I (HG) e pacientes com as doenças de Gaucher tipo I (DG), Krabbe (DK) e gangliosidose GM1 (GM1)

| Grupos | N | Mediana | Percentil 25 | Percentil 75 | Probabilidade |
|-----------|----|---------|--------------|--------------|---------------|
| Controles | 22 | 1,24 | 0,45 | 1,92 | |
| DG | 12 | 6,25 | 2,38 | 12,2 | * |
| HG | 6 | 3,25 | 2,06 | 3,82 | * |
| DK | 13 | 3,38 | 2,27 | 4,33 | * |
| GM1 | 18 | 4,13 | 2,89 | 5,80 | * |

Os resultados estão expressos como mediana. A diferença entre os grupos foi calculada pelo teste de Kruskal-Wallis (χ^2 (4)= 27,954, $p < 0,0001$). * $p < 0,05$, diferente dos controles (teste de Student-Newman-Keuls).

IV.8. Estudo das associações entre a idade, a atividade e propriedades cinéticas da enzima quitotriosidase (QT) com os fatores pró-inflamatórios IL-6 e TNF- α em plasma, bem como com as atividades das enzimas β -glicosidase, galactocerebrosidase e β -galactosidase em leucócitos de indivíduos com as doenças de Gaucher tipo I (DG), Krabbe (DK) e gangliosidose GM1 (GM1) e heterozigotos para a doença de Gaucher tipo I (HG).

Inicialmente verificamos que a idade dos indivíduos testados variou entre os vários grupos estudados, sendo semelhantes entre controles, DG e HG e entre os pacientes com a DK e GM1. Estes últimos, por sua vez, diferiram dos primeiros (Tabela IV.10).

Tabela IV.10. Comparação entre a idade (meses) dos indivíduos analisados (controles e pacientes com as doenças de Gaucher tipo I (DG), Krabbe (DK), gangliosidose GM1 (GM1) e heterozigotos para doença de Gaucher tipo I (HG)

| Grupo | N | Média | EPM | Probabilidade |
|-----------|----|-------|------|---------------|
| Controles | 12 | 263 | 25,3 | |
| DG | 26 | 177 | 24,4 | NS |
| HG | 7 | 187 | 28,3 | NS |
| DK | 10 | 26 | 11,9 | *** ## |
| GM1 | 28 | 25 | 8,98 | *** ## |

A análise estatística foi realizada através de ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey [F(4,78)=23,693 p < 0,0001]. *** p < 0,001 diferente dos controles, ## p < 0,01 diferente dos controles, HG e DG.

Procuramos então associar a idade dos pacientes com as variáveis acima mencionadas dentro de cada grupo estudado (controles, HG e pacientes com DG, DK e GM1) para verificar se a idade dos indivíduos poderia interferir com essas variáveis. Nenhuma associação foi verificada entre a idade, fatores pró-inflamatórios IL-6 e TNF- α , atividade e as propriedades cinéticas da quitotriosidase, indicando então que a atividade e as propriedades cinéticas da enzima e os fatores pró-inflamatórios não estão relacionados à idade dos indivíduos testados. É possível então presumir que no intervalo de idades de nossa amostra (aproximadamente de 2 até 24 anos) não haja variação dos parâmetros inflamatórios, bem como da atividade e das propriedades bioquímicas da quitotriosidase.

Considerando então que a idade dos pacientes não interferiu nos parâmetros analisados, o próximo passo de nossa investigação foi o de procurar associações entre a atividade, as propriedades cinéticas da enzima quitotriosidase (QT) e os fatores pró-inflamatórios IL-6 e TNF- α em plasma de indivíduos com a DG, DK, GM1 e HG. Como algumas variáveis não possuíam distribuição normal, utilizamos a correlação de Spearman para esses cálculos. Determinamos, portanto, os coeficientes de correlação entre os vários parâmetros no plasma dos indivíduos dentro de cada grupo (controles, DG, DK, GM1 e HG).

Verificamos que os parâmetros pró-inflamatórios IL-6 e TNF- α não estavam correlacionados com a atividade e as propriedades bioquímicas da QT, indicando que o processo inflamatório sistêmico detectado no plasma dos pacientes com DG, DK, GM1 e HG por níveis elevados de IL-6 e TNF- α não influencia esses parâmetros. Também não encontramos correlação entre os níveis plasmáticos de IL-6 e TNF- α com as atividades das enzimas β -glicosidase, galactocerebrosidase e β -galactosidase em

leucócitos de indivíduos com DG, DK e GM1, respectivamente. No entanto, a atividade plasmática da QT se correlacionou positivamente com a V_{max} em todos os grupos estudados (controles: $r_s=0,863$, $p < 0,0001$; DG: $r_s =0,774$, $p < 0,0001$; DK: $r_s =0,637$, $p < 0,05$; GM1: $r_s =0,895$, $p < 0,0001$; HG: $r_s =0,965$, $p < 0,0001$). Correlações positivas foram também encontradas entre a termoestabilidade nos vários tempos estudados. Convém salientar que calculamos a termoestabilidade apenas nos tempos 10, 15 e 25 min. O parâmetro termoestabilidade 10 min da QT se correlacionou positivamente com a termoestabilidade 15 min nos grupos DG ($r_s=0,668$, $p < 0,01$), DK ($r_s=0,973$, $p < 0,0001$), GM1 ($r_s=0,867$, $p < 0,0001$) e HG ($r_s=0,859$, $p < 0,0001$). A termoestabilidade 10 min da QT se correlacionou positivamente com a termoestabilidade 25 min nos grupos DG ($r_s=0,584$, $p < 0,01$), DK ($r_s=0,913$, $p < 0,0001$) e GM1 ($r_s=0,901$, $p < 0,0001$). Por fim, a termoestabilidade 15 min da QT se correlacionou positivamente com a termoestabilidade 25 min nos grupos controle ($r_s=0,768$, $p < 0,0001$), DG ($r_s=0,479$, $p < 0,05$), DK ($r_s=0,975$, $p < 0,0001$), GM1 ($r_s=0,836$, $p < 0,0001$).

IV.9. Estudo da influência do sexo, alterações de tônus, retardo neuropsicomotor e convulsões sobre a atividade e as propriedades cinéticas da enzima quitotriosidase (QT), bem como sobre os fatores pró-inflamatórios IL-6 e TNF- α em plasma de indivíduos normais e com as doenças de Gaucher tipo I (DG), Krabbe (DK), gangliosidose GM1 (GM1) e heterozigotos para doença de Gaucher tipo I (HG)

Inicialmente testamos se o sexo interferia na atividade e propriedades cinéticas da enzima quitotriosidase (QT), bem como sobre os fatores pró-inflamatórios TNF- α e IL-6 em todos os indivíduos (controles, HG, DG, DK e GM1) (Tabelas IV. 11, IV. 12 e IV. 13). Verificamos que o sexo não influenciou nenhuma das variáveis, embora os homens apresentassem uma tendência de maiores valores na atividade e nos níveis plasmáticos de IL-6 e TNF- α em algumas doenças (Tabelas IV.11, IV.12 e IV.13). Já na DK, os homens apresentaram maiores concentrações plasmáticas de TNF- α

Tabela IV. 11. Influência do sexo sobre a atividade da enzima quitotriosidase (QT) (nmol/h/mL) em plasma de indivíduos normais e com as doenças de Gaucher tipo I (DG), Krabbe (DK) e gangliosidose GM1 (GM1) e heterozigotos para doença de Gaucher tipo I (HG)

| Grupo | Sexo | N | Mediana | percentil 25 | percentil 75 | probabilidade |
|-----------|------|----|---------|--------------|--------------|---------------|
| Controles | M | 12 | 26,3 | 13,8 | 39,8 | |
| | F | 10 | 24,0 | 13,2 | 35,5 | NS |
| DG | M | 16 | 20164 | 11479 | 30717 | |
| | F | 14 | 12587 | 6215 | 25799 | NS |
| HG | M | 3 | 37,5 | 19,5 | 69,3 | |
| | F | 4 | 49,8 | 18,1 | 190 | NS |
| DK | M | 4 | 428 | 101 | 894 | |
| | F | 6 | 594 | 183 | 1105 | NS |
| GM1 | M | 11 | 542 | 210 | 887 | |
| | F | 11 | 775 | 307 | 938 | NS |

A comparação entre os grupos foi feita pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Nenhuma diferença significativa foi encontrada. M=masculino F=feminino.

Tabela IV. 12. Influência do sexo sobre os níveis plasmáticos do fator pró-inflamatório TNF- α (pg/mL) em indivíduos normais, com as doenças de Gaucher tipo I (DG), Krabbe (DK) e gangliosidose GM1 (GM1) e heterozigotos para doença de Gaucher tipo I (HG)

| Grupo | Sexo | N | Mediana | Percentil 25 | Percentil 75 | Probabilidade |
|-----------|------|---|---------|--------------|--------------|---------------|
| Controles | M | 2 | 0,70 | 0,33 | 1,07 | |
| | F | 6 | 1,31 | 0,59 | 1,77 | NS |
| DG | M | 7 | 5,02 | 2,47 | 9,82 | |
| | F | 3 | 3,75 | 1,50 | 13,0 | NS |
| HG | M | 3 | 3,25 | 2,06 | 3,70 | |
| | F | 4 | 3,00 | 1,32 | 4,24 | NS |
| DK | M | 4 | 3,54 | 2,09 | 4,60 | |
| | F | 5 | 3,97 | 3,32 | 5,33 | NS |
| GM1 | M | 5 | 6,76 | 2,97 | 21,9 | |
| | F | 8 | 3,68 | 1,53 | 5,14 | NS |

A comparação entre os grupos foi feita pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Nenhuma diferença significativa foi encontrada. M=masculino F=feminino

Tabela IV. 13. Influência do sexo sobre os níveis plasmáticos do fator pró-inflamatório IL-6 (pg/mL) em indivíduos normais, com as doenças de Gaucher tipo I (DG), Krabbe (DK) e gangliosidose GM1 (GM1) e heterozigotos para doença de Gaucher tipo I (HG)

| Grupo | Sexo | N | Mediana | Percentil 25 | Percentil 75 | Probabilidade |
|-----------|------|---|---------|--------------|--------------|---------------|
| Controles | M | 3 | 2,21 | 1,84 | 3,09 | |
| | F | 9 | 1,99 | 1,43 | 2,42 | NS |
| DG | M | 3 | 8,25 | 1,56 | 13,4 | |
| | F | 3 | 5,86 | 0,15 | 28,4 | NS |
| HG | M | 7 | 4,70 | 2,25 | 13,0 | |
| | F | 3 | 3,91 | 1,47 | 16,4 | NS |
| DK | M | 4 | 26,5 | 21,7 | 68,7 | |
| | F | 5 | 25,3 | 18,4 | 51,4 | NS |
| GM1 | M | 5 | 7,93 | 5,15 | 19,6 | |
| | F | 8 | 7,99 | 5,50 | 15,4 | NS |

A comparação entre os grupos foi feita pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Nenhuma diferença significativa foi encontrada. M=masculino F=feminino

O próximo passo foi determinar se a presença de retardo neuropsicomotor (RNPM) na DK e GM1 influenciava esses parâmetros. Observamos que nenhum dos parâmetros variou com a presença ou não de RNPM na DK (Tabela IV.14) e na GM1 (Tabela IV.15). Os resultados obtidos para a termoestabilidade por 15 min foram os mesmos obtidos em todos os outros períodos de exposição do plasma a 60 °C

Tabela IV. 14. Atividade e propriedades cinéticas da enzima quitotriosidase (QT) e fatores pró-inflamatórios TNF- α e IL-6 em plasma de indivíduos com a doença de Krabbe na presença ou ausência de retardo neuropsicomotor (RNPM)

| Parâmetro | RNPM | N | Mediana | Percentil 25 | Percentil 75 | Probabilidade |
|------------------|------|---|---------|--------------|--------------|---------------|
| Atividade | Sim | 7 | 644 | 83,5 | 969 | |
| | Não | 6 | 366 | 106 | 656 | NS |
| pH ótimo | Sim | 7 | 5,60 | 5,20 | 6,40 | |
| | Não | 6 | 5,50 | 5,35 | 5,75 | NS |
| Km | Sim | 7 | 6,00 | 4,90 | 6,60 | |
| | Não | 5 | 7,20 | 7,20 | 8,20 | NS |
| V _{max} | Sim | 7 | 405 | 213 | 703 | |
| | Não | 6 | 265 | 153 | 925 | NS |
| Termo 15' | Sim | 7 | 21,0 | 12,6 | 33,8 | |
| | Não | 4 | 10,5 | 4,25 | 33,5 | NS |
| IL-6 | Sim | 7 | 28,8 | 5,29 | 66,5 | |
| | Não | 5 | 50,6 | 2,01 | 60,1 | NS |
| TNF- α | Sim | 7 | 3,38 | 3,26 | 3,97 | |
| | Não | 5 | 4,17 | 2,27 | 4,69 | NS |

A comparação entre os grupos foi feita pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Nenhuma diferença significativa foi encontrada. Sim=portador de RNPM; Não=não portador de RNPM. As unidades de cada parâmetro estão descritas em Material e Métodos.

Tabela IV. 15. Atividade e propriedades cinéticas da enzima quitotriosidase (QT) e fatores pró-inflamatórios TNF- α e IL-6 em plasma de indivíduos com gangliosidose-GM1 na presença ou ausência de retardo neuropsicomotor (RNPM)

| Parâmetro | RNPM | N | Mediana | Percentil 25 | Percentil 75 | Probabilidade |
|------------------|------|----|---------|--------------|--------------|---------------|
| Atividade | Sim | 20 | 737 | 331 | 894 | NS |
| | Não | 10 | 514 | 227 | 805 | |
| pH ótimo | Sim | 20 | 5,60 | 5,40 | 6,00 | NS |
| | Não | 10 | 5,60 | 5,15 | 5,65 | |
| Km | Sim | 20 | 36,3 | 26,0 | 41,3 | NS |
| | Não | 8 | 34,5 | 30,2 | 43,4 | |
| V _{max} | Sim | 20 | 1574 | 689 | 1963 | NS |
| | Não | 9 | 1162 | 577 | 1840 | |
| Termo 15' | Sim | 18 | 27,7 | 25,1 | 2,67 | NS |
| | Não | 10 | 28,4 | 14,2 | 36,2 | |
| IL-6 | Sim | 12 | 9,43 | 6,39 | 28,6 | NS |
| | Não | 6 | 5,92 | 2,57 | 31,8 | |
| TNF- α | Sim | 12 | 4,73 | 3,11 | 6,44 | NS |
| | Não | 6 | 3,32 | 2,51 | 9,28 | |

A comparação entre os grupos foi feita pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Nenhuma diferença significativa foi encontrada. Sim=portador de RNPM Não=não portador de RNPM. As unidades de cada parâmetro estão descritas em Material e Métodos.

No que se refere à alteração de tônus muscular (hipo ou hipertonia), os pacientes com GM1 apresentaram uma tendência de maior TNF- α ($p=0,077$), sem nenhuma outra alteração nos outros parâmetros bioquímicos (Tabela IV. 16). Já nos pacientes com DK, não se verificou nenhuma alteração dos parâmetros estudados em relação a este parâmetro (Tabela IV.17).

Tabela IV. 16. Atividade e propriedades cinéticas da enzima quitotriosidase (QT) e fatores pró-inflamatórios TNF- α e IL-6 em plasma de indivíduos com gangliosidose-GM1 na presença ou ausência de hipotonia ou hipertonia

| Parâmetro | Hipotonia ou hipertonia | N | Mediana | Percentil 25 | Percentil 75 | Probabilidade |
|------------------|-------------------------|----|---------|--------------|--------------|---------------|
| Atividade | Sim | 17 | 700 | 337 | 887 | |
| | Não | 14 | 513 | 181 | 870 | NS |
| pH ótimo | Sim | 17 | 5,60 | 5,30 | 6,00 | |
| | Não | 14 | 5,60 | 5,35 | 5,80 | NS |
| Km | Sim | 17 | 35,3 | 32,3 | 40,5 | |
| | Não | 11 | 34,3 | 24,2 | 43,9 | NS |
| V _{max} | Sim | 17 | 1470 | 945 | 1900 | |
| | Não | 12 | 1466 | 572 | 1933 | NS |
| Termo 15' | Sim | 16 | 29,1 | 20,3 | 36,9 | |
| | Não | 13 | 19,0 | 13,9 | 29,4 | NS |
| IL-6 | Sim | 9 | 9,72 | 6,61 | 47,0 | |
| | Não | 9 | 6,39 | 3,38 | 19,2 | NS |
| TNF- α | Sim | 9 | 4,53 | 1,96 | 6,12 | |
| | Não | 9 | 3,63 | 3,01 | 11,4 | NS |

A comparação entre os grupos foi feita pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Nenhuma diferença significativa foi encontrada. S=portador de tônus muscular, N=não portador de tônus muscular. As unidades de cada parâmetro estão descritas em Material e Métodos.

Tabela IV. 17. Atividade e propriedades cinéticas da enzima quitotriosidase (QT) e fatores pró-inflamatórios TNF- α e IL-6 em plasma de indivíduos com a doença de Krabbe na presença ou ausência de hipotonia ou hipertonia

| Parâmetro | Hipotonia ou hipertonia | N | Mediana | Percentil 25 | Percentil 75 | Probabilidade |
|------------------|-------------------------|---|---------|--------------|--------------|---------------|
| Atividade | Sim | 8 | 430 | 110 | 894 | NS |
| | Não | 5 | 345 | 103 | 768 | |
| pH ótimo | Sim | 8 | 5,50 | 5,20 | 6,40 | NS |
| | Não | 5 | 5,60 | 5,30 | 5,90 | |
| Km | Sim | 8 | 6,30 | 5,10 | 7,20 | NS |
| | Não | 4 | 7,20 | 7,20 | 8,60 | |
| V _{max} | Sim | 8 | 320 | 167 | 661 | NS |
| | Não | 5 | 290 | 197 | 939 | |
| Termo 15' | Sim | 8 | 20,8 | 13,1 | 32,2 | NS |
| | Não | 3 | 16,5 | 3,50 | 39,8 | |
| IL-6 | Sim | 8 | 32,5 | 8,81 | 62,5 | NS |
| | Não | 4 | 28,2 | 1,41 | 63,6 | |
| TNF- α | Sim | 8 | 3,55 | 3,28 | 4,66 | NS |
| | Não | 4 | 3,28 | 2,22 | 4,41 | |

A comparação entre os grupos foi feita pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Nenhuma diferença significativa foi encontrada. Sim=portador de alterações de tônus muscular, N= não portador de alterações de tônus muscular. As unidades de cada parâmetro estão descritas em Material e Métodos.

Quando testamos se a hepatomegalia e a esplenomegalia estavam associadas a alterações nos parâmetros analisados nos pacientes com GM1, verificamos que a hepatomegalia se associava a um aumento da atividade e da V_{max} da quitotriosidase nestes pacientes (Tabela IV.18). Já a esplenomegalia não alterou esses parâmetros (Tabela IV.19).

Tabela IV. 18. Atividade e propriedades cinéticas da enzima quitotriosidase (QT) e fatores pró-inflamatórios TNF- α e IL-6 em plasma de indivíduos com gangliosidose GM1 na presença ou ausência de hepatomegalia

| Parâmetro | Hepatomegalia | N | Mediana | Percentil 25 | Percentil 75 | Probabilidade |
|------------------|---------------|----|---------|--------------|--------------|---------------|
| Atividade | Sim | 19 | 846 | 485 | 897 | |
| | Não | 12 | 287 | 122 | 757 | ** |
| pH ótimo | Sim | 19 | 5,60 | 5,40 | 6,00 | |
| | Não | 12 | 5,60 | 5,05 | 5,75 | NS |
| Km | Sim | 19 | 38,1 | 33,1 | 42,7 | |
| | Não | 9 | 32,2 | 16,7 | 38,4 | NS |
| V _{max} | Sim | 19 | 1770 | 1097 | 1967 | |
| | Não | 10 | 806 | 331 | 1812 | * |
| Termo 15' | Sim | 17 | 27,6 | 12,4 | 29,6 | |
| | Não | 12 | 29,4 | 18,5 | 37,5 | NS |
| IL-6 | Sim | 13 | 9,72 | 5,80 | 35,4 | |
| | Não | 5 | 6,83 | 3,38 | 13,5 | NS |
| TNF- α | Sim | 13 | 4,67 | 3,27 | 6,12 | |
| | Não | 5 | 3,11 | 1,30 | 14,9 | NS |

A comparação entre os grupos foi feito pelo teste não-para métrico de Mann-Whitney. Sim=com hepatomegalia; Não: sem hepatomegalia. * p < 0,05 ** p < 0,01. As unidades de cada parâmetro estão descritas em Material e Métodos.

Tabela IV. 19. Atividade e propriedades cinéticas da enzima quitotriosidase (QT) e fatores pró-inflamatórios TNF- α e IL-6 em plasma de indivíduos com gangliosidose GM1 na presença ou ausência de esplenomegalia

| Parâmetro | Esplenomegalia | N | Mediana | Percentil 25 | Percentil 75 | Probabilidade |
|------------------|----------------|----|---------|--------------|--------------|---------------|
| Atividade | Sim | 8 | 810 | 499 | 879 | |
| | Não | 23 | 572 | 238 | 887 | NS |
| pH ótimo | Sim | 8 | 5,50 | 5,40 | 5,95 | |
| | Não | 23 | 5,60 | 5,20 | 5,80 | NS |
| Km | Sim | 8 | 38,0 | 35,2 | 41,3 | |
| | Não | 20 | 34,3 | 25,6 | 42,5 | NS |
| V _{max} | Sim | 8 | 1574 | 982 | 1835 | |
| | Não | 21 | 1233 | 577 | 2017 | NS |
| Termo 15' | Sim | 7 | 27,6 | 11,8 | 28,7 | |
| | Não | 22 | 28,0 | 17,4 | 33,9 | NS |
| IL-6 | Sim | 4 | 9,43 | 7,08 | 55,1 | |
| | Não | 14 | 7,38 | 4,82 | 27,7 | NS |
| TNF- α | Sim | 4 | 5,78 | 3,33 | 7,35 | |
| | Não | 14 | 3,68 | 2,56 | 5,38 | NS |

A comparação entre os grupos foi feita pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Nenhuma diferença significativa foi encontrada. Sim=com esplenomegalia; Não=sem esplenomegalia. As unidades de cada parâmetro estão descritas em Material e Métodos.

No que se refere às convulsões nas DK e GM1, verificamos que os pacientes com DK não apresentaram variação nestes parâmetros com as convulsões (Tabela IV.20). Já nos com GM1, observamos que as convulsões estavam associadas com uma menor V_{max} e níveis plasmáticos menores de TNF- α (Tabela IV. 21).

Tabela IV. 20. Atividade e propriedades cinéticas da enzima quitotriosidase (QT) e fatores pró-inflamatórios TNF- α e IL-6 em plasma de indivíduos com a doença de Krabbe na presença ou ausência de convulsões

| Parâmetro | Convulsões | N | Mediana | Percentil 25 | Percentil 75 | Probabilidade |
|------------------|------------|---|---------|--------------|--------------|---------------|
| Atividade | Sim | 4 | 443 | 109 | 894 | |
| | Não | 3 | 644 | 83,5 | 992 | NS |
| pH ótimo | Sim | 4 | 5,90 | 5,30 | 6,35 | |
| | Não | 3 | 5,40 | 5,00 | 6,40 | NS |
| Km | Sim | 4 | 5,80 | 4,90 | 7,30 | |
| | Não | 3 | 6,60 | 4,90 | 9,00 | NS |
| V _{max} | Sim | 4 | 554 | 189 | 807 | |
| | Não | 3 | 533 | 235 | 966 | NS |
| Termo 15' | Sim | 4 | 30,7 | 16,3 | 38,0 | |
| | Não | 3 | 8,70 | 6,50 | 20,6 | NS |
| IL-6 | Sim | 4 | 24,1 | 8,81 | 63,2 | |
| | Não | 2 | 19,5 | 2,87 | 36,2 | NS |
| TNF- α | Sim | 4 | 3,54 | 2,09 | 5,56 | |
| | Não | 2 | 3,68 | 3,38 | 3,97 | NS |

A comparação entre os grupos foi feita pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Nenhuma diferença significativa foi encontrada. Sim=com convulsões; Não=sem convulsões. As unidades de cada parâmetro estão descritas em Material e Métodos.

Tabela IV. 21. Atividade e propriedades cinéticas da enzima quitotriosidase (QT) e fatores pró-inflamatórios TNF- α e IL-6 em plasma de indivíduos com gangliosidose GM1 na presença ou ausência de convulsões

| Parâmetro | Convulsões | N | Mediana | Percentil 25 | Percentil 75 | Probabilidade |
|------------------|------------|---|---------|--------------|--------------|---------------|
| Atividade | Sim | 4 | 513 | 223 | 901 | NS |
| | Não | 9 | 775 | 450 | 927 | |
| pH ótimo | Sim | 4 | 5,80 | 5,15 | 6,00 | NS |
| | Não | 9 | 5,60 | 5,20 | 5,90 | |
| Km | Sim | 3 | 31,5 | 14,4 | 35,1 | NS |
| | Não | 9 | 38,1 | 33,7 | 43,9 | |
| V _{max} | Sim | 4 | 864 | 410 | 1290 | * |
| | Não | 9 | 1833 | 1129 | 2379 | |
| Termo 15' | Sim | 4 | 33,2 | 15,6 | 41,5 | NS |
| | Não | 8 | 27,7 | 12,2 | 36,0 | |
| Termo 25' | Sim | 4 | 19,5 | 9,15 | 30,0 | NS |
| | Não | 8 | 8,60 | 2,50 | 24,1 | |
| IL-6 | Sim | 2 | 24,4 | 6,83 | 41,9 | NS |
| | Não | 6 | 18,5 | 7,30 | 34,8 | |
| TNF- α | Sim | 2 | 0,84 | 0,59 | 1,08 | * |
| | Não | 6 | 5,14 | 3,71 | 10,0 | |

A comparação entre os grupos foi feita pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney, * $p < 0,05$. Sim=com convulsões; Não=sem convulsões. As unidades de cada parâmetro estão descritas em Material e Métodos.

V. Discussão

V.1. Sensibilidade e eficácia do método enzimático para detecção de homozigotos e heterozigotos para a doença de Gaucher tipo I, doença de Krabbe e gangliosidose GM1

As doenças lisossômicas (DLD) são causadas pela deficiência de enzimas, de ativadores protéicos ou proteínas de transporte. Estas deficiências levam ao acúmulo de substratos (macromoléculas) nos lisossomos, fazendo com que a célula fique repleta de vacúolos de armazenamento, provocando alterações bioquímicas e sintomas clínicos característicos (Meikle et al., 1999; Brunetti-Pierri e Scaglia, 2008; Chen e Wang, 2008; Wolf e Quinn, 2008; Boomkamp e Butters, 2008; Giraldo e Pocovi, 2008). Dentre essas doenças, destacam-se as esfingolipidoses em que esfingolipídios se acumulam em um ou mais tecidos (órgãos) como resultado de uma deficiência primária de enzimas ou proteínas ativadoras que estão envolvidas nos processos de degradação destes compostos.

Homozigotos para as DG tipo I, DK e GM1 são usualmente diagnosticados pela determinação da atividade enzimática, resultando em uma atividade quase nula ou nula das enzimas β -glicosidase, galactocerebrosidase e β -galactosidase, respectivamente (Maria et al., 2003; Brunetti-Pierri e Scaglia, 2008; Chen e Wang, 2008). No presente estudo, observou-se inicialmente que os indivíduos com DG tipo I, DK e GM1 apresentaram 4,8 % da atividade da β -glicosidase (normal=10-45 nmol/h/mg proteína), 5 % da atividade da galactocerebrosidase (normal=14-53 nmol/h/mg proteína) e 3,1 % da atividade da β -galactosidase (normal=78-280 nmol/h/mg proteína) em leucócitos em

relação à atividade média dos indivíduos normais. Deve-se enfatizar que a deficiência relativa dessas atividades enzimáticas, utilizando-se para essas medidas substratos artificiais em leucócitos ou em fibroblastos cutâneos cultivados, não possui valor preditivo confiável para avaliar a gravidade clínica (prognóstico) e tampouco permitem distinguir os subtipos e variantes neurológicos e não neurológicos da DG (Basu et al., 1984; Glew et al., 1985; Grabowski et al., 1993; Randell et al., 2000).

Já nos heterozigotos para esses distúrbios existe uma sobreposição da faixa das atividades enzimáticas, inviabilizando o uso dessa análise como método confiável e sensível para detecção de heterozigotos para estas doenças (Beutler e Kuhl, 1970; Randell et al., 2000; Sopelsa et al., 2000). Os heterozigotos para DG utilizados no presente estudo apresentaram atividades da β -glicosidase da ordem de 40 a 60 % daquelas encontradas em indivíduos normais.

V.2. Quitotriosidase (QT): O biomarcador auxiliar no diagnóstico laboratorial para a DG, DK e GM1 e para avaliação do tratamento de reposição enzimática para a DG

Algumas proteínas séricas e em especial a quitotriosidase (QT) estão muito elevadas em pacientes com DG, mas também em outras esfingolipidoses, como a DK, a GM1 e a doença de Niemann-Pick (Guo et al., 1995; Wajner et al., 2004; Michelakakis, et al., 2004; Brinkman et al., 2005; Aerts et al., 2008; Charrow, 2009).

A QT, uma endo β -glicosaminidase secretada e ativada por macrófagos, está usualmente presente no fígado, rins, baço, pulmão e medula óssea (Hollak et al., 1994; Guo et al., 1995; Korolenko et al., 2000). Acredita-se que, por ser sintetizada por

macrófagos, a QT reflete processos inflamatórios (van Eijk et al., 2005), o que está de acordo com achados prévios, demonstrando uma elevada atividade da QT em neonatos com infecções fúngicas e bacterianas (Labadaridis et al., 2005). No que se refere ao aumento da atividade da QT em doenças lisossomais, tem sido postulado que este aumento se deva à ativação de macrófagos devido ao acúmulo de esfingolipídios contendo ceramida que são muito imunogênicos (Ballou et al., 1996). Neste sentido, foi demonstrada uma produção aumentada de QT por macrófagos induzida pelo acúmulo de esfingolipídios e outras macromoléculas, sendo então proposto que a QT está associada a um estímulo do sistema imunológico (van Eijk et al., 2005). Assim, poder-se-ia propor que o depósito de esfingomiélin e/ou ceramida ou de outros lipídios complexos, ao acarretar uma resposta inflamatória sistêmica e/ou neuroinflamatória, detectada pelo aumento da atividade da QT, poderia representar um importante mecanismo patogênico do dano tecidual que ocorre nas esfingolipidoses, em particular na doença de Gaucher tipo I, doença de Krabbe e gangliosidose GM1, que são instrumentos da presente investigação. Poder-se-ia também postular que os níveis plasmáticos muito elevados da QT na doença de Gaucher tipo I, relativamente aos das DK e GM1 devem-se ao fato da resposta inflamatória na DG ser mais a nível sistêmico (os sintomas são preponderantemente em tecidos periféricos) e nas DK e GM1 mais a nível central, localizada no SNC (os sintomas neurológicos são predominantes).

Por outro lado, a QT e outras proteínas plasmáticas como a enzima conversora da angiotensina (ECA) e a fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP) se correlacionam com a evolução clínica da DG, sendo úteis no monitoramento das respostas dos pacientes ao tratamento enzimático (Lacerda et al., 1999; Giraldo et al., 2001; Ida et al., 2001; Gaucher Registry, 2004; Weinreb, 2008). Assim, observou-se que na DG a

atividade da QT diminui em resposta à terapia de reposição enzimática (TRE) e que este decréscimo relaciona-se à dose da enzima de reposição e a indicadores de respostas clínicas positivas, como os parâmetros hematológicos e viscerais (Giraldo et al., 2001; Hollak et al., 2001). Convém, no entanto salientar que a atividade da QT ou outros marcadores bioquímicos não devem ser utilizados isoladamente na avaliação da gravidade das DLDs em que eles se encontram elevados (Robinson e Glew, 1980; Giraldo et al., 2000; Cox, 2001). Por outro lado, outros biomarcadores possivelmente úteis para o diagnóstico da DG encontram-se em investigação, como a proteína de membrana associada a lisossomo (LAMP) e a quemoquina CCL18 (Whitfield et al., 2002; Boot et al., 2003). Entretanto, destas proteínas séricas sabidamente elevadas, a QT é a que tem sido mais estudada na DG.

Não se pode também excluir que a patogênese da DG, bem como da DK e GM1, em que a atividade da QT também se encontra elevada, esteja relacionada de alguma forma com a atividade e/ou as propriedades cinéticas da QT. Além disso, é possível que a atividade dessa enzima possa estar correlacionada com suas propriedades cinéticas e estas, de alguma forma, com o quadro clínico dos pacientes afetados, o que até o presente momento não foi avaliado na literatura. Assim, o conhecimento das propriedades cinéticas da QT nas esfingolipidoses acima mencionadas comparativamente com a de indivíduos normais poderia em teoria ser importante para elucidar a patogênese dessas doenças degenerativas. Além disso, o conhecimento das propriedades cinéticas da QT nas DLDs em que esta atividade está aumentada no plasma pode ser importante na diferenciação de heterozigotos de indivíduos normais ou homozigotos.

Em um trabalho prévio, investigamos as propriedades cinéticas da QT em homocigotos para a DG e para doença de Niemann-Pick (DNP) (Wajner et al., 2004). Verificamos que as atividades plasmáticas da QT na DG e DNP foram, respectivamente, 600 e 30 vezes superior a de indivíduos normais. Além disso, o pH ótimo, a velocidade máxima e a termoestabilidade da QT nestas doenças diferiram daquelas de indivíduos normais. Foi então postulado que estas diferenças poderiam ser úteis na diferenciação de indivíduos normais daqueles afetados pelas DG e DNP.

V.3 Atividade e propriedades cinéticas da quitotriosidase (QT) nas doenças de Gaucher tipo I (DG), Krabbe (DK), gangliosidose GM1 (GM1), heterocigotos para a DG (HG) e indivíduos normais (controles)

No presente estudo, verificamos inicialmente que nos indivíduos com DG a atividade da QT apresentou-se muito acima da normalidade (em média 600 vezes), como já havia sido descrito na literatura por Hollak e colaboradores (1994). Além disso, a atividade plasmática da QT também estava aumentada em indivíduos com DK (em média 12 vezes) e GM1 (em média 15 vezes). Estudamos também as propriedades cinéticas da QT no plasma de pacientes com as DG tipo I, DK e GM1, bem como em heterocigotos obrigatórios para a DG, comparando-as com a de indivíduos normais. Um dos propósitos desta investigação foi verificar se alterações nestas propriedades poderiam estar relacionadas com a atividade desta enzima nestas doenças, ou mesmo se poderiam servir para diferenciar heterocigotos de homocigotos com DG ou de indivíduos normais.

Observamos que o pH ótimo da QT plasmática dos pacientes com DK e GM1 foi superior ao dos controles, enquanto a QT de homozigotos (DG) e heterozigotos para DG tipo I (HG) teve um pH ótimo inferior ao dos controles. Além disso, o maior Km observado para a QT foi aquele de pacientes com GM1, seguido daquele com DG. Estes foram muito superiores aos Km dos outros grupos (DK, HG e controles), refletindo uma menor afinidade da enzima pelo substrato nos pacientes com GM1 e DG. Por outro lado, o Km dos DK e HG foi respectivamente superior e inferior ao dos controles. Já no que se refere à V_{max} , observou-se um aumento acentuado desse parâmetro nos grupos DG, seguindo-se do GM1 e DK, relativamente ao grupo controle e HG. Esses achados foram semelhantes aos encontrados para a atividade da QT nos grupos estudados. Finalmente verificamos que a QT de indivíduos normais é muito mais termoestável, relativamente a QT dos pacientes com DG, DK e GM1, bem como ao grupo HG. Esses resultados foram publicados recentemente (Wajner et al., 2007).

As variações nas propriedades cinéticas da QT entre os vários grupos analisados em relação aos controles e também aos HG podem potencialmente representar marcadores bioquímicos simples e rápidos na diferenciação entre indivíduos homozigotos para algumas dessas doenças lisossomais e seus heterozigotos e entre heterozigotos para DG e indivíduos normais.

Neste particular, nossos resultados sugerem que os indivíduos normais podem ser diferenciados dos heterozigotos para DG através das propriedades cinéticas da QT: pH ótimo, Km e termoestabilidade. Deve-se, no entanto, enfatizar que existe em alguns casos superposição nas propriedades cinéticas da QT entre indivíduos normais e heterozigotos para a DG tipo I. Nesses casos, a utilização de apenas uma propriedade

cinética para fazer essa diferenciação é falha, necessitando-se tomar o conjunto das propriedades bioquímicas da enzima para que essa distinção se torne mais correta. Por outro lado, acreditamos que a investigação das propriedades cinéticas da QT em heterozigotos para as DK e GM1 e sua comparação com as de indivíduos normais seria desejável para se determinar se as mesmas podem ser utilizadas para diferenciar esses grupos entre si.

Os mecanismos responsáveis pelas propriedades cinéticas distintas da QT nos vários grupos de pacientes analisados não são conhecidos até o presente momento, mas podem refletir a presença de diferentes proporções de várias isoformas da enzima QT no plasma dos indivíduos afetados pelas DLDs aqui estudadas. Neste particular, foram previamente descritas várias isoformas da QT na DG (Quintana et al., 2006).

Procuramos a seguir verificar se o tratamento de reposição enzimática poderia alterar as propriedades cinéticas da QT em pacientes com DG tipo I.

V.4. Efeito do tratamento com reposição enzimática sobre as propriedades cinéticas da QT em pacientes com DG tipo I

Avaliamos se a terapia com reposição enzimática (imiglucerase) poderia alterar as propriedades bioquímicas da QT em pacientes com DG tipo I. Verificamos que a atividade da enzima apresentou um decréscimo ao longo do mesmo e que o Km se elevou significativamente em relação àquele do início do tratamento, enquanto as outras propriedades (V_{max} , pH ótimo e termoestabilidade) não foram alteradas pelo tratamento. Embora não se tenha uma explicação no momento para o aumento do Km com o tratamento, podemos supor que isoenzimas da QT com uma afinidade menor ao

substrato (maior Km) pudessem estar presentes em maior quantidade no sangue dos pacientes tratados.

Por outro lado, é possível que o aumento da atividade da QT na DG tipo I deva-se à ativação de macrófagos, possivelmente secundária ao acúmulo de uma maior quantidade de esfingolipídios, podendo contribuir potencialmente para a patogênese da doença através de um processo inflamatório. Assim, o tratamento com reposição de um análogo da enzima β -glicosidase deficiente diminui a quantidade dos lipídios acumulados, levando a uma menor ativação de macrófagos e inibição da secreção da QT pelos mesmos no plasma dos pacientes (Giraldo et al., 2001; Ida et al., 2001; Gaucher Registry, 2004). Também foi verificado que a diminuição da atividade da QT se correlaciona com a melhora da sintomatologia clínica dos pacientes afetados pela doença, sendo útil no monitoramento das respostas dos mesmos à TRE (Lacerda et al., 1999; Giraldo et al., 2001; Ida et al., 2001; Gaucher Registry, 2004).

V.5. Inflamação sistêmica e neuroinflamação como determinantes da patogênese nas doenças de Gaucher tipo I, Krabbe e gangliosidose GM1

Sinais de ativação do sistema imunológico, com infiltração de linfócitos T e ativação de células gliais ocorrem em algumas doenças neurológicas, embora pouco se saiba sobre os mecanismos exatos que determinam a suscetibilidade à neurodegeneração. Um conhecimento melhor das interações entre o sistema nervoso central e o sistema imunológico pode potencialmente determinar novas estratégias terapêuticas para os processos neurodegenerativos. Neste sentido, está bem estabelecido que nas doenças de Alzheimer e Parkinson, bem como na esclerose

amiotrófica lateral, a perda de células neurais está associada à ativação de células gliais residentes, como parte de uma resposta imunológica local (Aktas et al., 2007; Britschgi e Wyss-Coray, 2007). Além disso, na esclerose múltipla foram observadas placas inflamatórias compostas de células imunológicas infiltradas e células gliais residentes ativadas que provocam dano axonal (Ferguson et al., 1997) e posteriormente dano cortical (Kutzelnigg et al., 2005).

Assim, a neurodegeneração e a inflamação podem exercer efeitos interativos. Linfócitos T ativados podem cruzar a barreira hemato-encefálica intacta e antígenos do SNC podem seguir uma direção oposta para a circulação (Kawakami et al., 2004; Gálea et al., 2007). Esses fenômenos são complexos e nosso conhecimento sobre os fatores que iniciam e sustentam uma inflamação crônica que leva a danos irreparáveis ao SNC são muito escassos. No entanto, acredita-se que o dano cerebral produzido por inflamação crônica deve-se a células gliais residentes e a macrófagos derivados de monócitos (Trapp et al., 1999).

No caso da esclerose múltipla, é provável que a inflamação sistêmica que atinge o SNC provoque o recrutamento de células inflamatórias no mesmo e seja um mecanismo patogênico do processo neurodegenerativo. Em outros casos, é difícil distinguir se a neuroinflamação autoimune é causa ou consequência da doença. Por outro lado, a neuroinflamação não é sempre deletéria, pois em alguns casos exerce um efeito benéfico neuroprotetor, sendo que a liberação de fatores neurotróficos por leucócitos que invadem o SNC é benéfica após dano em células neurais (Hammarberg et al., 2000).

Recentemente foi postulado que a inflamação do SNC, com o recrutamento de monócitos e macrófagos do sangue periférico, está também associada a doenças lisossômicas de depósito, podendo possuir um papel importante na neurodegeneração presente nestas doenças (Mizukami et al., 2002). No entanto, há poucos trabalhos na literatura sobre esse tópico. A maioria se concentra na doença de Gaucher tipo I em que a QT plasmática, produto de macrófagos ativados, possui atividade muito aumentada. Neste particular, concentrações elevadas de várias interleucinas foram encontradas no cérebro de camundongos em um modelo animal da DG (Hong et al., 2006). Uma suscetibilidade genética entre o promotor do polimorfismo para o fator TNF- α e a doença de Gaucher tipo I também foi demonstrada, embora não houvesse correlação entre os níveis de QT e os de TNF- α (Altarescu et al., 2005). Foi também verificado que as elevações das concentrações das interleucinas IL- β , TNF- α e IL-6 podem induzir as manifestações ósseas e a incidência de hipergamaglobulinemia presente na DG.

No caso da gangliosidose GM1, foi demonstrado que o depósito de gangliosídeo GM1 provoca uma cascata de eventos celulares começando com a depleção de cálcio no retículo endoplasmático das células neurais e levando à apoptose neuronal (Tessitore et al., 2004). Este último evento provoca uma resposta neuroinflamatória associada com ativação de citocinas que por sua vez ativam a micróglia e macrófagos no sítio de apoptose (Jeykumar et al., 2002).

Embora na doença de Krabbe as citocinas tenham sido postuladas como importantes mediadores da resposta inflamatória (Levine e Brown, 1997), o papel da IL-6 que se encontra elevada no modelo animal desta doença é desconhecido

(Pedchenko e Levine, 1999). Por outro lado, foi verificado que a psicosina que se acumula na DK induz apoptose e ativação de citocinas em linfócitos e monócitos periféricos de pacientes com esta doença, sugerindo uma ativação do sistema imunológico periférico (Formichi et al., 2007; Pasqui et al., 2007). Também se acredita que a psicosina promove a morte de oligodendrócitos e desmielinização em pacientes e em modelos animais da doença. Por um lado, a inflamação, que é postulada ocorrer na DK, pode ser secundária ao dano induzido pelo acúmulo de psicosina e ter um papel primário em determinar a patogênese da doença. Independentemente se é causa ou consequência, a neuroinflamação parece determinar a progressão da DK.

Assim, acredita-se que o esclarecimento dos mecanismos regulatórios que controlam a micróglia e a ativação de astrócitos, bem como o conhecimento do controle exato da comunicação entre as células da resposta imunológica na periferia e no SNC ajudará a desenvolver novas estratégias para tratar os pacientes com doenças neurodegenerativas, incluindo-se os afetados por DLDs.

Portanto, o próximo passo de nossa investigação foi determinar as concentrações dos fatores pró-inflamatórios interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) no plasma dos pacientes com DG tipo I, DK, GM1, heterozigotos para a DG, bem como em indivíduos normais, uma vez que dados escassos existem na literatura sobre a medida de inflamação sistêmica nestes pacientes, além do que alguns resultados disponíveis são conflitantes. Além disso, os trabalhos disponíveis na literatura relacionam-se fundamentalmente a modelos animais dessas doenças. Também, não conhecemos nenhum trabalho que avaliou os parâmetros pró-

inflamatórios acima descritos simultaneamente em todos os grupos de pacientes com as doenças de depósito acima relacionadas e estudadas no presente trabalho.

Observamos inicialmente que tanto a IL-6 quanto o TNF- α estavam em concentrações plasmáticas aumentadas nos pacientes com DG tipo I, DK e GM1, bem como nos HG em relação aos controles.

Verificamos que o aumento observado nas concentrações plasmáticas de TNF- α nos pacientes afetados por DG, GM1 e DK foi aproximadamente de 3 a 4 vezes superior ao dos controles. Já as concentrações plasmáticas de IL-6 nesses mesmos pacientes foram superiores a dos controles na ordem de magnitude de 3 (DG e HG), 5 (GM1) e 15 (DK) vezes, indicando que esse parâmetro é mais sensível que o TNF- α . As concentrações plasmáticas da IL-6 nos HG não diferiram significativamente dos controles, mas foram quase três vezes superiores as dos mesmos. Se agora focarmos nossa atenção para a DK, verificamos que os pacientes afetados pela mesma apresentaram níveis plasmáticos mais altos de IL-6, quando comparados a todos os outros grupos. Esses achados indicam uma ativação do sistema imunológico a nível sistêmico nos pacientes com as doenças lisossomais acima descritas. É possível que essa ativação tenha ocorrido em resposta ao acúmulo dos lipídios complexos, característicos dessas doenças (Jeyakumar et al., 2003; Suzuki, 1998).

Por sua vez, se considerarmos que a resposta inflamatória sistêmica estava aumentada nesses pacientes, podemos também presumir que ela seja um reflexo do que ocorre no cérebro. Essa hipótese, no entanto, necessita ser comprovada. No entanto, apesar dos resultados terem sido encontrados em plasma, acredita-se que possam refletir o que ocorre no cérebro, visto que a inflamação sistêmica leva à

ativação de astrócitos e células gliais com todas suas consequências ruins para a viabilidade neuronal (Jeyakumar et al., 2003).

Neste contexto, deve-se enfatizar que os estudos que investigaram o papel da neuroinflamação como fator patogênico nas DG, GM1 e DK identificaram aumento dos fatores pró-inflamatórios IL-6 e TNF- α no cérebro *postmortem* dos pacientes ou de modelos animais dessas doenças tomados isoladamente. O presente estudo é o primeiro a investigar esses parâmetros pró-inflamatórios no sangue de pacientes acometidos por todas essas DLDs simultaneamente, possibilitando, portanto, comparações múltiplas entre os níveis dessas substâncias nos vários grupos de pacientes.

Outros estudos mostraram que os níveis plasmáticos de TNF- α estão elevados na DG sendo que as concentrações maiores foram encontradas na forma com comprometimento agudo do SNC (DG tipo II) (Michelakakis et al., 1996). Foi ainda verificado nesse estudo que as concentrações de TNF- α também estavam elevadas no plasma de pacientes com outras DLDs, tais como Nieman-Pick C, GM1, Krabbe, leucodistrofia metacromática, mucopolissacaridose IIIB e mucopolissacaridose II, III, porém em muito menores concentrações. Por outro lado, o tratamento de reposição enzimática por um ano nos pacientes com DG foi capaz de reduzir os níveis de TNF- α no sangue destes pacientes, refletindo uma relação causal entre as manifestações da doença e a secreção dessa citocina. Além disso, nenhuma correlação foi encontrada entre os níveis de TNF- α e as atividades da quitotriosidase e da β -glicosidase.

Outros investigadores, tomando em consideração uma investigação prévia demonstrando que a exposição de células mononucleares ao glicocerebrosídeo induz a síntese pelos mesmos de IL-1beta, de TNF- α e IL-6 (Yatziv et al., 1996), postularam

que a expressão das citocinas inflamatórias estudadas em resposta ao acúmulo nos macrófagos de glicocerebrosídeo pode estar envolvida na heterogeneidade das manifestações clínicas na DG (European Cytokine Network, 1999). Neste contexto, a redução do TNF- α ao longo da terapia de reposição enzimática está de acordo com essa hipótese (Michelakakis et al., 1996). Foi também verificada a expressão do mRNA das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α em monócitos de um paciente com DG (Lichtenstein et al., 1997), reforçando as observações de um processo inflamatório mediado por células mononucleares nessa doença.

Outros achados também mostraram um aumento dos níveis cerebrais das citocinas pró-inflamatórias IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e TNF- α , bem como de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio no cérebro fetal de camundongos com DG, sendo tais alterações consideradas como uma consequência do depósito de glicocerebrosídeo ou glicosil esfingosina que ocorre em pacientes com DG tipo II e III (Hong et al., 2006). Neste particular, a produção de óxido nítrico ocorre por macrófagos ativados por citocinas ou por microorganismos (Guzik et al., 2003). Por outro lado, a micróglia ativada por várias citocinas incluindo o TNF- α , também secreta óxido nítrico (Bogdan, 2001). Poderia então ser proposto que o acúmulo de glicosilceramida na micróglia poderia ser o fator responsável pela inflamação relacionada à neurodegeneração na DG.

No que se refere à doença de Krabbe, foi recentemente verificado que células mononucleares periféricas com acúmulo de psicossina de pacientes com esta doença secretam TNF- α (Pasqui et al., 2007). Quantidades elevadas de TNF- α também foram encontradas no cérebro de um modelo animal desta doença, além de macrófagos com

excesso de TNF- α em áreas de desmielinização (Pellegatta et al., 2006). Por outro lado, outros investigadores encontraram uma ativação do processo inflamatório em modelos animais e seres humanos com DK. Neste contexto, foi demonstrado que o TNF- α induz a produção de IL-6 em astrócitos e micróglia cultivados, bem como causa alterações em oligodendrócitos e na mielinização (Pellegatta et al., 2006). Além disso, astrócitos com TNF- α e IL-6 foram encontrados em cérebro de camundongos com DK (Levine et al., 1997). Outros estudos mostraram que o acúmulo de psicossina nas células globóides presentes na DK resulta em morte de oligodendrócitos e mielina e a psicossina mostrou induzir a produção de espécies ativas em células gliais de ratos (Khan et al., 2005), bem como apoptose e ativação da produção das citocinas TNF- α e IL-8 por linfócitos periféricos humanos de pacientes com DK (Formichi et al., 2007). Finalmente, foi detectada a presença da enzima óxido nítrico sintase em astrócitos ativados no cérebro de pacientes com DK, indicando o envolvimento de um processo inflamatório na patogênese da DK (Giri et al., 2002). Todos esses achados indicam um papel relevante para células e mediadores pró-inflamatórios na DK. Não se pode concluir no momento se o processo inflamatório é consequência do dano tecidual causado pelo acúmulo de psicossina ou se a inflamação é o processo primário determinante da patologia da doença. De qualquer forma, o processo inflamatório é importante para determinar a progressão da doença.

No que se refere à GM1, foi verificada uma ativação microglial e infiltração de células inflamatórias progressiva no cérebro de camundongos com esta doença que coincidiu com o acúmulo de glicosíngolipídios e com a evolução de sintomas neurológicos, sugerindo que a inflamação é um mecanismo importante na patogênese

da GM1 (Jeyakumar et al., 2003). Esses investigadores verificaram que os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1beta e TGF β 1 (fator de crescimento transformador) aumentaram juntamente com o aparecimento dos sintomas, sugerindo que elas são produzidas em resposta ao ou contribuem para a ativação imunológica localizada no SNC. Em relação à ativação do sistema imune no SNC e mais especificamente da micróglia, um possível mecanismo envolvido poderia ser pela fagocitose de neurônios apoptóticos repletos de lipídios, seguindo-se a produção de mediadores inflamatórios, tais como citocinas, prostaglandinas e óxido nítrico, que podem levar ao dano localizado no SNC. Neste contexto, gangliosídeos são capazes de ativar a micróglia diretamente in vitro produzindo mediadores pró-inflamatórios (Pyo et al., 1999). Portanto, é possível que os gangliosídeos liberados dos neurônios fagocitados pela micróglia possam iniciar o evento inflamatório e a patogênese da GM1. Também foi demonstrado que em modelos de GM1 em camundongos a ativação do sistema imunológico no SNC e/ou o armazenamento de lipídios provoca um aumento de permeabilidade da barreira hematoencefálica (Jeyakumar et al., 2003).

O TNF- α é uma citocina envolvida em vários mecanismos fisiológicos e patológicos (Vassali, 1992; Witsell e Schook, 1992; Mundy, 1993; Rieckmann et al., 1995). Macrófagos ativados e linfócitos T são as principais fontes desta citocina (Tracey e Cerami, 1993) que pode também ser secretada por astrócitos e pela micróglia (Lieberman et al., 1989; Renno et al., 1995). Além disso, deve ser enfatizado que TNF- α pode alterar a expressão de canais iônicos e o potencial de membrana de oligodendrócitos in vitro, provocar desmielinização e causar necrose nessas células, bem como induzir gliose (Soliven et al., 1991; Selmaj e Raine, 1988). Embora os níveis plasmáticos não reflitam necessariamente a situação no cérebro, é conhecido que

níveis circulantes aumentados de TNF- α podem modular a transmigração de linfócitos pela barreira hemato encefálica (McCarron et al., 1993) que por sua vez podem secretar citocinas no cérebro bem como induzir a secreção de TNF- α pela micróglia e pelos astrócitos (Renno et al., 1995; Conradi et al., 1988).

No que se refere à IL-6, sabe-se que essa citocina provoca maturação de linfócitos B, crescimento de linfócitos T e uma resposta aguda no fígado (Brach e Herman, 1992), estando, portanto, relacionada com processos inflamatórios. Níveis aumentados de IL-6 foram também verificados por outros investigadores que não encontraram níveis plasmáticos elevados de TNF- α e IL-1 beta nos pacientes com DG (Allen et al., 1997). Tais resultados aparentemente conflitantes podem ter sido devidos a diferenças nas populações de pacientes com DG ou nas técnicas de determinação dessas citocinas.

Finalmente, considerando que a inflamação tenha um papel importante na patogênese dessas DLDs, seria interessante procurar associar a resposta imunológica a nível sistêmico (aumento dos fatores pró-inflamatórios no plasma) com a sintomatologia e a evolução clínica dos pacientes afetados por DG, DK e GM1. Por outro lado, o fato de que os HG também apresentaram níveis de IL-6 em torno de três vezes maiores do que os dos controles sugere que nesses indivíduos também ocorre uma ativação das células do sistema imunológico responsáveis por sua produção.

Assim, as citocinas produzidas pelos macrófagos nessas DLD podem ser consideradas importantes no desenvolvimento da fisiopatologia das mesmas. No que se refere especificamente à DG, se acredita que o acúmulo de glicosilceramida nos macrófagos, principalmente no fígado, baço e osso seja responsável pela patologia da

doença (Beutler e Grabowski, 2001). Neste particular, embora dados relativos aos níveis de citocinas em pacientes com o DG sejam escassos, já foi demonstrado que a glicosilceramida estimula a produção de IL-1 por macrófagos (Gery et al., 1980).

V.6. Correlação entre os níveis plasmáticos de IL-6 e TNF- α com as atividades, β -glicosidase, galactocerebrosidase e β -galactosidase em leucócitos, bem como com a atividade e as propriedades cinéticas da QT no plasma nas doenças de Gaucher tipo I, Krabbe e gangliosidose GM1

O próximo passo de nossa investigação foi correlacionar os níveis plasmáticos de IL-6 e TNF- α com a atividade e as propriedades cinéticas da QT, bem como com as atividades leucocitárias da β -glicosidase, galactocerebrosidase e β -galactosidase. Como a idade dos indivíduos variou entre os vários grupos, procuramos associações entre a idade dos pacientes com as variáveis acima mencionadas dentro de cada grupo estudado (controles, HG e pacientes com DG, DK e GM1) para verificar se a mesma poderia interferir com essas variáveis. Não verificamos nenhuma associação significativa entre a idade, os fatores pró-inflamatórios IL-6 e TNF- α , a atividade e as propriedades cinéticas da quitotriosidase, indicando então que a atividade e as propriedades cinéticas da enzima e os fatores pró-inflamatórios não estão relacionados à idade dos indivíduos testados. Concluímos então que o intervalo de idades de nossa amostra (aproximadamente de 2 até 24 anos) não interfere nos parâmetros inflamatórios, bem como na atividade e propriedades bioquímicas da quitotriosidase.

Passamos, assim, às análises estatísticas procurando associações entre as variáveis. Observamos inicialmente que os níveis plasmáticos de IL-6 e TNF- α não

estavam correlacionados com a atividade e as propriedades bioquímicas da QT, indicando que o processo inflamatório sistêmico detectado no plasma dos pacientes com DG, DK, GM1 e HG por níveis elevados de IL-6 e TNF- α não influencia a atividade ou as propriedades cinéticas desta enzima. Tais resultados estão de acordo com um estudo prévio que não encontrou correlação entre os valores do TNF- α e a atividade da QT no plasma de pacientes com a DG (Altarescu et al., 2005).

Também não encontramos qualquer correlação significativa entre as concentrações plasmáticas de IL-6 e TNF- α com as atividades das enzimas β -glicosidase, galactocerebrosidase e β -galactosidase em leucócitos de pacientes com as doenças de Gaucher tipo I, Krabbe e GM1. Esses dados sugerem que a atividade residual dessas enzimas não se correlaciona com a inflamação sistêmica determinada pelos níveis de IL-6 e TNF- α .

Por outro lado, a atividade da QT se correlacionou positivamente com a V_{max} em todos os grupos estudados e houve correlação positiva entre a termoestabilidade nos vários tempos estudados. Nenhuma outra correlação entre as variáveis analisadas foi encontrada. Tais resultados estão de acordo com a literatura, confirmando que quanto maior a atividade de uma enzima, maior será a sua V_{max} . Por outro lado, a correlação positiva entre a atividade da enzima e a sua exposição à alta temperatura nos vários tempos de exposição reforça os achados prévios.

V.7. Estudo da influência do sexo, alterações de tônus, retardo neuropsicomotor e convulsões sobre a atividade e as propriedades cinéticas da enzima quitotriosidase (QT) e sobre os fatores pró-inflamatórios IL-6 e TNF- α em plasma de indivíduos normais e com as doenças de Gaucher tipo I (DG), Krabbe (DK), gangliosidose GM1 (GM1) e heterozigotos para doença de Gaucher tipo I (HG)

Procuramos a seguir verificar se o sexo e algumas sinais clínicos encontrados nos pacientes com DG, DK e GM1 influenciavam a atividade e as propriedades cinéticas da QT, bem como os níveis das interleucinas IL-6 e TNF- α em plasma desses indivíduos. Verificamos que o sexo não alterou significativamente nenhum desses parâmetros.

Já nos pacientes com GM1 a presença de hepatomegalia associou-se a uma elevação da atividade e da V_{max} da QT, indicando que esse sinal clínico possa estar relacionado a uma ativação do sistema imunológico (síntese aumentada da enzima por macrófagos), o que pode ser secundário ao acúmulo acentuado do monosialogangliosídeo 1 no fígado destes pacientes. Ainda nos pacientes com GM1, foi verificado que a presença de convulsões nos mesmos associou-se a uma menor velocidade máxima da QT e a níveis baixos de TNF- α . Nenhuma outra alteração significativa nesses parâmetros pode ser verificada nos pacientes com DG, DK e GM1. Por outro lado, as alterações encontradas podem ter sido casuais e mais estudos com um maior número de pacientes se fazem necessários para uma melhor interpretação desses dados.

V.8 Considerações finais

Concluindo, o presente estudo parece ser o primeiro a demonstrar diferenças significativas entre as atividades cinéticas da enzima quitotriosidase no plasma de pacientes com as doenças de Gaucher tipo I, Krabbe e gangliosidose GM1 e heterozigotos para a doença de Gaucher tipo I entre si e com indivíduos normais. É possível que alguns desses achados possam ser utilizados, conjuntamente com outras determinações bioquímicas, no diagnóstico dessas doenças, bem como na diferenciação na doença de Gaucher tipo I entre heterozigotos, homozigotos e indivíduos normais. Também verificamos nos pacientes afetados por essas doenças um aumento relevante nas concentrações plasmáticas de importantes citocinas secretadas por células mononucleares ativadas que apontam para um envolvimento da inflamação na fisiopatologia dessas doenças. Estudos anteriores se concentraram no aumento das concentrações dessas citocinas principalmente no cérebro *postmortem* de pacientes ou de modelos animais de algumas dessas doenças (neuroinflamação), enquanto o presente estudo demonstra um estímulo da resposta inflamatória sistêmica. Algumas correlações entre manifestações clínicas específicas da doença de Krabbe e gangliosidose GM1, tais como hepatomegalia na GM1, foram associadas a alterações das atividades e V_{max} da QT que podem, com estudos posteriores com um maior número de pacientes, melhor caracterizar a importância do envolvimento do sistema imunológico na patogênese do dano tecidual em órgãos específicos nos pacientes acometidos por essas doenças.

VI. CONCLUSÕES

1. Atividade plasmática e propriedades cinéticas da quitotriosidase (QT) nas doenças de Gaucher tipo I (DG), Krabbe (DK), gangliosidose GM1 (GM1) e heterozigotos para doença de Gaucher tipo I (HG)

A) A atividade plasmática da QT apresentou-se muito aumentada nos pacientes com DG (em média 600 vezes), DK (em média 12 vezes aumentada) e GM1 (em média 15 vezes aumentada), relativamente àquela encontrada em indivíduos controle (normais). Os heterozigotos para DG (HG) não diferiram significativamente dos controles neste parâmetro.

B). No que se refere às propriedades cinéticas da QT, observamos variações entre os vários grupos que podem potencialmente servir como adjuvantes no diagnóstico dessas patologias, bem como nos HG:

a. O pH ótimo da QT plasmática nos pacientes com DK e GM1 foi superior ao dos controles, enquanto a QT de homozigotos (DG) e heterozigotos para DG (HG) obteve um pH ótimo inferior ao dos controles. Verificamos ainda que não houve diferença entre o pH ótimo da enzima entre os pacientes com DG e HG, bem como entre os grupos DK e GM1.

b. O maior K_m observado para a QT foi nos pacientes com GM1, seguido daquele com DG. Estes foram muito superiores aos K_m dos outros grupos (DK, HG e controles), refletindo uma menor afinidade da enzima pelo substrato nos pacientes com GM1 e DG. Por outro lado, os K_m dos DK e HG foram, respectivamente, superior e inferior ao dos controles.

c. No que se refere à V_{max} , observou-se um aumento acentuado desse parâmetro nos grupos DG, seguindo-se do GM1 e DK, relativamente ao grupos controle e HG. Esses achados foram semelhantes aos encontrados para a atividade da QT nos grupos estudados.

d. Finalmente verificamos que a QT de indivíduos normais é muito mais termoestável, relativamente a QT dos pacientes com DG, DK e GM1, bem como ao grupo HG.

2. Atividade e propriedades cinéticas da QT antes e durante o tratamento da DG com reposição enzimática

A) A atividade da enzima QT apresentou um decréscimo ao longo da terapia de reposição enzimática (imiglucerase) e o Km se elevou significativamente em relação àquele do início do tratamento, enquanto as outras propriedades (Vmax, pH ótimo e termoestabilidade) não foram alteradas pelo tratamento.

3. Parâmetros pró-inflamatórios interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), atividades da QT, β -glicosidase, galactocerebrosidase e β -galactosidase em leucócitos, propriedades cinéticas da QT na DG, DK, GM1 e HG

A) As concentrações plasmáticas das citocinas IL-6 e TNF- α foram significativamente aumentadas nos pacientes com DG, DK e GM1, relativamente aos controles, indicando uma ativação do sistema imunológico a nível sistêmico nos pacientes com as doenças lisossomais acima descritas.

B) No que se refere às concentrações plasmáticas de TNF- α , observamos uma diferença altamente significante entre todos os grupos (controles e pacientes com DG, GM1, DK e HG), sendo aproximadamente de 3 a 4 vezes maiores nos pacientes relativamente aos controles. Além disso, não houve diferença significativa entre os grupos GM1, DG, DK e HG.

C) As concentrações plasmáticas de IL-6 nesses mesmos pacientes foram superiores a dos controles na ordem de magnitude de 3 (DG e HG), 5 (GM1) e 15 (DK) vezes. A maior concentração foi encontrada nos pacientes com DK, seguida dos com GM1, DG e dos HG.

D) Nenhuma associação foi verificada entre a idade e os fatores pró-inflamatórios IL-6 e TNF- α , a atividade e as propriedades cinéticas da quitotriosidade, indicando então que a idade dos indivíduos testados não influenciou a atividade e as propriedades cinéticas da enzima e os fatores pró-inflamatórios em nossa amostra.

E) As concentrações plasmáticas de IL-6 e TNF- α não se correlacionaram com a atividade e as propriedades bioquímicas da QT, indicando que o processo inflamatório sistêmico detectado no plasma dos pacientes com DG, DK, GM1 e HG por níveis elevados de IL-6 e TNF- α não influencia a atividade ou as propriedades cinéticas da QT.

F) Não houve correlação significativa entre os níveis plasmáticos de IL-6 e TNF- α com as atividades das enzimas β -glicosidase, galactocerebrosidase e β -galactosidase em leucócitos de indivíduos com as doenças de Gaucher tipo I (DG), Krabbe (DK), gangliosidose GM1 (GM1).

G) Houve correlação positiva entre a atividade da QT e a V_{max} em todos os grupos estudados (controles, DK, GM1 e HG), bem como entre a termoestabilidade da enzima nos vários tempos estudados..

H) Houve uma correlação negativa entre a V_{max} e a atividade plasmática da QT e a atividade leucocitária da β -galactosidase, sugerindo que macrófagos ativado poderiam reduzir a atividade desta enzima.

4. Associação entre o sexo, algumas manifestações clínicas, a atividade e as propriedades cinéticas da enzima quitotriosidase (QT) e os fatores pró-inflamatórios IL-6 e TNF- α na DG, DK, GM1 e HG

A) O sexo não influenciou a atividade e as propriedades cinéticas da enzima quitotriosidase (QT) na DG, DK, GM1 e HG.

B) Uma elevação da atividade e da V_{\max} da QT associou-se à presença de hepatomegalia nos pacientes com GM1, indicando que esse sinal clínico possa estar relacionado a uma ativação do sistema imunológico.

C) A presença de convulsões associou-se a níveis séricos baixos de TNF- α e menor V_{\max} nos pacientes com GM1.

VII. PERSPECTIVAS

1. Determinar a expressão das isoenzimas da quitotriosidase através de eletroforese tridimensional ao longo do tratamento (terapia de reposição enzimática) na doença de Gaucher.
2. Determinar as concentrações séricas de outros fatores pró-inflamatórios nas doenças de Gaucher, Krabbe e gangliosidose GM1.
3. Correlacionar a atividade dos fatores pró-inflamatórios séricos com as manifestações clínicas predominantes na doença de Gaucher.
4. Correlacionar a atividade dos fatores pró-inflamatórios séricos com a severidade das manifestações clínicas e a evolução das mesmas na doença de Krabbe e gangliosose GM1 com um número substancial de pacientes.

VIII. 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.

Aerts JM, Hollak CE, Boot RG, Groener JE, Maas M. Substrate reduction therapy of glycosphingolipid storage disorders. *J Inher Metab Dis*, 2006;29(2-3):449-56.

Aerts JM, van Breemen MJ, Bussink AP, Ghauharali K, Sprenger R, Boot RG, Groener JE, Hollak CE, Maas M, Smit S, Hoefsloot HC, Smilde AK, Vissers JP, de Jong S, Speijer D, de Koster CG. Biomarkers for Lysosomal storage disorders: identification and application as exemplified by chitotriosidase in Gaucher disease. *Acta Paediatric Suppl*, 2008; 97:7-14.

Aguilera B, Ghauharali-van der Vlugt K, Helmond MT, Out JM, Donker-Koopman WE, Groener 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.

Aktas O, Ullrich O, Infante-Duarte C, Nitsch R, Zipp F. Neuronal damage in brain inflammation. *Arch Neurol*. 2007; 64:185-189.

Aldosari M, Altuwaijri M, Husain AM. Brain-stem auditory and visual evoked potentials in children with Krabbe disease. *Clin Neurophysiol*, 2004; 115:1653-1656.

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. *QJM*. 1997; 90:19-25.

- Altarescu G, Zimran A, Michelakakis H, Elstein D. TNF- α gene polymorphism in type I Gaucher disease. *Cytokine*. 2005; 31:149-152.
- Amato D, Stachiw T, Clarke JT, Rivard GE. Gaucher disease: variability in phenotype among siblings. *J Inher Metab Dis*, 2004; 27:659-669.
- Arita FN. Lisossomopatias em Fonseca LF, Pianetti G e Xavier CC (editores): *Compêndio de Neurologia Infantil*, MEDSI (editora), 2002, pp 618-622.
- Athens JW Desordens envolvendo o sistema de monócitos-macrófagos-“Doenças de armazenamento”. In: Wintrobe MM, ED. *Hematologia Clínica*, Editora Manole, São Paulo, 1998; 1787-1799.
- Ballou LR, Laulederkind SJF, Rosloniec EF, Raghov R. Ceramide-signalling and the immune response. *Biochim Biophys Acta*, 1996;1301:273–287.
- Banks WA. Blood-brain barrier transport os cytokines: a mechanism for neuropathology. *Curr Pharm Des*, 2005; 11:973-984.
- Barone R, Bruhl K, Stoeter P, Fiumara A, Pavone L, Beck M. Clinical and neuroradiological findings in classic infantile and late-onset globoid-cell leukodystrophy (Krabbe disease). *Am J Med Genet*, 1996; 63:209-217.
- Barone R, Di Gregorio F, Romeo MA, Schiliro G, Pavone L. Plasma chitotriosidase activity in patients with beta-thalassemia. *Blood Cells Mol Dis*, 1999; 25:1-8.
- Barone R, Simporte J, Malaguarnera L, Pignatelli S, Musumeci S. Plasma chitotriosidase activity in acute *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Chim Acta*, 2003; 331: 79-85.

Barone R, Sotgiu S, Musumeci S. Plasma chitotriosidase in health and pathology. Clin Lab, 2007; 53:321-333.

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.

Bauer J, Rauschka H, Lassmann H. Inflammation in the nervous system: the human perspective. Glia. 2001; 36:235–243.

Bektas M and Spiegel S. Glycosphingolipids and cell death. Glycoconj J, 2004; 20:39-47.

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 leucocytes. J Lab Clin Med, 1970; 76: 747–754.

Beutler E, Trinitade F, Teplitz E, Nadler H. β -glucosidase activity in fibroblasts from homozygotes and heterozygotes for Gaucher's disease. Am J Hum Genet ,1971; 23: 62-65.

Beutler E and Grabowski GA. Gaucher Disease In: C.R. Scriver, D. Valle, A. Beudet and W.S. Sly, Editors, The metabolic and molecular bases of inherited diseases, McGraw Hill, New York (NY), 2001; 3635–3668.

Boelens JJ. Trends in haematopoietic cell transplantation for inborn errors of metabolism. J Inherit Metab Dis, 2006; 29:413-420.

Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. Nat Immunol, 2001; 2:907-916.

Boomkamp SD, Butters TD. Glycosphingolipid disorders of the brain. *Subcell Biochem*, 2008; 49: 441-467.

Boot RG, Renkema GH, Strijland A, van Zonneveld AJ, Aerts JM. Cloning of a cDNA encoding chitotriosidase, a human chitinase produced by macrophages. *J Biol Chem*, 1995; 270: 26252-26256.

Boot RG, Renkema GH, Verhoek M, Strijland A, Bliet J, de Meulemeester TM, Mannens MM, Aerts JM. The human chitotriosidase gene. Nature of inherited enzyme deficiency. *J Biol Chem*, 1998; 273: 25680-25685.

Boot RG, Blommaert EF, Swart E, Ghauharali-van der Vlugt K, Bijl N, Moe C, Place A, Aerts JM. Identification of a novel acidic mammalian chitinase distinct from chitotriosidase. *J Biol Chem*, 2001; 276: 6770-6778.

Boot RG, Verhoek M, de Fost M, Hollak CE, Maas M, Bleijlevens B, van Breemen MJ, van Meurs M, Boven LA, Laman JD, Moran MT, Cox TM, Aerts JM. Marked elevation of the chemokine CCL18/PARC in Gaucher disease: a novel surrogate marker for assessing therapeutic intervention. *Blood*, 2004;103:33-39.

Brach MA and Herrmann F. Interleukin-6: presence and future. *Int J Clin Lab Res*, 1992; 22:143.

Brinkman J, Wijburg FA, Hollak CE, Groener JE, Verhoek M, Scheij S, Aten J, Boot RG, Aerts JM. Plasma chitotriosidase and CCL18: early biochemical surrogate markers in type B Niemann-Pick disease, *J Inherit Metab Dis*. 2005;28:13-20.

Britschgi M and Wyss-Coray. Systemic and acquired immune responses in Alzheimer's disease. *Int Rev Neurobiol*, 2007; 82:205-233.

Brunner J, Scholl-Bürgi S, Zimmerhackl LB. Chitotriosidase as a marker of disease activity in sarcoidosis. *Rheumatol Int*, 2007; 27:1171-1172.

Brunetti-Pierri N e Scaglia F. GM1 gangliosidosis : review of clinical, molecular, and therapeutic aspects. *Mol Genet Metab*, 2008; 94:391-396.

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.

Cabello JF and Colombo MC, Esfingolipidosis In: Colombo MC, Cornejo VE and Raimann EB, Editors, *Errores innatos en el metabolismo del niño*, Editorial Universitaria, Santiago, 2003; 257-262.

Charrow J. Enzyme replacement therapy for Gaucher Disease. *Expert Opin Biol Ther*, 2009; 9:121-131.

Cheng M, Wang J. Gaucher disease: review of the literature. *Arch Pathol Lab Med*, 2008; 132:851-853.

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

Choi EH, Zimmerman PA, Foster CB, Zhu S, Kumaraswami V, Nutman TB, Chanock SJ. Genetic polymorphisms in molecules of innate immunity and susceptibility to infection with *Wuchereria bancrofti* in South India. *Genes Immun*, 2001; 2:248-253.

Combrinck MI, Perry VH, Cunningham C. Peripheral infection evokes exaggerated sickness behaviour in pre-clinical murine prion disease. *Neuroscience*, 2002; 112:7–11.

Conradi NG, Kalimo H, Sourander P. Reactions of vessel walls and brain parenchyma to the accumulation of Gaucher cells in the Norrbottnian type (type III) of Gaucher disease. *Acta Neuropathol*, 1988; 75:385-390.

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

Dantzer R, Kelley KW. Twenty years of research on cytokine –induced sickness behavior. *Ann N Y Acad Sci* , 2007; 21:153-160.

Ferguson B, Matyszak MK, Esiri MM, Perry VH. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain*. 1997; 120:393-399.

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.

Formichi P, Radi E, Battisti C, Pasqui A, Pompella G, Lazzarini PE, et al. Psychosine-induced apoptosis and cytokine activation in immune peripheral cells of Krabbe patients. *J Cell Physiol*. 2007; 212:737-743.

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; 277: 25537-25544.
- Futerman AH and van Meer G. The cell biology of lysosomal storage diseases. *Nature Rev Mol Cell Biol*, 2004, 5: 554-565.
- Galea I, Bernardes-Silva M, Forse PA, van Rooijen N, Liblau RS, Perry VH. An antigenspecific pathway for CD8 T cells across the blood-brain barrier. *J Exp Med*. 2007; 204:2023-2030.
- Gaucher Registry. Available at: <http://www.lsdregistry.net/gaucherregistry>, 2004
- Gery I, Zigler SJ, Jr, Brady RO and Barranger JA. Selective effects of glucocerebroside (Gaucher's storage material) on macrophage cultures. *J Clin Invest*, 1981; 68:1182-1189
- Gianfrancesco F, Musumeci S. The evolutionary conservation of the human chitotriosidase gene in rodents and primates. *Cytogenet Genome Res*, 2004;105:54-56.
- Ginzburg L, Kacher Y, Futerman AH. The pathogenesis of glycosphingolipid storage disorders. *Semin Cell Dev Biol*, 2004; 15: 417-431.

- Giraldo P, Pocovi M, Perez-Calvo J, Rubio-Felix D, Giralt M. Report of the Spanish Gaucher' Disease Registry: Clinical and genetic characteristics. *Haematologica*, 2000; 10: 691-709.
- Giraldo P, Giralt M, Pérez-Calvo JI, Pocoví M, Roca M, Rubio-Félix D In: Sanjurjo P, Baldellou A, editors; *Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias*, Ediciones Ergon, Madri, 2001; 449-459
- Giraldo P, Pocoví M. Lysosomal storage disorders. Is the natural history of the disease changing? *Med Clin (Barc)*, 2008; 130:259-260.
- Giri S, Jatana M, Rattan R, Won JS, Singh I, Singh AK. Galactosylsphingosine (psychosine)-induced expression of cytokine-mediated inducible nitric oxide synthases via AP-1 and C/EBP: implications for Krabbe disease, *FASEB J*. 2002; 16:661-672.
- 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; 254-267.
- Glew RH, Basu A, Prenc M and Remaley AT. Lysosomal storage diseases: Biology of Disease. *Lab Invest*, 1985; 53:250-269.
- Grabowski GA. Gaucher disease: enzymology, genetics and treatment. *Adv Hum Genet*, 1993; 377-441.
- 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 Inherit Metab Dis* ,1995; 18: 717-722.

Guzik TJ, Korbust R, Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol*, 2003; 54:469-487.

Hagberg B, Kollberg H, Sourander P, Akesson HO. Infantile globoid cell leucodystrophy (Krabbe's disease). A clinical and genetic study of 32 Swedish cases 1953-1967. *Neuropadiatrie* ,1969;1:74-88.

Hammarberg H, Lidman O, Lundberg C, Eltayeb SY, Gielen AW, Muhallab S, Svenningsson A, Lindå H, van Der Meide PH, Cullheim S, Olsson T, Piehl F. Neuroprotection by encephalomyelitis: rescue of mechanically injured neurons and neurotrophin production by CNS-infiltrating T and natural killer cells. *J Neurosci*. 2000; 20:5283-5291.

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

Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J*, 1990; 265:621-636

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 CE, van Weely S, van Oers MH, Aerts JM. Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease. *J Clin Invest*, 1994; 93: 1288-1292.

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).

- Holmes C, El-Okl M, Williams al, Cunningham C, Wilcockson D, Perry VH. Systemic infection, interleukin 1 beta, and cognitive decline in Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2003; 74:788–789.
- Hong YB, Kim EY and Jung S. Upregulation of Proinflammatory Cytokines in the fetal brain of the Gaucher mouse. *J Korean Med Sci*. 2006; 21-733-738.
- Hultberg B, Sjoblad S, Ockerman PA 4-Methylumbelliferyl-beta-glucosidase in cultured human fibroblasts from controls and patients with Gaucher's disease. *Clin Chim Acta*, 1973; 49: 93-97.
- Husain AM, Altuwaijri M, Aldosari M Krabbe disease: neurophysiologic studies and MRI correlations. *Neurology* , 2004; 63:617-620.
- 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.
- Isman F, Hobert JA, Thompson JN, Natowicz MR. Plasma chitotriosidase in lysosomal storage diseases. *Clin Chim Acta*, 2008; 387:165-167.
- Jakóbkiewicz-Banecka J, Wegrzyn A, Wegrzyn G. Substrate deprivation therapy: a new hope for patients suffering from neuronopathic forms of inherited lysosomal storage diseases. *J Appl Genet*, 2007; 48:383-388.

Jeyakumar M, Butters TD, Dwek RA, Platt FM. Glycosphingolipid lysosomal storage diseases. *Drugs*, 2002; 28: 343-357.

Jeyakumar M, Thomas R, Elliot-Smith E, et al. Central nervous system inflammation is a hallmark of pathogenesis in mouse models of GM1 and GM2 gangliosidosis. *Brain* . 2003; 126:974-987.

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.

Kacher Y and Futerman H. Genetic diseases of sphingolipid metabolism: pathological mechanisms and therapeutic options. *FEBS Letters*, 2006; 580: 5510-5517

Kawakami N, Lassmann S, Li Z, Odoardi F, Ritter T, Ziemssen T, Klinkert WE, Ellwart JW, Bradl M, Krivacic K, Lassmann H, Ransohoff RM, Volk HD, Wekerle H, Linington C, Flügel A. The activation status of neuroantigen-specific T cells in the target organ determines the clinical outcome of autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*. 2004; 199:185-197.

Khan M, Haq E, Giri S, Singh I, Singh AK. Peroxisomal participation in psychosine-mediated toxicity: implication for Krabbe's disease. *J Neurosci Res*, 2005; 80:845-854.

Konsman JP, Blond D, Vigues S. Neurobiology of interleukin-1 receptors: getting the message. *Eur Cytokine Netw*. 2000; 11:699–702.

Konsman JP, Parnet P, Dantzer R. Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. *Trends Neurosci*. 2002; 25:154–159.

Kornfeld R. Trafficking of lysosomal enzymes. *FASEB J* , 1987; 1: 462-468.

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

Krivit W, Shapiro EG, Peters C et al. Hematopoietic stem-cell transplantation in globoid-cell leukodystrophy. *N Engl J Med*, 1998; 338:1119-1126.

Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, Brück W, Rauschka H, Bergmann M, Schmidbauer M, Parisi JE, Lassmann H. Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain*. 2005; 128:2705-2712.

Labadaridis I, Dimitriou E, Theodorakis M, Kafalidis G, Velegraki A, Michelakakis H. Chitotriosidase in neonates with fungal and bacterial infections. *Arch Dis Child, Fetal Neonatal Ed* 2005; 90:531–532.

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

Landing BH, Silverman FN, Craig JM, Jacoby MD, Lahey ME, Chadwick DL. Familial neurovisceral lipidosis. An analysis of eight cases of a syndrome previously reported as 'Hurler-variant,' 'pseudo-Hurler disease' and 'Tay-Sachs disease with visceral involvement.'. *Am J Dis Child*, 1964; 108: 503-522.

Lehrnbecher T, Bernig T, Hanisch M, Koehl U, Behl M, Reinhardt D, Creutzig U, Klingebiel T, Chanock SJ, Schwabe D. Common genetic variants in the interleukin-6 and chitotriosidase genes are associated with the risk for serious infection in children undergoing therapy for acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 2005; 10:1745-50.

LeVine SM, Brown DC. IL-6 and TNF α expression in brains of twitcher, quaking and normal mice. *J Neuroimmunol*. 1997;73:47-56.

Lichstenstein M, Zimran A, Horowitz M. Cytokine mRNA in Gaucher's disease. *Blood Cells Mol Dis*, 1997; 23:395.

Lieberman AP, Pitha PM, Shin HS and Shin ML. Production of tumor necrosis factor and other cytokines by astrocytes stimulated with lipopolysaccharide or a neurotropic virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989; 86:6348-6352.

Lineweaver H and Burk D. The determination of enzyme dissociation constants. *J Am Chem Soc*, 1934; 56: 658-666.

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

Loes DJ, Peters C, Krivit W. Globoid cell leukodystrophy: distinguishing early-onset from late-onset disease using a brain MR imaging scoring method. *AJNR Am J Neuroradiol*, 1999; 20:316-323.

Lyon G, Adams RD, Kolodny EH. Neurology of hereditary metabolic diseases of children. McGraw Hill, New York, 1996.

Maire I, Guffon N, Froissart R. Current development and usefulness of biomarkers for Gaucher disease follow up. *Rev Med Interne*, 2007; 2:S187-192.

Malaguarnera L, Simpore J, Prodi DA, Angius A, Sassu A, Persico I, Barone R, Musumeci S. A 24-bp duplication in exon 10 of human chitotriosidase gene from the sub-Saharan to the Mediterranean area: role of parasitic diseases and environmental conditions. *Genes Immun*, 2003; 4: 570-574.

Malaguarnera L, Musumeci M, Licata F, Di Rosa M, Messina A and Musumeci S. Prolactin induces chitotriosidase gene expression in human monocyte-derived macrophages. *Immunology Letters*, 2004; 94:57-63.

Maria BL, Deidrick KM, Moser H, Naidu S. Leukodystrophies: pathogenesis, diagnosis, strategies, therapies and future research directions. *J Child Neurol*, 2003; 18:578-590.

Masoud M, Rudensky B, Elstein D, Zimran A. Chitotriosidase deficiency in survivors of *Candida* sepsis. *Blood Cells Mol Dis*, 2002; 29: 116-118.

McCarron RM, Wang L, Racke MK, McFarlin DE, Spatz M. Cytokine-regulated adhesion between encephalitogenic T lymphocytes and cerebrovascular endothelial cells. *J Neuroimmunol*, 1993; 43:23-30.

McGeer PL, Rogers J, McGeer EG. Inflammation, anti-inflammatory agents and Alzheimer disease: the last 12 years. *J Alzheimers Dis*. 2006; 9:271–276.

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

Meikle PJ, Ravenscruft 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. 1999

Michelakakis H, Spanou C, Kondyli A, Dimitriou E, Van Weely S, Hollak CE, Van Oers MH, Aerts JM. Plasma tumor necrosis factor- α (TNF- α) levels in Gaucher disease. *Biochim Biophys Acta*. 1996; 1317:219-222.

Michelakakis, H., Dimitriou, E. and Labadaridis, I. The expanding spectrum of disorders with elevated plasma chitotriosidase activity: an update. *J. Inherit. Metab. Dis*, 2004; 27:705–706.

Mignot C, Gelot A, Bessieres B, Daffos F, Voyer M, Menez F, Fallet Bianco C, Odent S, Le Duff D, Loget P, Fargier P, Costil J, Josset P, Roume J, Vanier MT, Maire I, Billette de Villemeur T. Perinatal-lethal Gaucher disease. *Am J Med Genet A*, 2003; 120:338-344.

Mizukami H, Mi Y, Wada R, Kono M, Yamashita T, Liu Y, Werth N, Sandhoff R, Sandhoff K, Proia RL. Systemic inflammation in glucocerebrosidase –deficient mice with minimal glucosylceramide storage. *J Clin Invest*. 2002; 109:215-221.

Montón C, Torres A. Lung inflammatory response in pneumonia. *Monaldi Arch Chest Dis*, 1998; 53:56-63.

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

Mueller RR and Young ID, *Biochemical Genetics In: Emery' s Elements of Medical Genetics*, Churchill Livingstone, New York 1995,127-141.

Mundy GR. Role of cytokines in bone resorption. *J Cell Biochem*, 1993; 53:296-300.

Muthane U, Chickabasaviah Y, Kaneski C, Shankar SK, Narayanappa G, Christopher R, Govindappa SS. Clinical features of adult GM1 gangliosidosis: report of three Indian patients and review of 40 cases. *Mov Disord*, 2004; 19:1334-1341

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. Biochemistry*, 1991; 60:257-280.

Nowacki PM, Treacy E, Casey K, Scriver CR. MCH PKU resource Booklet for families. Montréal Children's Hospital – Division of Biochemical Genetics, 1997.

O'Brien JS, Stern MB, Landing BH, O'brien JK, Donnell GN. Generalized Gangliosidosis: another inborn error of ganglioside metabolism? *Am J Dis Child*, 1965; 109:338-346

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.

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

Pasqui AL, Di Renzo M, Auteri A, Federico G and Puccetti L. Increased TNF- α production by peripheral mononuclear cells in patients with Krabbe's disease: effect of psychosine. *European Journal of Clin Invest*, 2007; 37:742-745.

Pedchenko TV and LeVine SM. IL-6 deficiency causes enhanced pathology in Twitcher (globoid cell leukodystrophy) mice. *Exp Neurol*. 1999; 158:459-468.

Pellegatta S, Tunici P, Poliani PL, Dolcetta D, Cajola L, Colombelli C, Ciusani E, Di Donato S, Finocchiaro G. The therapeutic potential of neural stem progenitor cells in murine globoid cell leukodystrophy is conditioned by macrophage/microglia activation. *Neurobiol Dis*, 2006; 21:314-323.

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.

Peters C, Steward CG. Hematopoietic cell transplantation for inherited metabolic diseases: an overview of outcomes and practice guidelines. *Bone Marrow Transplant*, 2003; 31:229-239.

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.

Pshezhetsky AV, Ashmarina M. Lysosomal multienzyme complex: biochemistry, genetics, and molecular pathophysiology. *ProgNucleic Acid Res Mol Biol*, 2001; 69:81-114.

Pyo H, Joe E, Jung S, Lee SH, Jou I. Gangliosides activate cultured rat brain microglia. *J Biol Chem*, 1999; 274: 34584-34589.

Quintana L, Monasterio A, Escuredo K, del Amo J, Alfonso P, Elortza F, Santa Cruz S, Simón L, Martínez A, Giraldo P, Pocoví M, Castrillo JL. Identification of chitotriosidase isoforms in plasma of Gaucher disease patients by two dimensional gel electrophoresis. *Biochim Biophys Acta (BBA)*, 2006; 1764:1292-1298.

- Raas-Rothschild A, Pankova-Kholmyansky I, Kacher Y, Futerman AH. Glycosphingolipidoses: beyond the enzymatic defect. *Glycoconj J* 2004; 21:295-304.
- Randell E, Connolly-Wilson M, Skomorowski Marie-Anne and Callahan J. Evaluation of the accuracy of enzymatically determined carrier status of Krabbe disease by DNA-based testing. *Clin Biochem*, 2000; 33:217-220.
- Renkema GH, Boot RG, Strijland A, Donker-Koopman WE, van den Berg M, Muijsers AO, Aerts JM Synthesis, sorting, and processing into distinct isoforms of human macrophage chitotriosidase. *Eur J Biochem*, 1997; 244: 279-285.
- Renno T, Krakowski M, Piccirillo C, Lin JY, Owens T. TNF-alpha expression by resident microglia and infiltrating leukocytes in the central nervous system of mice with experimental allergic encephalomyelitis. Regulation by Th1 cytokines. *J Immunol*, 1995; 15; 154:944-953.
- Rieckmann P, Albrecht M, Kitze B, Weber T, Tumani H, Broocks A, Lürer W, Helwig A and Poser S. Tumor necrosis factor-alpha messenger RNA expression in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is associated with disease activity. *Ann Neurol*, 1995; 37:82-88.
- 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.

- Rohrbach M, Clarke JT. Treatment of lysosomal storage disorders: progress with enzyme replacement therapy. *Drugs*, 2007; 67:2697-2716.
- 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 and Kolter T,. Biosynthesis and degradation of mammalian glycosphingolipids. *Phil Trans R Soc Lond B*, 2003; 358:847-861.
- Sawkar AR, D'Haese W, Kelly JW. Therapeutic strategies to ameliorate lysosomal storage disorders- focus on Gaucher disease. *Cel. Mol. Life. Science*, 2006; 63: 1179-1192.
- 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.
- Schütte H, Lohmeyer J, Rosseau S, Ziegler S, Siebert C, Kielisch H, Pralle H, Grimminger F, Morr H, Seeger W. Bronchoalveolar and systemic cytokine profiles in patients with ARDS, severe pneumonia and cardiogenic pulmonary oedema. *Eur Respir J*, 1996; 9:1858–1867.
- Selmaj KW and Raine CS. Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage in vitro. *Ann Neurol*, 1988; 23:339-346
- Sidransky E. Gaucher disease: complexity in a “simple” disorder. *Mol Genet Metab*, 2004; 83:6-15

Sillence D and Platt FM. Glycosphingolipids and endocytic sorting. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2004, 15.

Sinclair L. A new look at the inborn error of metabolism. *Ann Clin Biochem*, 1982; 19:314-321.

Soliven B, Szuchet S, Nelson DJ. Tumor necrosis factor inhibits K⁺ current expression in cultured oligodendrocytes. *J Membr Biol*, 1991; 124:127-137.

Sopelsa AM, Severini MH, Da Silva CM, Tobo PR, Giugliani R, Coelho JC. Characterization of beta-galactosidase in leukocytes and fibroblasts of GM1 gangliosidosis heterozygotes compared to normal subjects. *Clin Biochem*, 2000; 33:125-129.

Spiegel R, Bach G, Sury V, Mengistu G, Meidan B, Shalev S, Shneur Y, Mandel H, Zeigler M. A mutation in the saposin A coding region of the prosaposin gene in an infant presenting as Krabbe disease: first report of saposin A deficiency in humans. *Mol Genet Metab*, 2005; 84:160-166.

Suzuki K. Twenty five years of the "psychosine hypothesis": a personal perspective of its history and present status. *Neurochem Res*. 1998;23:251-259.

Suzuki Y, Oshima A, Nanba E, β -galactosidase deficiency (β -galactosidosis): GM1 Gangliosidosis and Morquio B disease In: C.R. Scriver, D. Valle, A. Beudet and W.S. Sly, Editors, *The metabolic and molecular bases of inherited diseases*, McGraw Hill, New York (NY) (2001) pp 3775-809.

Suzuky Y. Chemical chaperone therapy for GM1-gangliosidosis. *Cell Mol Life Sci*, 2008; 65:351-353.

- 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.
- Tessitore A, del P Martin M, Sano R, Ma Y, Mann L, Ingrassia A, Laywell ED, Steindler DA, Hendershot LM, d'Azzo A . GM1-ganglioside-mediated activation of the unfolded protein response causes neuronal death in a neurodegenerative gangliosidosis. *Mol Cell*. 2004; 15:753-766.
- Tjoelker LW, Gosting L, Frey S, Hunter CL, Trong HL, Steiner B, Brammer H, Gray PW. Structural and functional definition of the human chitinase chitin-binding domain. *J Biol Chem*, 2000; 275: 514-520.
- Tracey KJ, Cerami A. Tumor necrosis factor: an updated review of its biology. *Crit Care Med*, 1993; 21:415-422.
- Trapp BD, Bo L, Mork S, Chang A. Pathogenesis of tissue injury in MS lesions. *J Neuroimmunol*. 1999; 98:49-56.
- Turrin NP, Rivest S. Unraveling the molecular details involved in the intimate link between the immune and neuroendocrine systems. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2004; 229:996–1006.
- van Eijk M, van Roomen CP, Renkema GH, Bussink AP, Andrews L, Blommaert EF, Sugar A, Verhoeven AJ, Boot RG, Aerts JM. Characterization of human phagocyte-derived chitotriosidase, a component of innate immunity. *Int Immunol*, 2005;17:1505-1512.
- van Meer G, Sprong H. Membrane lipids and vesicular traffic. *Curr Opin Cell Biol*, 2004; 16:373-378.

Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol*, 1992; 10:411-452.

Vellodi A Lysosomal storage disorders. *Br J Haematol*, 2005; 128:413-431

Vinetz JM, Valenzuela JG, Specht CA, Aravind L, Langer RC, Ribeiro JM, Kaslow DC
Chitinases of the avian malaria parasite *Plasmodium gallinaceum*, a class of enzymes necessary for parasite invasion of the mosquito midgut. *J Biol Chem*, 2000; 275: 10331-10341.

Waber L Inborn errors of metabolism. *Pediatric Annals*, 1990; 19:105-118.

Wajner A, Michelin K, Burin Maira G., Pires RF., Pereira ML, Giugliani R , Coelho JC.
Biochemical characterization of chitotriosidase enzyme: comparison between normal individuals and patients with Gaucher and with Niemann–Pick diseases. *Clin Biochem*, 2004; 37:893-897.

Wajner A, Michelin K, Burin MG, Pires RF, Pereira ML, Giugliani R, Coelho JC.
Comparison between the biochemical properties of plasma chitotriosidase from normal individuals and from patients with Gaucher disease, GM1-gangliosidosis, Krabbe disease and heterozygotes for Gaucher disease. *Clin Biochem*. 2007; 40:365-369.

Walkley SU. Secondary storage of GSLs. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2004, 15.

Wapper RS. Biochemical Diagnosis of Genetic Diseases. *Ped Ann*, 1993; 22:282-297.

Watts RW. A historical perspective of glycosphingolipids and sphingolipidosis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2003; 358:915-919.

- Weinreb NJ. Imiglucerase and its use for treatment of Gaucher's disease. *Expert Opin Pharmacother*, 2008; 9: 1987-2000.
- Wenger DA, Rafi MA., Luzi P, Datto J and Costantino-Ceccarini E. Krabbe Disease: Genetic Aspects and Progress toward Therapy. *Mol Genet and Metab*, 2000; 70:1–9.
- Whitfield PD, Nelson P, Sharp PC, Bindloss CA, Dean C, Ravenscroft EM, Fong BA, Fietz MJ, Hopwood JJ, Meikle PJ. 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>.
- Witsell AL, Schook LB. Tumor necrosis factor alpha is an autocrine growth regulator during macrophage differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993;90(10):4763
- Wolf C, Quinn PJ. Lipidomics in diagnosis of lipidoses. *Subcell Biochem*, 2008; 49: 567-588
- Wu YP, Matsuda J, Kubota A, Suzuki K. Infiltration of hematogenous lineage cells into the demyelinating central nervous system of twitcher mice. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2000; 59:628-639.
- 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.
- Yatsiv S, Aker M, Barif G, Barak V. Cytokines in Gaucher's disease. *World Pediatrics and Child Care*, 1996; 6:18.

Zheng T, Rabach M, Chen NY, Rabach L, Hu X, Elias JA, Zhu Z. Molecular cloning and functional characterization of mouse chitotriosidase. *Gene* 2005;357:37–46.

IX.LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela I.1. Esfingolipidoses: defeitos enzimáticos e glicosfingolipídios (GEL) acumulados..... | 19 |
| Tabela III.1. Preparação do substrato da reação em diversas concentrações (0,00125mM a 0,026mM)..... | 50 |
| Tabela III.2. Concentrações de β -Metilumbeliferona para curva-padrão..... | 51 |
| Tabela III.3: Intervalos de concentração de substrato utilizados para a determinação do Km e Vmax da quitotriosidase em plasma dos grupos estudados..... | 54 |
| Tabela IV.1. Velocidade máxima (Vmax, nmol/h/mL) da enzima quitotriosidase em plasma de indivíduos normais, pacientes com a doença de Gaucher tipo I (DG), doença de Krabbe (DK), gangliosidose GM1 (GM1) e heterozigotos para doença de Gaucher tipo I (HG)..... | 74 |
| Tabela IV.2. Propriedades bioquímicas da enzima quitotriosidase em plasma de pacientes com a doença de Gaucher tipo I (DG) sem e com tratamento de reposição enzimática..... | 81 |

Tabela IV. 3. Comparação entre o pH ótimo da enzima quitotriosidase (QT) em plasma de indivíduos normais e com as doenças de Gaucher tipo I (DG), Krabbe (DK), gangliosidose GM1 (GM1) e heterozigotos para a doença de Gaucher tipo I (HG).....83

Tabela IV. 4. Comparação entre o Km (μM) da enzima quitotriosidase (QT) em plasma de indivíduos normais e com as doenças de Gaucher tipo I (DG), Krabbe (DK), gangliosidose GM1 (GM1) e heterozigotos para a doença de Gaucher tipo I (HG).....84

Tabela IV. 5. Comparação entre a V_{max} (nmol/h/mL) da enzima quitotriosidase (QT) em plasma de indivíduos com as doenças de Gaucher tipo I (DG), Krabbe (DK), gangliosidose GM1 (GM1) e heterozigotos para a doença de Gaucher tipo I (HG).....85

Tabela IV. 6. Comparação da termoestabilidade da enzima quitotriosidase (QT) (15 min a 60 °C) em plasma de indivíduos normais, com as doenças de Gaucher tipo I (DG), Krabbe (DK), gangliosidose GM1 (GM1) e heterozigotos para a doença de Gaucher tipo I (HG).....86

Tabela IV.7. Atividade da quitotriosidase (nmol/h/mL) em plasma de indivíduos normais, heterozigotos para a doença de Gaucher tipo I (HG) e pacientes com as doenças de Gaucher tipo I (DG), Krabbe (DK) e gangliosidose GM1 (GM1).....87

Tabela IV.8. Concentrações plasmáticas da interleucina 6 (IL-6) (pg/mL) no plasma de indivíduos normais, heterozigotos para a doença de Gaucher tipo I (HG) e pacientes com as doenças de Gaucher tipo I (DG), Krabbe (DK), gangliosidose GM1 (GM1).....88

Tabela IV.9. Concentrações plasmáticas do fator de necrose tumoral (TNF- α) (pg/mL) no plasma de indivíduos normais, heterozigotos para a doença de Gaucher tipo I (HG) e afetados com as doenças de Gaucher tipo I (DG), Krabbe (DK), gangliosidose GM1 (GM1).....89

Tabela IV.10. Comparação entre a idade(meses) dos indivíduos analisados (controles e pacientes com as doenças de Gaucher tipo I (DG), Krabbe (DK), gangliosidose GM1 (GM1) e heterozigotos para doença de Gaucher tipo I (HG).....90

Tabela IV.11. Influência do sexo sobre a atividade da enzima quitotriosidase (QT) em plasma de indivíduos normais e com as doenças de Gaucher tipo I (DG), Krabbe (DK) e gangliosidose GM1 (GM1) e heterozigotos para doença de Gaucher tipo I (HG).....94

Tabela IV. 12. Influência do sexo sobre os níveis plasmáticos do fator pró-inflamatório IL-6 (pg/mL) em indivíduos normais e com as doenças de Gaucher tipo I DG), Krabbe (DK) e gangliosidose GM1 (GM1) e heterozigotos para doença de Gaucher tipo I (HG).....95

Tabela IV. 13. Influência do sexo sobre os níveis plasmáticos do fator pró-inflamatório TNF- α (pg/mL) em indivíduos normais e com as doenças de Gaucher tipo I (DG), Krabbe (DK) e gangliosidose GM1 (GM1) e heterozigotos para doença de Gaucher tipo I (HG).....96

Tabela IV. 14. Atividade e propriedades cinéticas da enzima quitotriosidase (QT) em plasma de indivíduos com a doença de Krabbe na presença ou ausência de retardo neuropsicomotor (RNPM).....97

Tabela IV. 15. Atividade e propriedades cinéticas da enzima quitotriosidase (QT) em plasma de indivíduos com a Gangliosidose GM1 na presença ou ausência de retardo neuropsicomotor (RNPM).....98

Tabela IV. 16. Atividade e propriedades cinéticas da enzima quitotriosidase (QT) em plasma de indivíduos com a Gangliosidose GM1 na presença ou ausência de hipotonia ou hipertonia.....99

Tabela IV. 17. Atividade e propriedades cinéticas da enzima quitotriosidase (QT) em plasma de indivíduos com a Doença de Krabbe na presença ou ausência de hipotonia ou hipertonia.....100

Tabela IV. 18. Atividade e propriedades cinéticas da enzima quitotriosidase (QT) em plasma de indivíduos com gangliosidose GM1 na presença ou ausência de hepatomegalia.....101

Tabela IV. 19. Atividade e propriedades cinéticas da enzima quitotriosidase (QT) em plasma de indivíduos com gangliosidose GM1 na presença ou ausência de esplenomegalia.....102

Tabela IV. 20. Atividade e propriedades cinéticas da enzima quitotriosidase (QT) em plasma de indivíduos com a Doença de Krabbe na presença ou ausência de convulsões.....103

Tabela IV. 21. Atividade e propriedades cinéticas da enzima quitotriosidase (QT) em plasma de indivíduos com gangliosidose GM1 na presença ou ausência de convulsões.....104

Figuras

Figura I.1. Biossíntese dos GELs, enfatizando a conversão da ceramida em glicosilceramida (glicocerebrosídeo) através da ação da ceramida glicosiltransferase...13

Figura I.2. Catabolismo dos GELs e as doenças associadas a deficiências de hidrolases ácidas lisossomais.....14

| | |
|---|----|
| Figura I.3. Reação da quitotriosidase..... | 21 |
| Figura IV.1. Atividade plasmática da quitotriosidase (QT) em indivíduos normais, em homozigotos para doença de Gaucher tipo I, doença de Krabbe e gangliosidose GM1, bem como em heterozigotos para DG | 62 |
| Figura IV.2. Determinação do pH ótimo da enzima quitotriosidase em plasma de indivíduos normais | 63 |
| Figura IV.3 Determinação do pH ótimo da enzima quitotriosidase em plasma de indivíduos homozigotos para doença de Gaucher tipo I | 64 |
| Figura IV.4 Determinação do pH ótimo da enzima quitotriosidase em plasma de indivíduos homozigotos para doença de Krabbe | 65 |
| Figura IV.5 Determinação do pH ótimo da enzima quitotriosidase em plasma de pacientes com gangliosidose GM1..... | 65 |
| Figura IV.6: Determinação do pH ótimo da enzima quitotriosidase em plasma de indivíduos heterozigotos para doença de Gaucher tipo I..... | 66 |

Figura IV.7. Comparação do pH ótimo da enzima quitotriosidase em plasma de indivíduos normais e pacientes com as doenças GM1, de Krabbe , de Gaucher e heterozigotos para a doença de Gaucher tipo I67

Figura IV.8. Efeito de diferentes concentrações de substrato (4-metilumbeliferil- β -D-N,N',N''-triacetil-quitotriosideo) sobre a atividade da enzima quitotriosidase de plasma de indivíduos normais.....68

Figura IV.9. Efeito de diferentes concentrações de substrato (4-metilumbeliferil- β -D-N,N',N''-triacetil-quitotriosideo) sobre a atividade da enzima quitotriosidase de plasma de indivíduos homozigotos para a doença de Gaucher tipo I.....68

Figura IV.10. Efeito de diferentes concentrações de substrato (4-metilumbeliferil- β -D-N,N',N''-triacetil-quitotriosideo) sobre a atividade da enzima quitotriosidase de plasma de pacientes com doença de Krabbe.69

Figura IV.11. Efeito de diferentes concentrações de substrato (4-metilumbeliferil- β -D-N,N',N''-triacetil-quitotriosideo) sobre a atividade da enzima quitotriosidase de plasma de pacientes com gangliosidose GM1.69

Figura IV.12. Efeito de diferentes concentrações de substrato (4-metilumbeliferil- β -D-N,N',N''-triacetil-quitotriosideo) sobre a atividade da enzima quitotriosidase de plasma de heterozigotos para doença de Gaucher tipo I.....70

Figura IV.13. Determinação do K_m e da V_{max} para a enzima quitotriosidase em plasma de indivíduos normais.....71

Figura IV.14. Determinação do K_m e da V_{max} para a enzima quitotriosidase em plasma de indivíduos com doença de Gaucher tipo I.....72

Figura IV.15. Determinação do K_m e da V_{max} para a enzima quitotriosidase em plasma de indivíduos homozigotos para doença de Krabbe.....72

Figura IV.16. Determinação do K_m e da V_{max} para a enzima quitotriosidase em plasma de indivíduos homozigotos para gangliosidose GM1.....73

Figura IV.17. Determinação do K_m e da V_{max} para a enzima quitotriosidase em plasma de indivíduos heterozigotos para Doença de Gaucher tipo I.....73

Figura IV.18. Constante de Michaelis (Km) da enzima quitotriosidase em plasma de indivíduos normais, pacientes com gangliosidose GM1, doença de Krabbe, doença de Gaucher tipo I e heterozigotos para doença de Gaucher tipo I. A média e o desvio padrão estão representados nas barras. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ significativamente diferente dos controles (ANOVA de uma via seguido do teste de tukey).....75

Figura IV.19. Perfil de inativação da atividade da enzima quitotriosidase de plasma de indivíduos normais, homozigotos para DG e heterozigotos para DG pelo calor (60 °C) através de pré-incubação por 1 a 25 minutos.....78

Figura IV.20. Perfil de inativação da atividade da enzima quitotriosidase de plasma de indivíduos normais e homozigotos para DK pelo calor (60 °C) através de pré-incubação por 1 a 25 minutos.....79

Figura IV.21. Perfil de inativação da atividade da enzima quitotriosidase de plasma de indivíduos normais e homozigotos para GM1 pelo calor (60 °C) através de pré-incubação por 1 a 25 minutos.....80

X.ANEXOS

ANEXO 1



HCPA

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

SERVIÇO DE GENÉTICA MÉDICA

Termo de consentimento informado

Estudo das propriedades cinéticas da enzima quitotriosidase humana e dos parâmetros pró-inflamatórios interleucina 6 e fator de necrose tumoral alfa em plasma de pacientes com as doenças de gaucher tipo I, Krabbe e Gangliosidose GM1 e de heterozigotos para a doença de Gaucher tipo I: comparação com indivíduos normais

Responsáveis: Alessandro Wajner e Janice Coelho

O presente projeto de pesquisa tem como objetivo estudar a enzima quitotriosidase em indivíduos normais e pacientes com a doença de Krabbe, gangliosidose GM1, doença de Gaucher tipo I e heterozigotos para a doença de Gaucher tipo I, através de estudos bioquímicos visando a produzir informações relevantes sobre a fisiopatologia e variabilidade clínica destas doenças.

O material coletado (10mL de sangue) será utilizado única e exclusivamente para fins deste projeto de pesquisa, sendo garantido o sigilo das informações obtidas, reservando aos pacientes e familiares acesso as mesmas.

Pelo presente termo de consentimento, declaro que fui informado, de forma clara e detalhada, sobre o presente Projeto de pesquisa. Os pesquisadores responsáveis pelo projeto são o farmacêutico-bioquímico Alessandro Wajner e a professora Janice Carneiro Coelho (tel 21018309).

Fui igualmente informado da garantia de receber resposta ou esclarecimento sobre a pesquisa a ser realizada, da liberdade de não participar do estudo, da segurança do sigilo e do caráter confidencial das informações.

Data: _____

Nome do responsável legal: _____

Pesquisador responsável: _____

ANEXO 2

**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) 21018309
fax: 21018010 e-mail: jcoelho@hcpa.ufrgs.br / alessandrow@terra.com.br

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

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 tipo I) | |

ANEXO 3

SERVIÇO DE GENÉTICA MÉDICA HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

LABORATÓRIO DE REFERÊNCIA DE ERROS INATOS DO METABOLISMO

Rua Ramiro Barcelos, 2350 CEP -90035 -903- Porto Alegre- RS - fone (51) 21018309/fax:
21018010 e-mail: janice.coelho@ufrgs.br / alessandrow@terra.com.br

INVESTIGAÇÃO LABORATORIAL DIRIGIDA PARA DOENÇA DE GAUCHER TIPO I, DOENÇA DE KRABBE E GANGLIOSIDOSE GM1

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 via sedex, preferencialmente de segunda a quarta-feira.

Comparison between the biochemical properties of plasma chitotriosidase from normal individuals and from patients with Gaucher disease, GM1-gangliosidosis, Krabbe disease and heterozygotes for Gaucher disease

Alessandro Wajner^{a,b}, Kristiane Michelin^{a,b}, Maira G. Burin^b, Ricardo F. Pires^a,
Maria Luiza S. Pereira^{a,b}, Roberto Giugliani^{b,c}, Janice C. Coelho^{a,b,*}

^a Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS-Brasil

^b Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre – RS-Brasil

^c Departamento de Genética, IB, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS-Brasil

Received 22 August 2006; received in revised form 6 December 2006; accepted 9 December 2006

Available online 8 January 2007

Abstract

Objectives: The aim of the present work was to establish the range of chitotriosidase (CT) activity in normal individuals (controls), patients with Gaucher disease (GD), GM1-gangliosidosis (GM1), Krabbe disease (KD) and heterozygotes for Gaucher disease (HG). The kinetics of the enzyme in the five groups was also investigated.

Design and methods: Plasma CT activity, as well as K_m , V_{max} , optimum pH and thermal stability of the enzyme was determined in plasma of controls, GM1, KD, GD and HG subjects.

Results: CT activity in GD, GM1 and KD patients was, respectively, around 600-fold, 15-fold and 12-fold greater than in normal individuals. There was no significant difference between CT activity in the HG and the control group. We also demonstrated that all CT kinetic parameters evaluated (optimum pH, K_m , V_{max} , thermal stability) in plasma of GD, KD and GM1 patients were significantly different from those of normal individuals. Regarding to thermal stability, our results show that CT activity in the control group was more stable than in the other groups.

Conclusions: Based on the differences found in the biochemical parameters studied, we presume that the parameters analyzed may be useful in the diagnosis of the Lysosomal Storage Diseases.

© 2007 Published by The Canadian Society of Clinical Chemists. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Chitotriosidase; Gaucher disease; GM1-gangliosidosis; Krabbe disease; Enzyme kinetics; Lysosomal storage diseases

Introduction

Chitotriosidase (CT) is a fully active chitinase [1] (EC-3.2.1.14) synthesized by activated macrophages. This human chitinase belongs to the family of 18 glycosyl hydrolase, being an endoglucosaminidase that cleaves and shows transglycosylation activity towards chitin, a polymer of *N*-acetyl-D-glucosamine [2]. Chitin is an essential structural component of the exoskeleton of insects and fungal cell walls [3]. It has been

demonstrated that a mutation in the CT gene, consisting of a duplication of 24 base pairs in exon 10, causes a deficiency of CT activity [4]. CT activity is usually highly increased in plasma of patients with Gaucher disease (GD), which makes it an useful biochemical marker for this disease. A less marked increase in CT activity is also found in GM1-gangliosidosis (GM1), Niemann–Pick disease (NPD) and Krabbe disease (KD) [4].

Studies have shown that CT should be viewed as a component of the innate immunity that may play a role in defense against chitin-containing pathogens [2]. Furthermore, it has been described that prolactin, which is structurally related to several cytokines and is involved in the regulation of monocyte/macrophage functions, up-regulates CT gene expression in human macrophages, suggesting that CT is not only a biochemical

* Corresponding author. Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre-RS, 90035-003 Brazil. Fax: +55 51 2101 8010.

E-mail address: jcoelho@hcpa.ufrgs.br (J.C. Coelho).

marker of macrophage activation in lysosomal diseases and hematological disorders, but also may reflect induction of an immunological response [5].

Other studies show that CT plays a role in the response to the activation of interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide-driven macrophages, suggesting that the production of CT by macrophages could have biological relevance in the immune-response [6]. Furthermore, it was also reported that polymorphonuclear neutrophils (PMNs) and macrophages are a source of chitotriosidase. The enzyme is located in specific granules of human PMNs and secreted following stimulation with granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) [7].

Increased plasma and/or urine CT activity was found in neonates with fungal infections changing in parallel with their clinical condition, showing that CT in urine can be used for monitoring the response of neonates to anti-fungal treatment [1].

CT is also considered as a specific marker of macrophage activation occurring in stroke which directly correlates with stroke severity independently of preexisting inflammatory or infectious conditions [7], and the measurement of its activity is useful to monitor therapy in GD patients. The efficacy of this treatment is checked by the decrease of CT activity [8–11].

We have previously reported biochemical parameters of CT in plasma of patients with GD and with NPD (4). The aim of the present work was to establish and compare the biochemical properties of plasma CT from normal individuals and from patients with KD, GM1, GD and from Gaucher heterozygotes (HG) in order to evaluate their potential utility as a screening tool for the diagnosis of these diseases.

Methods and materials

4-Methylumbelliferyl- β -D-*N,N,N'*-triacylchitotrioside was purchased from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA) and the other reagents were obtained from Merck (Rio de Janeiro, RJ, Brazil).

Samples

Plasma was obtained from peripheral venous blood samples collected with heparin by centrifugation for 10 min at 2000 rpm and was stored at -40°C until enzymatic analysis. Samples from normal individuals were obtained from volunteer blood bank donors. Samples from individuals with GD, KD and GM1 were obtained from patients who were diagnosed at the Medical Genetics Service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Samples from HG were obtained from relatives of patients with GD. The study was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki of the World Medical Association and was approved by the Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre. In this study, we used samples from 29 normal individuals, 27 untreated patients with GD, 9 patients with KD, 19 patients with GM1 and 19 Gaucher heterozygotes. Informed consent was obtained from all subjects who participated in this study.

Enzyme assays

Plasma enzyme activity was determined as described by Hollack et al. [8] using the artificial substrate 4-methylumbelliferyl- β -D-*N,N,N'*-triacylchitotrioside. The enzyme assay mixture contained 5 μL of acidified plasma and 100 μL (26 μM) of the substrate dissolved in 100 mM citrate–200 mM phosphate buffer, pH 5.2, in a total volume of 105 μL . This mixture was incubated for 15 min at 37°C . The reaction was stopped with 1 mL of 0.5 M glycine-sodium hydroxide buffer, pH 10.3, and fluorescence was read with a Hitachi F-2000 spectrofluorometer (excitation and emission wavelengths of 365 and 450 nm, respectively).

For optimum pH determination, we used citrate-phosphate buffer with pH varying from 3.5 to 6.8.

For the determination of the Michaelis–Menten plot (substrate curve), we used final substrate concentrations ranging from 1.25 to 40 μM of 4-methylumbelliferyl- β -D-*N,N,N'*-triacylchitotrioside. We first determined the range of substrate concentrations over which enzyme activity is proportional to substrate concentration. K_m and maximum velocity (V_{max}) were then determined with substrate concentrations of 1.25 to 7.5 μM for samples from GD patients and normal individuals. For patients with KD, we used the same substrate with concentrations varying from 2 μM to 5.5 μM , while for patients with GM1 and HG, we used concentrations varying from 3 μM to 10 μM and 1 μM to 4.5 μM , respectively. The parameters were calculated using the Lineweaver and Burk plot [12] with a correlation coefficient of $r=0.99$ for all curves.

For enzyme thermal stability studies, samples were pre-incubated for 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 and 25 min at 60°C in the absence of the substrate. The reaction was then processed at 37°C for 15 min with 26 μM substrate.

Statistical analysis

Data are reported as mean \pm SD. One-way ANOVA was used to compare means of groups, followed by the Duncan post hoc test when necessary. The analysis was performed using the statistical software package SPSS/PC (SPSS Incorporation) and the level of significance was set at $p < 0.05$.

Results

Plasma CT activity

We first observed that CT activity was much higher in plasma of GD, KD and GM1 patients than in plasma from normal individuals ($p < 0.0001$). However, plasma CT activity in HG and normal individuals (controls) did not differ (Table 1).

Optimum pH determination

Fig. 1 shows the optimum pH functioning for CT activity in plasma of controls, patients with GD, KD, GM1 and Gaucher heterozygotes. The mean optimum pH was 5.18 ± 0.36 (mean \pm

Table 1

Enzyme activity of chitotriosidase in plasma from controls, Gaucher disease patients (GD), GM1-gangliosidosis patients (GM1), Krabbe disease patients (KD) and Gaucher heterozygotes

| Groups | Activity (nmol/h/mL) | Range (nmol/h/mL) |
|---------------------------------------|----------------------------|-------------------|
| Controls (<i>n</i> =29) | 42±28 ^b | 8–106 |
| GD patients (<i>n</i> =27) | 24,600±16,710 ^a | 4540–75,680 |
| KD patients (<i>n</i> =9) | 432±387 ^{a,b} | 72.6–992 |
| GM1 patients (<i>n</i> =20) | 569±313 ^{a,b} | 81.6–967 |
| Gaucher heterozygotes (<i>n</i> =19) | 64±50 ^b | 8–228 |

Results are expressed as mean±standard deviation.

^a *p*<0.0001, statistically different from control group (Duncan multiple range test).

^b *p*<0.0001, statistically different from Gaucher group (Duncan multiple range test).

SD) in normal individuals, whereas in patients with GD, KD, GM1 and HG the mean optimum pH was 4.74±0.34, 5.66±0.54, 5.67±0.26 and 4.6±0.56, respectively. The mean optimum pH of CT in all groups of patients was significantly different from the control group (*p*<0.0001).

K_m and *V_{max}* determination

The *K_m* and *V_{max}* for all groups are shown in Fig. 2 and Table 2, respectively. Patients with KD and HG had a *K_m* of 6.5 μM and 3.8 μM, respectively, which were significantly different from that of the control group (4.9 μM) and significantly lower than those of the GD (20 μM) and GM1 (35 μM) patients. In addition, the latter two groups differed from each other and from the other groups (*p*<0.0001) (Fig. 2).

Table 2 shows that *V_{max}* for the GD group (54,327 nmol/h/mL) was significantly different from that of the other groups (*p*<0.0001). The mean *V_{max}* of CT in the KD group (472 nmol/h/mL) was significantly lower than in the GM1

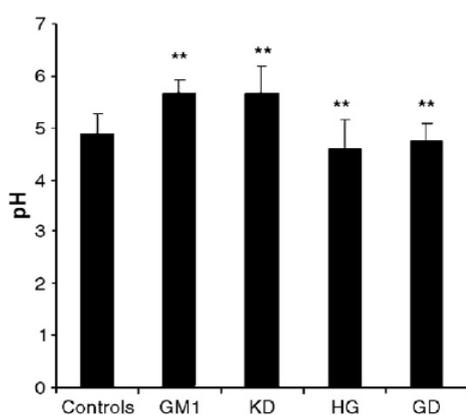


Fig. 1. Optimum pH of chitotriosidase enzyme in plasma of normal individuals, patients with Gaucher disease, Krabbe disease (KD), GM1-gangliosidosis (GM1) and Gaucher heterozygotes (HG). Data are means±SD for 9 to 29 individuals. ***p*<0.01, statistically different from controls (Duncan multiple range test).

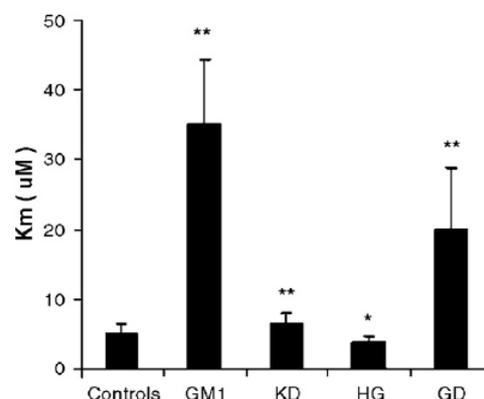


Fig. 2. Michaelis constant (*K_m*) of chitotriosidase enzyme in plasma of normal individuals (controls), patients with Gaucher disease (GD), Krabbe disease (KD), GM1-gangliosidosis (GM1) and Gaucher heterozygotes (HG). Data are means±SD for 9 to 29 individuals. **p*<0.05, ***p*<0.01, statistically different from controls (Duncan multiple range test).

group (1233.10 nmol/h/mL). Furthermore, *V_{max}* from the later two groups was different from that of control group.

Heat stability studies

For heat stability studies, plasma samples were pre-incubated at 60 °C for 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 or 25 min before the addition of the substrate. Fig. 3 compares residual CT activity in normal individuals with that of patients with GD, KD, GM1 and HG. Only times 0, 2, 10, 15 and 25 min are shown in the figure.

We verified that patients with Gaucher and Krabbe Diseases presented significantly inactivation of CT following pre-incubation at 60 °C for 2 min, compared to the control group (*p*<0.0001). CT from GM1 patients was significantly inactivated after 3 min of preincubation at 60 °C (*p*<0.05), while that from HG presented significant enzyme inactivation only after 4 min of preincubation (*p*<0.05). We also identified significant differences in CT activity between the HG group and normal individuals at 10, 15 and 25 min of pre-incubation of CT at 60 °C, a parameter that can be used as a tool for the detection of heterozygotes for GD in a risk population.

Therefore the overall results show that CT activity in the control group was more stable than in the other groups.

Table 2

V_{max} of chitotriosidase in plasma of controls, Gaucher disease patients (GD), GM1-gangliosidosis patients (GM1), Krabbe disease patients (KD) and Gaucher heterozygotes (HG)

| | <i>V_{max}</i> (nmol/h/mL) |
|--------------------------------------|------------------------------------|
| Control group (<i>n</i> =29) | 81.7±59.8 |
| Patients with GD (<i>n</i> =27) | 54,327±30,943 ^a |
| Patients with KD (<i>n</i> =9) | 472±308 ^a |
| Patients with GM1 (<i>n</i> =20) | 1,233±630 ^a |
| Heterozygotes for GD (<i>n</i> =19) | 99±74.3 |

Results are expressed as mean±standard deviation. *V_{max}*: ^a*p*<0.0001, statistically different from the other groups (Duncan multiple range test).

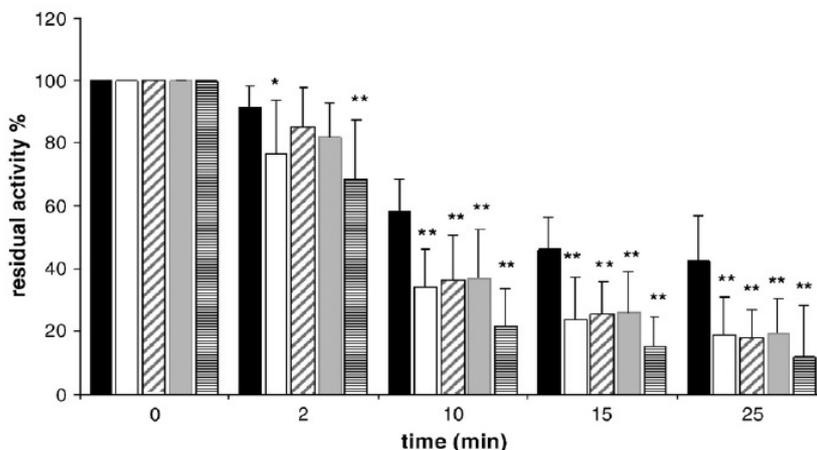


Fig. 3. Thermal stability of chitotriosidase enzyme in plasma of normal individuals (■) patients with Krabbe Disease (□) patients with GM1 disease (▨), Gaucher heterozygotes (▩) and patients with Gaucher disease (▧). Enzymatic activity is reported as percentage of residual activity compared to samples not submitted to pre-incubation (100% activity). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, statistically different from controls (Duncan multiple range test).

Furthermore, patients with GD have a less stable enzyme, as compared with the controls, KD, GM1 and HG groups.

Discussion

Chitotriosidase belongs to the family of 18 glycosyl hydrolase and is an endoglucosaminidase that cleaves and shows transglycosylation activity towards chitin, the linear polymer of *N*-acetyl-D-glucosamine present in coatings of many pathogens such as protozoan parasites, fungi and nematodes. CT is secreted by activated macrophages and probably plays a role in the defense against chitin-containing pathogens, in tissue remodeling and cell migration, and during atherogenesis [13]. In human plasma, CT activity has been proposed as a biochemical marker of macrophage activation in several lysosomal diseases [6].

High CT activity has been demonstrated in several Lysosomal Storage Diseases like Gaucher disease, Niemann–Pick disease, Krabbe disease and GM1-gangliosidosis [11]; however, the causes for this increase are not yet established. Our group has recently evaluated the biochemical properties of CT in plasma from patients with Gaucher disease and Niemann–Pick disease and observed that K_m , V_{max} , thermal stability and optimum pH were significantly different from that of normal individuals [4]. In the present study, we evaluated various biochemical parameters of CT, such as optimum pH, K_m , V_{max} and thermal stability in plasma of patients with Krabbe disease, GM1-gangliosidosis, Gaucher disease and Gaucher heterozygotes. On the other hand, an increase of CT activity can be also observed in plasma and urine of neonates with bacterial infections, although CT properties were not studied in these cases [1].

It was first observed that plasma CT activity was much higher in patients with Gaucher, GM1 and Krabbe disease, as compared to normal individuals, corroborating with previous studies [4,11]. Furthermore, no significant difference in CT activity was observed between controls and the HG group, a fact that discard

the possibility of differentiating normal individuals and heterozygotes for Gaucher disease based only on CT activity.

Our findings evidenced that all CT kinetic parameters evaluated (optimum pH, K_m , V_{max} , thermal stability) in plasma of GD, KD, and GM1 patients were significantly different from those of normal individuals. The optimum pH of CT was significantly different in plasma of all groups of patients (GD, KD and GM1) and in HG, relatively to that of normal individuals. On the other hand, the mean K_m of CT, was significantly higher in GM1 (35 μ M) relatively to the other four groups (GD, HG, KD, control group). Furthermore, the K_m of CT was significantly lower in the control group (4.9 μ M), as compared to GM1 (35 μ M), GD (20 μ M) and KD (6.5 μ M). However, the mean K_m in controls and HG did not differ. Wajner et al. [4] had already demonstrated that the K_m of plasma CT in GD patients was significantly higher than the K_m of normal individuals. Regarding to the V_{max} of CT, we noted that this parameter was much higher in GD, KD and GM1, as compared to controls, whereas it did not differ between HG and the control group. Furthermore, V_{max} was much greater in GD patients (54,327 nmol/h/mL) than in the other groups (GM1–1,233 nmol/h/mL, KD–472 nmol/h/mL, HG–99 nmol/h/mL, Controls–81.7 nmol/h/mL) and differed significantly between GM1 patients and KD patients.

Finally the results on CT thermal stability revealed that, when plasma from the five groups of individuals was pre-incubated at 60 °C for distinct periods, a significantly differential fall in CT activity occurred in these groups. In this context, CT of normal individuals was more stable than from that of the other groups analyzed, corroborating our previous work performed with GD and NPD patients [4]. Furthermore, CT activity in GD patients and in KD patients was more thermo labile than that of normal individuals starting after 2 min of pre-incubation, whereas the residual activity of this enzyme in GM1 patients and in HG individuals was significantly reduced only after 3 and 4 min of pre-incubation, respectively. Finally, a large difference between CT thermal stability from normal and HG individuals was found

after a pre-incubation of 10, 15 and 25 min. This may therefore represent a further potential biochemical marker that could be used to distinguish normal individuals from heterozygotes for Gaucher disease utilizing a simple and fast method.

The mechanisms underlying the distinct CT kinetic properties found in plasma of the various groups of patients and in normal individuals are still obscure. However, a possible explanation for the increased CT activity and/or altered kinetic properties observed in our study could be the differential expression of CT isozymes in patients affected by these lysosomal storage disorders, as compared to the CT isozyme of normal individuals. Although there is no evidence that distinct CT isoforms may lead to different kinetic properties, it must be emphasized that various CT isozymes have been reported in Gaucher disease [14]. In this context, it seems desirable to investigate whether CT isozymes are also present in Niemann–Pick disease, Krabbe disease and GM1-gangliosidosis and thereafter compare the kinetic properties of these isoforms. Regarding specifically to the highly increased CT activity found in these disorders, since these disorders accumulate ceramide containing sphingolipids that are highly immunogenic [15], it may be postulated that macrophage activation with consequent secretion of CT mediating an immunologic response may occur in these pathologies. In this context, van Eijk et al. [16] verified an over-production of CT by macrophages induced by lysosomal accumulation of glycosphingolipids, iron or glycogen, indicating that CT should be viewed as a component of the innate immunity. Furthermore, Ballou et al. [15] observed that ceramide plays an important role in mediating the effects of IFN- γ on monocyte differentiation and thereby serves as a likely modulator of immune function. These authors proposed that signal transduction through sphingomyelin and ceramide can strongly affect the immune response, either directly through cell signaling events, or indirectly through cytokines produced by other cells as a result of signaling through sphingomyelin pathway.

In conclusion, the present study reports differences of plasma CT kinetics that may serve as an important tool to distinguish the various Lysosomal Storage Disease groups analyzed.

Acknowledgments

This work was supported by Genzyme from Brazil, CNPq-PRONEX and GPPG-HCPA.

References

- [1] Labadaridis I, Dimitriou E, Theodorakis M, et al. Chitotriosidase in neonates with fungal and bacterial infections. *Arch Dis Child, Fetal Neonatal Ed* 2005;90:531–2.
- [2] van Eijk M, van Roomen CP, Renkema GH, et al. Characterization of human phagocyte-derived chitotriosidase, a component of innate immunity. *Int Immunol* 2005;17:1505–12.
- [3] Zheng T, Rabach M, Chen NY, et al. Molecular cloning and functional characterization of mouse chitotriosidase. *Gene* 2005;357:37–46.
- [4] Wajner A, Michelin K, Burin MG, et al. Biochemical characterization of chitotriosidase enzyme: comparison between normal individuals and patients with Gaucher and with Niemann–Pick diseases. *Clin Biochem* 2004;37:893–7.
- [5] Di Rosa M, Musumeci M, Scuto A, Musumeci S, Malaguamera L. Effect of interferon-gamma, interleukin-10, lipopolysaccharide and tumour necrosis factor-alpha on chitotriosidase synthesis in human macrophages. *Clin Chem Lab Med* 2005;43:499–502.
- [6] Malaguamera L, Musumeci M, Di Rosa M, Scuto A, Musumeci S. Interferon-gamma, tumour necrosis factor-alpha, and lipopolysaccharide promote chitotriosidase gene expression in human macrophages. *J Clin Lab Anal* 2005;19:128–32.
- [7] Sotgiu S, Barone R, Zanda B. Chitotriosidase in patients with acute ischemic stroke. *Eur Neurol* 2005;54:149–53.
- [8] 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;93:1288–92.
- [9] Czartoryska B, Tylki-Szymanska A, Lugowska A. Changes in serum chitotriosidase activity with cessation of replacement enzyme (cerebrosidase) administration in Gaucher disease. *Clin Biochem* 2000;33:147–9.
- [10] Elstein D, Abrahamov A, Hadas-Halpern I, Ziram A. Withdrawal of enzyme replacement therapy in Gaucher's disease. *Br J Haematol* 2000;110:488–92.
- [11] Guo Y, He W, Boer AM, et al. Elevated plasma chitotriosidase activity in various lysosomal storage disorders. *J Inherit Metab Dis* 1995;18:717–22.
- [12] Lineweaver H, Burk D. The determination of enzyme dissociation constants. *J Am Chem Soc* 1934;56:658–66.
- [13] Ries M, Shaefer E, Lührs T, et al. Critical assessment of chitotriosidase analysis in the rational laboratory diagnosis of children with Gaucher disease and Niemann–Pick disease type A/B and C. *J Inherit Metab Dis* 2006;29:647–52.
- [14] Quintana L, Monasterio A, et al. Identification of chitotriosidase isoforms in plasma of Gaucher disease patients by two dimensional gel electrophoresis. *Biochim Biophys Acta* 2006;1764:1292–8.
- [15] Ballou LR, Laulederkind SJF, Rosloniec EF, Raghov R. Ceramide signalling and the immune response. *Biochim Biophys Acta* 1996;1301:273–87.
- [16] van Eijk M, van Roomen CPAA, Renkema GH, et al. Characterization of human phagocyte-derived chitotriosidase, a component of innate immunity. *Int Immunol* 2005;17:1505–12.