

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**ESTUDO BIOQUÍMICO E MOLECULAR DA QUITOTRIOSIDASE EM PACIENTES COM  
DOENÇA DE GAUCHER TIPO 1 EM MINAS GERAIS**

**ALUNA: Talita Émile Ribeiro Adelino**

**ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eugênia Ribeiro Valadares**

**CO-ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Brunialti Godard**

**Belo Horizonte**

**2012**

**TALITA ÉMILE RIBEIRO ADELINO**

**ESTUDO BIOQUÍMICO E MOLECULAR DA QUITOTRIOSIDASE EM PACIENTES COM  
DOENÇA DE GAUCHER TIPO 1 EM MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Genética.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eugênia Ribeiro Valadares

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Brunialti Godard

**Belo Horizonte**

**2012**

*Dedico este trabalho aos pacientes com Doença de Gaucher, aos meus pais, pelo amor e apoio incondicional, e ao meu irmão, Thales, pelo companheirismo e amizade.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, pela força concedida para superar todos os obstáculos e por me proporcionar a alegria de chegar até aqui.

Aos meus pais, Carlos e Maria José, e ao meu irmão, Thales, meus maiores incentivadores. Agradeço pelo amor incondicional, apoio, dedicação e paciência. Vocês são meu porto seguro! Pai e mãe, a distância foi o meu maior desafio! Agradeço também a todos os familiares: vô e vó, meus exemplos de vida; tios, primos e minha madrinha Aparecida, por todos os momentos felizes.

Agradeço, em especial, ao Prof. Alcino Lázaro da Silva, um exemplo de profissional, por confiar em mim e pelo incentivo inicial para a realização deste sonho.

A minha orientadora e segunda mãe, Prof<sup>a</sup>. Eugênia Ribeiro Valadares, por abrir as portas do seu laboratório em 2007 e, a partir de então, pelas inúmeras tentativas de me incluir no seu grupo de pesquisa. Agradeço também pelas orações, palavras de carinho, amizade, incentivo, confiança, ensinamentos e por me fazer apaixonar pelos Erros Inatos do Metabolismo.

A minha co-orientadora, Prof<sup>a</sup>. Ana Lúcia Brunialti Godard, por me acolher em seu laboratório, pela confiança, apoio, ensinamentos, e por todo o valioso auxílio para o desenvolvimento deste projeto.

Aos membros da banca, por aceitarem o convite.

Aos pacientes com Doença de Gaucher, sem os quais este projeto não teria se tornado possível. Saibam que tudo o que fizemos foi o melhor possível para beneficiá-los e para conseguir retribuir um pouco do carinho concedido durante nossas conversas. Agradeço também aos voluntários que aceitaram participar da pesquisa. Vocês contribuíram muito para a realização desse projeto.

Aos hematologistas do Ambulatório de Hematologia Infantil e de Adultos do Hospital das Clínicas (HC-UFMG), Dr. João Paulo Guimarães, Dr. Sérgio Schusterschitz, Dr<sup>a</sup>. Rachel Fernandes e Dr<sup>a</sup>. Maria Christina Lopes, pelas conversas agradáveis, coleta das amostras dos pacientes e por sempre estarem disponíveis para ajudar.

Aos amigos do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo, Gustavo, Vinícius, Letícia, Bruno, Juliana e Bianca, pela amizade e incentivo. Agradeço também pela enorme ajuda na implantação das técnicas; coleta das amostras, dados clínico-laboratoriais e termos de consentimento dos pacientes. Sem o apoio de vocês, tudo seria mais difícil!!!

A todos os amigos do LGAH - Aretta, Adriana, Carol, Andréa, Júlia, Caroline, Daniel A., Bruno, Daniel B., Laura e Ana Catarina - que dividiram comigo todos os momentos difíceis e as alegrias dessa caminhada. Agradeço pelos momentos descontraídos, conselhos e pela grandiosa ajuda nas técnicas de laboratório.

Ao Prof. Luiz Alberto Cury (Departamento de Física - UFMG), equipe do *Laboratório de Bioquímica y Biología Molecular y Celular* da Universidade de Zaragoza (Espanha) e do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA-RS), pelo auxílio na implantação da técnica de dosagem de quitotriosidase.

A equipe do Laboratório de Biologia Molecular do HC-UFMG, em especial a Prof<sup>a</sup>. Sandra Guerra, Valéria e Nathália, pela disposição em me ajudar. Agradeço também aos amigos do HC, por me incentivarem a seguir em frente.

Ao estaticista Fernando, pela ajuda nas análises estatísticas.

A todos os amigos das repúblicas, de Entre Rios e do mestrado, que estiveram comigo durante todo o tempo. Agradeço pelo carinho, amizade, companheirismo... Vocês tornaram os momentos em Belo Horizonte muito mais fáceis e agradáveis. Obrigada por tudo!

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Genética, pelo aprendizado e auxílios.

A FAPEMIG, pelo apoio financeiro e pela bolsa de mestrado.

## RESUMO

A Doença de Gaucher (DG) é a doença de depósito lisossomal mais comum. Ela é causada pela deficiência da enzima lisossomal glicocerebrosidase, com acúmulo de substrato nos lisossomos de macrófagos, principalmente no fígado, baço e medula óssea, podendo afetar pulmão, rins e sistema nervoso central. O espectro da doença é bastante amplo, mas classicamente são reconhecidos três tipos. A DG tipo 1 ou forma não neuronopática, é a forma mais frequente da doença, com tratamento por terapia de reposição enzimática (TRE) ou por terapia de redução do substrato (TRS). A quitotriosidase (QT), uma quitinase humana, está de 100 a 1.000 vezes mais elevada que o normal em pacientes com DG. A atividade de QT diminui após o início do tratamento (TRE ou TRS) e aumenta quando ele é interrompido. Assim, sua atividade é útil para monitoramento da gravidade da doença e efetividade do tratamento de pacientes com DG. Entretanto, a literatura relata que aproximadamente 6% da população geral é homozigota para uma duplicação de 24 pb no éxon 11 de CHIT1 (dup24) e não produz QT, o que torna seu uso sem valor. Outros 35% da população é heterozigota para a mutação e produz apenas metade da enzima ativa. Dessa forma, para que a QT possa ser utilizada como marcador bioquímico em pacientes com DG, é importante que o genótipo de CHIT1 seja conhecido. Com o objetivo de caracterizar molecular e bioquimicamente a QT nos pacientes com DG tipo 1 em Minas Gerais, uma amostra de 33 pacientes do Hospital das Clínicas da UFMG (HC-UFMG) foi estudada, todos já em tratamento, e comparada com controles normais. A técnica da dosagem enzimática foi realizada conforme descrito por Hollak e colaboradores (1994). A genotipagem dup24 foi realizada por PCR, conforme método proposto por Boot e colaboradores (1998) e os polimorfismos G102S, G354R e A442V em CHIT1 foram analisados por sequenciamento do DNA genômico. De forma geral, a atividade de QT foi 176 vezes mais elevada nos pacientes com DG tipo 1 do que nos indivíduos saudáveis. O resultado da genotipagem revelou que 23 pacientes (70%) são homozigotos normais (wt/wt), 7 (21%) heterozigotos (wt/mut) e 3 (9%) homozigotos para dup24 (mut/mut). Três pacientes com DG tipo 1 apresentaram atividade de QT muito abaixo do esperado e, por isso, foram submetidos à pesquisa de polimorfismos em CHIT1 associados com redução da atividade de QT. Dois pacientes com DG tipo 1 apresentaram um polimorfismo no éxon 4 (G102S) enquanto o outro apresentou duas alterações no éxon 11 (G354R e deleção de 4pb na junção éxon/intron 11). Essa pesquisa foi desenvolvida para atender a necessidade de melhor acompanhamento dos pacientes com DG tipo 1 no HC-UFMG e seus resultados mostram a QT como marcador útil para 82% da população estudada.

## ABSTRACT

Gaucher disease (GD) is the most common lysosomal storage disease. It is caused by deficiency of the enzyme glucocerebrosidase, with accumulation of substrate in the lysosomes of the macrophages, mainly in the liver, spleen and bone marrow, which can affect the lungs, kidneys and central nervous system. The spectrum of disease is broad, but classically three types are recognized. The GD type 1 or non-neuronopathic form, is the most common form of the disease, with possibility of treatment with enzyme replacement therapy (ERT) or substrate reduction therapy (SRT). The chitotriosidase (ChT), a human chitinase, is 100 to 1,000 times higher than normal in patients with GD. The ChT activity decreases after initiation of therapy (ERT or SRT) and increases when it is stopped. Thus, their activity is useful for monitoring disease severity and effectiveness of treatment of patients with GD. However, the literature reports that approximately 6% of the population is homozygous for a duplication of 24 bp in exon 11 of CHIT1 (dup24) and does not produce ChT, which makes this enzyme useless in this case. Another 35% of the population is heterozygous for the mutation and produces only half the active enzyme. Thus, for the ChT can be used as a biochemical marker in patients with GD, it is essential that the CHIT1 genotype is known. In order to characterize molecular and biochemically the ChT in patients with GD type 1 in Minas Gerais state, a sample of 33 patients from *Hospital das Clinicas* (HC-UFGM) was studied, all under treatment, and compared with normal controls. The enzyme measurement assay was implemented and standardized at the Laboratory of Inborn Errors of Metabolism (HC-UFGM) and genotyping, performed at the Laboratory of Animal and Human Genetics (UFGM). In general, the ChT activity was 176 times higher in patients with GD type 1 than in healthy individuals. The result of genotyping revealed that 23 patients (70%) are homozygous normal (wt/wt), 7 (21%) heterozygous (wt/mut) and 3 (9%) were homozygous for dup24 (mut/mut). Three patients showed no correlation between dup24 genotype and ChT activity and, therefore, were tested for polymorphisms in CHIT1. Of these, two showed a polymorphism in exon 4 (G102S) while another had two polymorphisms in exon 11 (G354R and 4 pb deletion at the junction of exon/intron 11). This research was performed due the need for better monitoring of patients with GD type 1 in the HC-UFGM and the results show the ChT as useful marker for 82% of this population.

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pag.</b>
<b>Figura 1:</b> Catabolismo dos esfingolipídios e doenças associadas com deficiências na degradação .....	15
<b>Figura 2:</b> Metabolismo do glicocerebrosídeo .....	16
<b>Figura 3:</b> Desenho esquemático do gene GBA .....	19
<b>Figura 4:</b> Desenho esquemático do gene CHIT1 .....	27
<b>Figura 5:</b> Região da mutação dup24 em CHIT1 .....	29
<b>Figura 6:</b> Resultado do scan para estabelecimento dos comprimentos de onda de excitação e emissão .....	46
<b>Figura 7:</b> Representação da junção éxon/intron 11 do gene CHIT1 .....	79



## LISTA DE TABELAS

	<b>Pag.</b>
<b>Tabela 1</b> - <i>Primers</i> utilizados para análise dos polimorfismos em CHIT1 .....	41
<b>Tabela 2</b> - Atividade de quitotriosidase nos diferentes laboratórios .....	47
<b>Tabela 3</b> - Frequência de dup24 em diversas populações .....	76
<b>Tabela 4</b> - Frequência de dup24 entre os pacientes com Doença de Gaucher de diversas populações .....	77

**LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES**

<b>ITEM</b>	<b>DEFINIÇÃO</b>
DG	Doença de Gaucher
GBA	Gene $\beta$ -glicosidase ácida
GCase	Glicocerebrosidase
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
Kb	Quilobases
kDa	Kilodaltons
mRNA	RNA mensageiro
psGBA	Pseudogene GBA
TER	Terapia de Reposição Enzimática
UI/Kg	Unidades internacionais por quilo de peso
TRS	Terapia de Redução do Substrato
cDNA	DNA complementar
QT	Quitotriosidase
MN	Células mononucleares
PMN	Células polimorfonucleares
Pb	pares de bases
dup24	Duplicação de 24 pares de bases
CHIT1	Gene quitotriosidase
IFN- $\gamma$	Interferon gama
LPS	Lipopolissacarídeo
PCR	do inglês <i>Polimerase Chain Reaction</i> - Reação em Cadeia da Polimerase
IL-10	Interleucina-10
ORF	do inglês <i>Open Reading Frame</i> - Janela aberta de leitura
pI	Ponto isoelétrico
UM	Metilumbeliferil
HC-UFMG	Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
LEIM	Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
mL	Mililitros
RPM	rotações por minute

°C	Grau Celsius
LGAH	Laboratório de Genética Animal e Humana
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
EM	Emissão
EX	Excitação
CV	coeficiente de variação
µl	Microlitros
mM	Milimolar
M	Molar
Nm	Nanômetros
nmol/h/mL	nanomols de substrato hidrolisado por hora por mililitro
Ng	Nanogramas
Pmol	Picomols
µg	Microgramas
mV	Milivolts
µF	Microfarads
RCF	Força Centrífuga Relativa
N	Normal
wt/wt	Homozigoto tipo selvagem para dup24
wt/dup24	Heterozigoto para dup24
dup24/dup24	Homozigoto para dup24

## SUMÁRIO

	Pág.
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>1.2 Doença de Gaucher</b> .....	<b>15</b>
<b>1.2.1 Classificação da doença e fisiopatologia</b> .....	<b>16</b>
<b>1.2.2 Fatores genéticos e moleculares</b> .....	<b>18</b>
<b>1.2.3 Diagnóstico e tratamento</b> .....	<b>20</b>
<b>1.3 Quitotriosidase</b> .....	<b>24</b>
<b>1.3.1 Aspectos genéticos e moleculares</b> .....	<b>26</b>
<b>1.3.2 Quitotriosidase como marcador bioquímico da DG</b> .....	<b>29</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>33</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>35</b>
<b>3.1 Objetivo geral</b> .....	<b>36</b>
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>36</b>
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>37</b>
<b>4.1 Pacientes</b> .....	<b>38</b>
<b>4.2 Grupo controle</b> .....	<b>38</b>
<b>4.3 Amostras e processamento</b> .....	<b>38</b>
<b>4.4 Atividade de quitotriosidase</b> .....	<b>39</b>
<b>4.4.1 Estabelecimento de parâmetros para fluorimetria</b> .....	<b>39</b>
<b>4.4.2 Dosagem da atividade de quitotriosidase</b> .....	<b>39</b>
<b>4.5 Análise moleculares</b> .....	<b>40</b>
<b>4.5.1 Duplicação de 24pb em CHIT1</b> .....	<b>40</b>
<b>4.5.2 Polimorfismos G102S, G354R e A442V em CHIT1</b> .....	<b>41</b>
<b>4.5.2.1 Desenho dos iniciadores</b> .....	<b>41</b>
<b>4.5.2.2 Reação de sequenciamento</b> .....	<b>41</b>
<b>4.5.2.3 Clonagem</b> .....	<b>42</b>
<b>4.5.2.3.1 Análise das amostras</b> .....	<b>43</b>
<b>4.6 Análise estatística</b> .....	<b>44</b>
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>45</b>
<b>5.1 Atividade de quitotriosidase</b> .....	<b>46</b>

<b>5.1.1 Estabelecimento de parâmetros para fluorimetria .....</b>	<b>46</b>
<b>5.2 Artigo - Determination of biochemical and molecular profile of chitotriosidase in patients with Gaucher disease type 1 in Minas Gerais, Brazil: new mutation in CHIT1 gene .....</b>	<b>48</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>73</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>80</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>82</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>94</b>
<b>Apêndice 1 .....</b>	<b>95</b>
<b>Apêndice 2 .....</b>	<b>98</b>

## **INTRODUÇÃO**

## 1.2 Doença de Gaucher

A Doença de Gaucher (DG) é a doença de depósito lisossomal mais comum. Ela é causada por mutações que afetam o gene  $\beta$ -glicosidase ácida (GBA), que codifica a enzima lisossomal  $\beta$ -glicosidase ácida ou glicocerebrosidase (GCCase) (fig.1), responsável pela degradação de glicocerebrosídeo em resíduos de glicose e ceramida (BRADY et al., 1965).

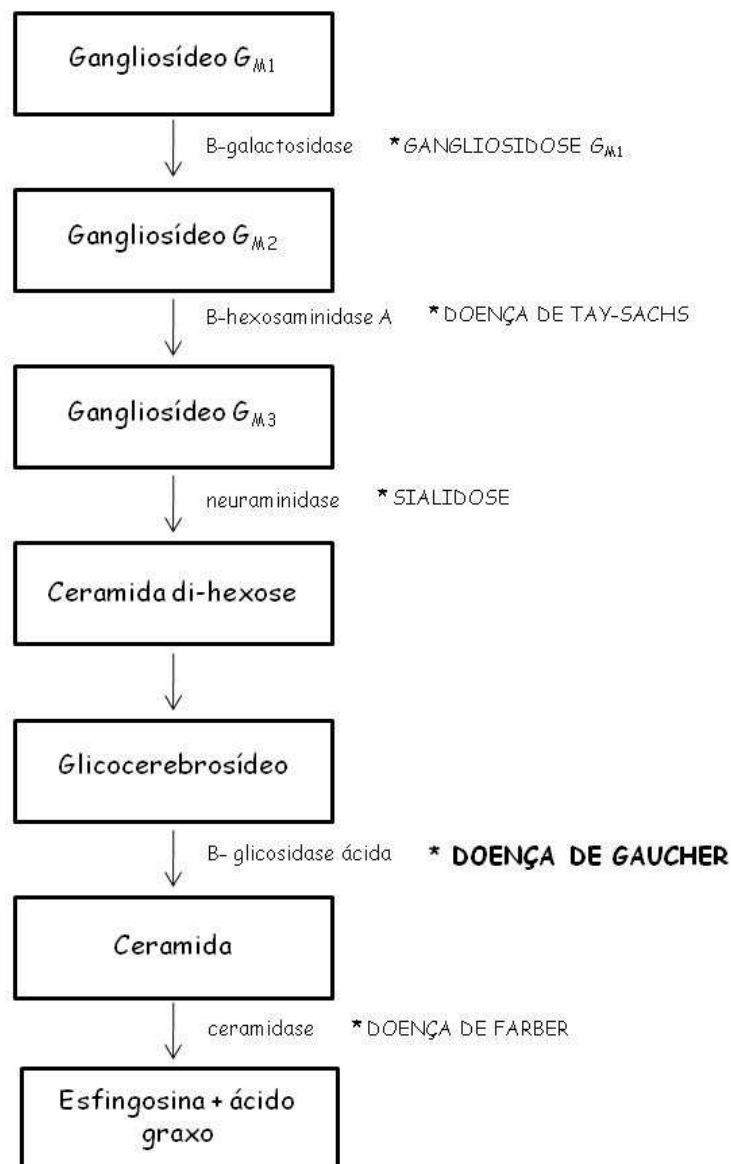


Fig. 1: **Catabolismo dos esfingolípídios e doenças associadas com deficiências na degradação.** A via representa os passos do metabolismo dos esfingolípídios. Os esfingolípídios são representados pelas caixas; a enzima responsável pela etapa e a doença associada são mostradas ao lado das setas.

Fonte: modificado de Glew et al. (1985).

O glicocerebrosídeo é um esfingolípido derivado do catabolismo de hemácias e leucócitos (PARKIN e BRUNNING, 1982 *apud* BUSSINK et al., 2006). Ele é composto pelo aminoálcool esfingosina, ácido graxo e uma molécula de glicose (BRADY, 1997) (fig.2).

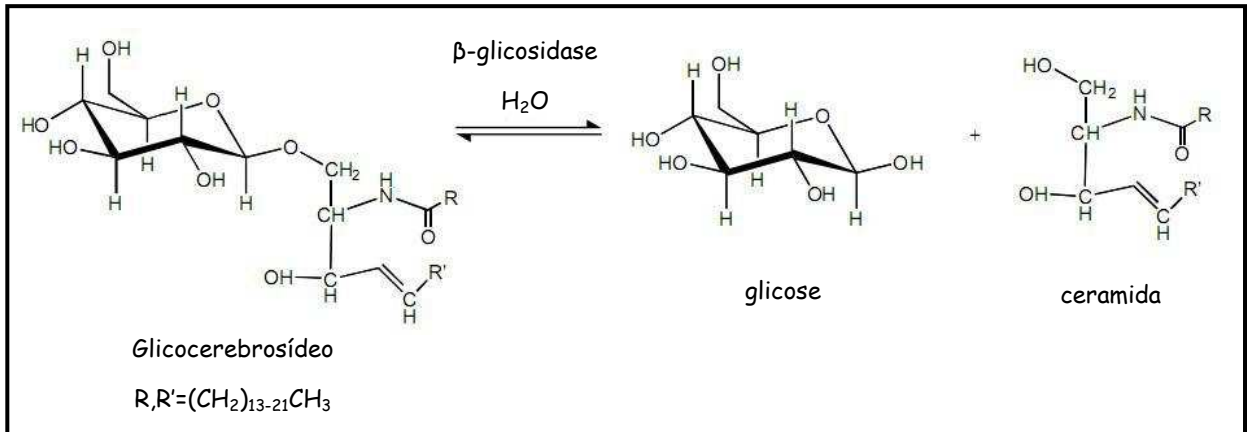


Fig. 2: **Metabolismo do glicocerebrosídeo.** O glicocerebrosídeo é degradado, pela ação da enzima  $\beta$ -glicosidase ácida, em resíduos de glicose e ceramida.

Fonte: modificado de Dvir et al. (2003).

A deficiência da atividade de GCase causa acúmulo de seu substrato nos lisossomos de macrófagos, principalmente no fígado, baço e medula óssea (revisto por GUGGENBUHL et al., 2008). Em casos mais agressivos, pode afetar pulmão, rins e sistema nervoso central (revisto por KRUG, 2007).

As células com acúmulo de depósito lisossômico apresentam núcleo excêntrico e aspecto de “papel amassado” devido à presença maciça de lipídeos em depósito tubular. Tais células são chamadas células de Gaucher e podem ser utilizadas para diagnóstico da doença através de sua visualização em aspirados de medula e biópsia hepática (revisto por BUSSINK et al., 2006 e SIDRANSKY, 2004). Embora apresentem um tamanho anormal, as células de Gaucher não são células inertes. Elas são metabolicamente ativas, com capacidade de produzir e secretar proteínas que podem conduzir os processos fisiopatológicos da doença (BUSSINK et al., 2006).

### 1.2.1 Classificação da doença e fisiopatologia

A DG pode ser dividida em três tipos principais, de acordo com a ausência ou presença e nível de envolvimento neurológico. Apesar de ser monogênica, é bastante



complexa, resultando em uma gama muito grande de fenótipos com múltiplas patologias associadas, que ainda não são totalmente entendidas (MEIKLE et al., 2008).

A DG não-neuronopática ou tipo 1 (MIM 230800) é a forma mais frequente da doença. É caracterizada clinicamente por hepatomegalia, esplenomegalia, citopenia e lesões ósseas. Os sintomas podem ser observados em qualquer idade, mas tipicamente ocorrem após a infância e, em alguns casos, somente se manifesta na idade adulta. Nessa forma, não há sintomas neurológicos (revisto por GOLDBLATT, 1988).

A forma neuronopática aguda ou tipo 2 (MIM 230900) é a forma mais grave da doença, evoluindo para óbito antes dos pacientes completarem dois anos de idade. Tal forma é caracterizada por hepatomegalia, esplenomegalia, regressão do desenvolvimento e comprometimento do crescimento, devido ao acometimento neurológico (revisto por STONE et al., 2000).

O tipo 3 da doença ou forma neuronopática crônica (MIM 231000) é responsável por sintomas semelhantes ao tipo 1 e pode ter envolvimento neurológico limitado. Os pacientes podem apresentar crises convulsivas, ataxia ou demência e geralmente vivem até a segunda ou terceira década de vida (revisto por MARTINS et al., 2009).

Dois variantes raras da DG são conhecidas. Uma delas, chamada forma letal-perinatal, é caracterizada por hepatoesplenomegalia, pancitopenia, hidropsia fetal e icterícia. Os pacientes geralmente têm morte no útero ou dentro de poucos dias após o nascimento (STONE et al., 1999; TAYEBI et al., 1997). A outra forma, também conhecida por forma cardiovascular, é caracterizada por calcificação das válvulas mitral e aórtica (BOHLEGA et al., 2000). Entretanto, os pacientes podem apresentar apraxia oculomotora, opacidade corneana e esplenomegalia leve (GEORGE et al., 2001). Por estes pacientes apresentarem sintomas atípicos da DG e um fenótipo intermediário aos tipos 2 e 3, alguns autores sugerem a existência de um contínuo fenotípico nas formas neuronopáticas da doença (EBLAN et al., 2005; GOKER-ALPAN et al., 2003; SIDRANSKY, 2004).

O envolvimento neurológico nos tipos 2 e 3 da DG é alvo de muitos estudos. Alguns deles demonstraram a presença de altas concentrações de glicosílesfingosina no córtex cerebral e cerebelar de pacientes tipo 2 e 3, não sendo observado, portanto, em pacientes com DG tipo 1. O aumento sugere a participação deste lipídeo na degeneração do sistema nervoso central (NILSSON et al., 1985; NILSSON e SVENNERHOLM, 1982). A composição dos ácidos do glicocerebrosídeo também foi demonstrada ser diferente entre os depósitos do cérebro e dos sistemas periféricos, havendo prevalência de ácido esteárico no sistema nervoso central e ácido palmítico no glicocerebrosídeo de tecidos periféricos. Isto implica em diferentes origens metabólicas ou celulares para o glicolípido, podendo ter alguma relação com a patogênese da doença (GORNATI et al., 2002).

A fisiopatologia da doença também não está completamente esclarecida. Ainda não se sabe como o acúmulo de glicocerebrosídeo nos lisossomos leva à patologia celular e se a função alterada dos macrófagos é responsável por todas as manifestações patológicas observadas nos pacientes ou se mudanças bioquímicas secundárias desencadeadas pelo processo de deposição de glicocerebrosídeo também desempenham algum papel no desenvolvimento patológico (JMOUDIAK e FUTERMAN, 2005). Mizukami e colaboradores (2002) atribuem estes fatos, em grande parte, à ausência de modelos animais viáveis.

Parece claro que a patologia não é causada apenas pela carga de material lipídico depositado no interior dos lisossomos, mas também por um processo de ativação de macrófagos e consequente inflamação tecidual. Altos níveis de interleucina-1 $\beta$ , antagonista do receptor de interleucina-1, interleucina-6, fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e receptor solúvel de interleucina-2 foram encontrados no soro de pacientes com DG (BARAK et al., 1999). Hollak e colaboradores (1997) descreveram também altos níveis do fator estimulador de colônias de macrófagos, interleucina-8 e um marcador de ativação de macrófagos, CD14, em amostras de soro ou plasma destes pacientes. Mizukami e co-autores (2002) observaram que camundongos com deficiência parcial de GCase apresentaram inflamação multissistêmica com infiltração celular em vários órgãos. Estes estudos mostram algumas evidências que reforçam a teoria de ativação de macrófagos e inflamação tecidual na DG.

Outras anormalidades bioquímicas no plasma destes pacientes são o aumento de fosfatase ácida 5b (TUCHMAN et al., 1956 *apud* ROBINSON e GLEW, 1980), enzima conversora de angiotensina (FROISSART, 2006), hexosaminidase e lisozima. Porém, a relação dessas alterações com a patologia da doença ainda não está elucidada. Assim, estudos mais detalhados são necessários para o total entendimento da fisiopatologia da DG.

### **1.2.2 Fatores genéticos e moleculares**

A DG é herdada de forma autossômica recessiva causada por mutações que afetam o gene GBA, situado no cromossomo 1q21 (MIM 606463) (GINNS et al., 1985). O gene GBA possui 11 éxons e corresponde a cerca de 7,6 kb do genoma (HOROWITZ et al., 1987 *apud* ROZENBERG, 2006) (fig.3). Após o processamento e tradução, o gene codifica um polipeptídeo de 497 aminoácidos (TSUJI et al., 1986), contendo cinco sítios de glicosilação (BERG-FUSSMAN et al., 1993) e peso molecular variando de 59 a 67 kDa nos tecidos devido ao remodelamento glicosídico diferencial (BERGMANN e GRABOWSKI, 1989).

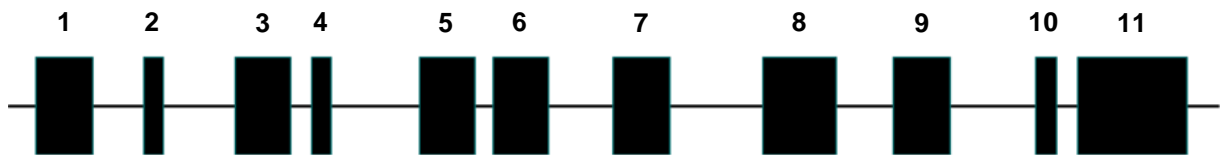


Fig. 3: **Desenho esquemático do gene GBA.** As caixas pretas e os números de 1 a 11 representam os éxons. As retas representam os íntrons.

Fonte: modificada de Beutler et al. (1994).

O gene GBA apresenta um pseudogene não funcional (psGBA), também localizado no cromossomo 1. O psGBA tem 5,7 kb e está localizado a 16 kb *downstream* de GBA, apresentando, por sua vez, 96% de homologia com o gene funcional (WINFIELD et al., 1997; ZIMRAN et al., 1990). É importante ressaltar que a presença de psGBA pode levar à formação de alelos recombinantes, principalmente por conversão gênica e erros de recombinação, como *crossing-over* desigual. Um dos principais alelos recombinantes já descritos é *RecNcil*, que contém as mutações L444P, A456P e V460V (ZIMRAN et al., 1990). A maioria dos pseudogenes já descritos são transcricional e traducionalmente inativos. Entretanto, psGBA apresenta alto nível de transcrição, mas, aparentemente, não leva à produção de GCase ativa (SORGE, 1990).

A maioria das mutações causadoras da DG são mutações de ponto (GRACE et al., 1994). Estas afetam principalmente os éxons 8 e 11. Entretanto, mutações de mudança de matriz de leitura, inserções, deleções, mutações em sítios de *splice* e alelos recombinantes contendo inúmeras mutações já foram descritas (BEUTLER et al., 1994; HRUSKA et al., 2008; SIDRANSKY, 2004; TAYEBI et al., 2003). Tais mutações podem diminuir totalmente ou parcialmente a atividade catalítica da enzima ou reduzir sua estabilidade (GRACE et al., 1994).

Na população de judeus Ashkenazi, onde a DG tem uma frequência significativamente alta, as mutações mais comuns são N370S, 84GG, L444P e IVS2<sup>+1</sup>. Entre pacientes não-judeus, as mutações L444P e N370S são responsáveis por cerca de 60-75% dos casos de DG (GRABOWSKI et al., 1996). Entretanto, a maioria das mutações são raras ou restritas a poucas famílias e estão geralmente presentes em heterozigose composta (BUSSINK et al., 2006; GRACE et al., 1994; SIDRANSKY e GINNS, 1997). Esta condição dificulta a determinação precisa do efeito das substituições de aminoácidos nas propriedades da enzima (GRACE et al., 1994). Atualmente, mais de 300 mutações foram descritas para o gene GBA (MARTINS et al., 2009).

A correlação genótipo-fenótipo é limitada na DG, entretanto algumas mutações são conhecidas por predispor a certos tipos da doença. Já é sabido que a maioria dos pacientes que apresentam a mutação N370S possui formas mais leves da doença, pois ela parece

conferir uma 'proteção' contra as formas neuronopáticas. Isso ocorre porque o alelo N370S expressa quantidade de enzima suficiente para evitar as manifestações neurológicas (BEUTLER, 1992; GRACE et al., 1994; JMOUDIAK e FUTERMAN et al., 1994; KOPRIVICA et al., 2000). Isto sugere que esta mutação cause mudanças relativamente menos drásticas na estrutura e, portanto, na atividade catalítica de GCase (JMOUDIAK e FUTERMAN et al., 1994).

Por outro lado, a mutação L444P, quando não está em heterozigose com uma mutação leve, é altamente associada com as formas mais graves da DG, nas quais as manifestações neurológicas são comuns (GRABOWSKI et al., 1996; JMOUDIAK e FUTERMAN et al., 1994; SIBILLE et al., 1993).

Rozenberg (2006) relata que há uma correlação entre a atividade da enzima deficiente e os três tipos da doença, apesar de tais medidas não serem confiáveis para o prognóstico. Há, ainda, grande sobreposição entre os valores obtidos para indivíduos heterozigotos com aqueles de pacientes e indivíduos saudáveis, por isso, a atividade enzimática não deve ser utilizada para a detecção da heterozigose (BRADY, 1997; RAGHAVAN et al., 1980; ROZENBERG, 2006).

Embora muitos avanços tenham sido obtidos com os estudos de correlação genótipo-fenótipo para a DG, ainda existem questões bastante controversas. Dessa forma, utilizar o genótipo do paciente para determinar o prognóstico, necessidade de tratamento e um aconselhamento genético preciso para a doença ainda é um desafio (SIDRANSKY, 2004).

### **1.2.3 Diagnóstico e tratamento**

O método primeiramente utilizado no diagnóstico da DG foi à pesquisa de células de Gaucher em biópsias de fígado e baço ou aspirados de medula óssea (CHEN e WANG, 2008). Entretanto, células aparentemente similares, chamadas 'células pseudo-Gaucher', podem ser observadas em outras doenças, como leucemia granulocítica crônica (KATTLOVE et al., 1969), mieloma múltiplo (COSTELLO et al., 2006), infecções por *Mycobacterium* (KAHN e PHELPS 1999), dentre outras. Além de não ser um método específico, os estudos histológicos são invasivos, fatos que limitam seu uso no diagnóstico e monitoramento do progresso terapêutico em pacientes com DG (GRABOWSKI et al., 1996).

Atualmente, a maioria dos pacientes é diagnosticada devido às alterações hematológicas e hepatoesplenomegalia. Neste último, o fígado pode atingir um volume de

até 10 vezes maior que o normal, enquanto o baço pode aumentar até 70 vezes (ROZENBERG, 2006).

Diante da suspeita clínica, o diagnóstico da doença é pela medida da atividade total de GCCase em leucócitos, fibroblastos cultivados da pele ou amostras de urina. Indivíduos com DG apresentam de 10 a 30% da atividade normal dessa enzima nos leucócitos. A principal vantagem deste método é que o diagnóstico pode ser estabelecido independentemente da mutação causadora da doença (DE FOST et al., 2003).

O diagnóstico também pode ser realizado por análises moleculares. A vantagem desta análise é a possibilidade de se fornecer algum prognóstico da doença, nos casos onde a mutação apresenta uma correlação com o fenótipo conhecida. Entretanto, o grande número de mutações raras envolvidas torna a dosagem enzimática mais acessível (DE FOST et al., 2003; MICHELIN et al., 2004).

O tratamento da maioria dos pacientes sintomáticos com DG era realizado por administração de analgésicos e transfusões sanguíneas, caracterizando um procedimento de suporte clínico (FERREIRA et al., 2008; MARTINS et al., 2009). Em casos de citopenias e envolvimento esplênico grave, a esplenectomia era um procedimento indicado. Atualmente, é realizada apenas em casos de trombocitopenia grave e organomegalia não responsiva às outras formas de tratamento (JMOUDIAK e FUTERMAN, 2005).

A partir dos anos 90, a terapia de reposição enzimática (TRE) tornou-se possível. A primeira TRE desenvolvida para o tratamento da DG foi realizada por meio de infusões regulares da enzima GCCase purificada da placenta humana (GRABOWSKI et al., 1995). A alglucerase ou Ceredase® (forma comercial da GCCase placentária), produzida pela empresa americana Genzyme, por ser uma enzima nativa, possuía 497 aminoácidos e foi modificada para atingir sítios receptores de manose nos macrófagos e outras células. Tal medida foi realizada uma vez que estudos demonstraram que os macrófagos ligam-se à glicoproteínas ou glicoconjugados sintéticos que apresentam resíduos de manose, N-acetilglicosamina ou glicose terminal em sua cadeia de oligossacarídeos (STAHL et al., 1978).

O tratamento com Ceredase® levou a regressão significativa das manifestações clínicas envolvidas na DG (BARTON et al., 1990; BEUTLER et al., 1991). Entretanto, seu uso foi limitado devido à possibilidade de contaminação da placenta durante sua preparação e do número de placentas disponíveis para a obtenção da enzima. Estima-se que, para cada paciente, seriam necessárias 10 a 12 toneladas de placenta ou cerca de 50.000 por ano como fonte de material para a Ceredase® (GRABOWSKI et al., 1995).

Devido a estas limitações, uma nova técnica utilizando tecnologia do DNA-recombinante foi desenvolvida para obtenção da enzima GCCase. A técnica utiliza células de ovário de Hamster chinês (células CHO) para a produção da enzima recombinante. A enzima, que recebeu o nome comercial de Cerezyme® ou imiglucerase, é uma glicoproteína

monomérica com 497 aminoácidos. A imiglucerase difere da alglucerase por apenas um aminoácido na posição 495, onde a histidina é substituída por arginina (GENZYME, 2010). A imiglucerase também é modificada para apresentar um resíduo terminal de manose na cadeia de oligossacarídeos (GRABOWSKI et al., 1995). A remodelagem da cadeia de oligossacarídeos melhora o endereçamento e a internalização da enzima pelos macrófagos (FUTERMAN e ZIMRAN, 2006 *apud* BRUMSHTEIN et al., 2010).

Outra forma de TRE disponível é a velaglucerase alfa, produzida pela empresa anglo-americana Shire. Sua produção é feita por ativação gênica em uma linhagem celular humana. Esse processo de ativação gênica envolve um evento de recombinação com um promotor que ativa o gene GBA endógeno na linhagem celular humana selecionada. A velaglucerase alfa é secretada como uma glicoproteína monomérica de cerca de 63 kDa com uma sequência de aminoácidos idêntica à enzima nativa, também apresentando resíduos de manose-terminal (ZIMRAN et al., 2007).

A empresa israelense Pfizer também desenvolveu uma enzima recombinante para o tratamento da DG. Esta enzima recebeu o nome de taliglucerase alfa, produzida em células de raiz de cenoura transgênica (AVIEZER et al., 2009). A taliglucerase alfa, assim como a imiglucerase, possui uma mutação no resíduo 495 e, além disso, contém sete resíduos de aminoácidos adicionais na região C-terminal e dois resíduos adicionais na região N-terminal (BRUMSHTEIN et al., 2010).

A dose eficaz no tratamento da DG com TRE deve ser ajustada individualmente pelo médico, de acordo com o quadro clínico e a resposta ao tratamento. A dose varia geralmente de 15 a 60 UI/Kg de peso, aplicada via endovenosa a cada duas semanas (MARTINS et al., 2009). Vários estudos têm sido realizados mostrando que a TRE melhora significativamente as manifestações clínicas associadas à DG e, além disso, contribui para a qualidade de vida dos pacientes (BRUNEL-GUITTON et al., 2009; COX-BRINKMAN et al., 2008; WEINREB et al., 2002). Entretanto, ela não impede a progressão das manifestações neurológicas, por não ser capaz de atravessar a barreira hemato-encefálica. Dessa forma, sua aplicação, até o momento, está restrita ao tratamento de pacientes com DG tipo 1 ou 3.

Por se tratar de uma terapia bastante onerosa, o acompanhamento da resposta ao tratamento é de fundamental importância para se avaliar corretamente a dose eficaz mínima da enzima para cada paciente. A medicação é adquirida por meio de processo centralizado no Ministério da Saúde.

Atualmente, uma nova terapia tem sido desenvolvida para o tratamento de doenças de depósito lisossomal. A terapia de redução do substrato (TRS) para a DG é baseada no princípio da redução da quantidade de glicocerebrosídeo depositado nos lisossomos ao invés de reposição da enzima responsável pela degradação (BECK, 2010).

O açúcar n-butildeoxinojirimicina (Zavesca® ou miglustat) tem a propriedade de inibir a enzima ceramida glicosiltransferase, que sintetiza glicocerebrosídeo. Dessa forma, a síntese do elemento de depósito da DG é inibida (PLATT et al., 1994). O tratamento é realizado por administração oral da medicação (300mg/dia), o que elimina a necessidade de infusões quinzenais. A TRS é indicada para pacientes com manifestações clínicas de leve a moderada da doença, para os quais a TRE não é indicada (BECK, 2010; WEINREB et al., 2005). Devido ao seu pequeno tamanho, o açúcar n-butildeoxinojirimicina é capaz de cruzar a barreira hemato-encefálica e assim, apresenta potencial para o tratamento das formas neuronopáticas da DG (ALFONSO et al., 2005).

A TRS é eficaz quando o paciente apresenta algum nível de atividade de GCCase *in vivo*. Entretanto, se nenhuma hidrólise existe, a TRS irá apenas retardar o processo de acúmulo de glicocerebrosídeo nos lisossomos (TYLKI-SZYMANSKA et al., 2007).

As chaperonas químicas também são opções terapêuticas que estão sob investigação para várias doenças de depósito lisossomal, incluindo a DG. Elas recebem este nome por serem moléculas de baixo peso molecular que mimetizam a ação de chaperonas, importantes moléculas envolvidas no dobramento e função apropriada das proteínas (ALFONSO et al., 2005). Elas são capazes de estabilizar a enzima deficiente e permitir sua transferência do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi e, então, para o lisossomo (GUGGENBUHL et al., 2008). Alguns estudos mostraram que as chaperonas químicas aumentam a atividade residual da GCCase mutada, tendo, portanto, papel promissor no tratamento de pacientes com DG (ALFONSO et al., 2005; SAWKAR et al., 2002).

Outras formas de tratamento promissoras estão em desenvolvimento, como o transplante de células-tronco e a terapia gênica. O primeiro tem obtido sucesso em alguns pacientes, com reversão da deficiência enzimática, regressão das visceromegalias e melhora no quadro geral de saúde. Entretanto, é um procedimento de alto risco com complicações graves e geralmente não é recomendado para pacientes com quadros leves da doença (BARRANGER et al., 1997; DE FOST et al., 2003; GRABOWSKI et al., 1996).

A terapia gênica, por sua vez, tem obtido alguns resultados satisfatórios. Hong e colaboradores (2004), por exemplo, transfectaram um vetor viral contendo o cDNA da GCCase humana em fibroblastos provenientes de pacientes com DG. A atividade de GCCase nestes fibroblastos teve um aumento significativo e foi mantida por mais de 20 semanas. Entretanto, a transfecção destes vetores em células hematopoiéticas tem se mostrado uma tarefa difícil. Além disso, a expressão constitutiva da enzima ainda não foi alcançada, pois, aparentemente, as células transfectadas não apresentam nenhuma vantagem proliferativa sobre as células Gaucher (HUGHES e PASTORES, 2010). Assim, a probabilidade da

terapia gênica tornar-se uma opção terapêutica para a DG num futuro próximo ainda é muito pequena (JMOUDIAK e FUTERMAN, 2005).

### 1.3 Quitotriosidase

A quitotriosidase (QT) foi descrita pela primeira vez no ano de 1994, por um grupo de pesquisadores da Holanda (HOLLAK et al., 1994). A QT pertence à família das quitinases, um grupo de enzimas que apresentam capacidade de hidrolisar quitina (RENKEMA et al., 1995). A quitina, por sua vez, é um glicopolímero de N-acetil glicosamina que faz parte da composição estrutural de muitas espécies, tais como fungos, nematódeos parasitários, protozoários, insetos e crustáceos (LEE et al., 2007).

Durante muitos anos se pensou que mamíferos eram incapazes de sintetizar endoglicosaminidases que fragmentassem quitina (AGUILERA et al., 2003; RENKEMA et al., 1995). Todas as quitinases deste grupo descritas até o momento não apresentam capacidade quitinolítica, devido à ausência de aminoácidos críticos em seu sítio catalítico. Assim, a função destas enzimas ainda é desconhecida (BOOT et al., 1995; RENKEMA et al., 1995; RENKEMA et al., 1998). A QT humana, por sua vez, é a primeira enzima com essa capacidade descoberta em mamíferos.

A clonagem do cDNA correspondente e a identificação da sequência de aminoácidos da região interna e N-terminal da QT mostraram que a enzima é um análogo humano da família 18 das quitinases. Essa família também inclui quitinases presentes em organismos não-mamíferos, tais como bactérias, nematódeos, fungos, plantas e insetos. Devido a sua capacidade quitinolítica, foi proposto que a QT humana é mais proximamente relacionada à quitinases dessas espécies do que a aquelas já descritas em mamíferos (BOOT et al., 1995; RENKEMA et al., 1995).

Devido a sua descoberta relativamente recente, vários estudos foram realizados com o objetivo de caracterizar melhor essa enzima quanto a sua origem e função. Bouzas e colaboradores (2003) estudaram a atividade de QT em amostras de plasma, lisados de células mononucleares (MN) e polimorfonucleares (PMN) de indivíduos saudáveis. Os autores observaram que a atividade da enzima foi significativamente maior nas células PMN do que nas demais amostras avaliadas. Além disso, alta correlação entre a atividade de QT em plasma e em células PMN foi observada, sugerindo que a QT plasmática em indivíduos saudáveis pode ser, pelo menos em parte, devido à secreção da enzima pelas células PMN circulantes.



Os dados acima foram corroborados pelo estudo conduzido por van Eijk e colaboradores (2005). Eles avaliaram a atividade de QT e níveis da proteína em sangue total, células PMN e células MN de indivíduos saudáveis e observaram que a principal fonte da enzima são as células PMN, apesar dos macrófagos também produzirem QT. Além disso, a expressão e liberação de QT dos grânulos ocorrem após estímulos específicos pelas células PMN.

Em certas condições patológicas, tais como a DG, os macrófagos produzem e secretam QT, gerando um aumento significativo nos níveis séricos da enzima. Quando isolados do sangue periférico e cultivados *ex vivo*, os monócitos sofrem diferenciação espontânea em macrófagos ativados (RENKEMA et al., 1997). Diante disso, Hollak e colaboradores (1994) estudaram a produção e secreção da enzima durante a diferenciação de monócitos em macrófagos de pacientes com DG tipo 1. Eles observaram que nos primeiros cinco dias de cultura, a atividade de QT foi ausente. Porém, após a diferenciação morfológica dos monócitos em macrófagos, a QT passou a ser produzida e secretada em quantidades significantes. Estes dados foram reproduzidos um ano mais tarde, num estudo conduzido por Boot e colaboradores (1995), os quais avaliaram a expressão do mRNA da enzima em uma cultura de monócitos. Os pesquisadores observaram, através de análises de *Northern blot*, que somente após o sétimo dia de cultura o mRNA pôde ser detectado.

A função de QT ainda não está completamente entendida, mas existem dados sugestivos do possível papel na defesa contra patógenos contendo quitina e na resposta imune do hospedeiro. Choi e colaboradores (2001) estudaram a influência de polimorfismos genéticos na susceptibilidade a infecção com *Wuchereria bancrofti* em populações residentes de áreas endêmicas. Este nematódeo, um dos agentes etiológicos da filaríase linfática, dá origem a microfilárias que são circundadas por uma membrana contendo quitina em sua composição, tornando-se assim, um possível alvo para a QT. Neste estudo, os autores observaram que indivíduos homozigotos para uma duplicação de 24 pb (dup24) no gene CHIT1 são mais susceptíveis a infecção com *W. bancrofti* do que indivíduos com o genótipo selvagem. O alelo dup24, por sua vez, codifica uma proteína inativa que, aparentemente, tem importante consequência para a infecção filarial humana.

van Eijk e colaboradores (2005) mostraram que QT foi capaz de inibir o crescimento de *Cryptococcus neoformans*, causar lise do ápice das hifas de *Mucor rouxii* e impedir a transição da forma de levedura para a forma de hifa em *Candida albicans*. Além disso, ao administrar QT humana recombinante em modelos de camundongos neutropênicos de candidíase e aspergilose sistêmicas, observaram que a taxa de sobrevivência dos animais melhorou expressivamente. Gordon-Thomson e colaboradores (2009) também verificaram a inibição do crescimento de *Aspergillus niger*, *C. albicans* e *C. neoformans* quando exposto à QT humana recombinante. Além disso, camundongos modelo de criptococose mostraram

um aumento da longevidade quando tratados com QT humana recombinante em comparação com animais controle.

Di Luca e colaboradores (2007) estudaram o papel da QT na infecção de *Plasmodium falciparum* no mosquito *Anopheles*. Eles observaram que mosquitos alimentados com sangue de pacientes com DG ou sangue com adição de quitinase comercial de *P. falciparum* tem a formação da membrana peritrófica prejudicada. Esta membrana, composta por quitina e proteínas, entre muitas outras funções, impede a invasão de *P. falciparum* ao intestino do mosquito. Dessa forma, o dano causado à membrana permite que o patógeno complete seu ciclo de vida no vetor, contribuindo assim, para a manutenção da malária. Todos estes estudos reforçam a importância da enzima na degradação de quitina e conseqüentemente, na defesa contra patógenos.

Malaguarnera e colaboradores (2005) e Di Rosa e colaboradores (2005) estudaram, de forma independente, o efeito de interferon gama (IFN- $\gamma$ ), lipopolissacarídeo (LPS), TNF- $\alpha$  na síntese da QT por macrófagos humanos. É sabido que macrófagos tratados com IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e LPS apresentam capacidade citocida frente a microorganismos unicelulares. Os pesquisadores observaram, através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real, que macrófagos estimulados com IFN- $\gamma$ , LPS e TNF- $\alpha$  tiveram um aumento da expressão do gene CHIT1 e da atividade da enzima. O estudo de Di Rosa e colaboradores (2005), adicionalmente, verificou o papel da interleucina 10 (IL-10), um importante supressor das funções efetoras dos macrófagos. Eles observaram que macrófagos estimulados com IL-10 tiveram tanto a expressão gênica quanto a atividade da enzima suprimidas.

Em adição, Malaguarnera e colaboradores (2004) demonstraram o papel da prolactina na expressão gênica de CHIT1 em macrófagos humanos. A prolactina, um hormônio secretado pela glândula pituitária, modula a expressão de genes cruciais para a função dos leucócitos, mostrando-se um importante fator na resposta imune. Neste estudo, os autores observaram que macrófagos expostos *in vitro* a prolactina apresentam níveis elevados de atividade de QT e do seu mRNA.

Tais dados sugerem que a QT, além de ser um importante marcador de ativação de macrófagos, pode estar envolvida na resposta imune celular, tendo, assim, papel crucial para os hospedeiros.

### **1.3.1 Aspectos moleculares e genéticos**

O gene da QT, CHIT1, está localizado no cromossomo 1q31-q32 (BOOT et al., 1998; EIBERG e DEN TANDT, 1997). Boot e colaboradores (1998) identificaram a presença de 12

éxons, com tamanho variando de 30 a 461 pb. Entretanto, atualmente é considerado um gene com 13 éxons e tamanhos variando de 30 a 1.055 pb (NG\_012867.1, *National Center for Biotechnology Information* - NCBI, 2012).



Fig. 4: **Desenho esquemático do gene CHIT1.** As caixas pretas representam os éxon de 1 a 13.

Fonte: NCBI (2012), NG\_012867.1.

A clonagem do cDNA de CHIT1 revelou uma *open reading frame* (ORF) de 1.398 pb. Tal ORF codifica uma proteína com um peptídeo sinal de 21 aminoácidos, que após ser removido, gera uma proteína com 445 aminoácidos (BOOT et al., 1995; NCBI, 2012; NP\_003456.1).

A QT é heterogênea no que diz respeito à massa molecular e ponto isoelétrico (pI). Duas isoformas da enzima são conhecidas em humanos, uma de 39 kDa e pI de 8,0 e outra de 50 kDa e pI de 6,5 a 7,2. Entretanto, a sequência de aminoácidos da região N-terminal das duas isoformas são idênticas, sugerindo que modificações pós-traducionais podem contribuir para a ocorrência de isoformas distintas de QT (RENKEMA et al., 1995; RENKEMA et al., 1997).

A QT é inicialmente sintetizada como uma proteína de 50 kDa e, apesar de grande parte ser secretada, uma proporção significativa é direcionada aos lisossomos, onde é proteoliticamente degradada à isoforma de 39 kDa. Essa isoforma apresenta atividade catalítica, entretanto, somente a isoforma de 50 kDa é capaz de se ligar a partículas de quitina, sugerindo que o sítio de interação a quitina está presente no domínio C-terminal de 11 kDa que é removido no processamento proteolítico de QT. Foi especulado ainda que a presença deste domínio na região C-terminal da isoforma de 50 kDa aumenta a degradação e afinidade pelo substrato. Assim, sua presença na isoforma de 39 kDa não seria necessária, pois ela está em contato mais próximo com o substrato no interior dos lisossomos (RENKEMA et al., 1997).

Assim como observado para outras quitinases, a QT humana apresenta glicosilação *O-linked*. A heterogeneidade dos valores de pI observados para a isoforma de 50 kDa é um exemplo da ocorrência de modificações pós-traducionais. Essa diferença foi atribuída a graus variáveis de ácido siálico nas cadeias de oligossacarídeos (RENKEMA et al., 1997; QUINTANA et al., 2006).

Uma terceira isoforma, de 40 kDa, foi descrita em alguns indivíduos. As células desses indivíduos apresentavam, após pouco tempo de cultura, pequenas quantidades

dessa isoforma. Essa, por sua vez, é resultante de um processo de *splicing* alternativo do pré-mRNA, gerando um mRNA que codifica uma proteína de 40 kDa truncada na região C-terminal (RENKEMA et al., 1997). Segundo Boot e colaboradores (1998), o sítio de *splicing* alternativo está presente no éxon 12 de CHIT1. Quando este éxon é mantido no mRNA é codificada a isoforma de 50 kDa e quando ele é removido, um *stop codon* prematuro é introduzido, gerando a isoforma de 40 kDa, quase idêntica a isoforma de 39 kDa (BOOT et al., 1998).

Ao contrário dos estudos anteriores, Quintana e colaboradores (2006), utilizando eletroforese bidimensional, identificaram cinco isoformas de QT em plasma de pacientes com DG tipo 1, as quais foram chamadas de QT1-QT5. Entretanto, nenhuma dessas isoformas foi identificada no plasma de indivíduos controle. Os autores encontraram valores de 52 kDa para as isoformas QT1 e QT4, 51 kDa para a isoforma QT2 e 50 kDa para as isoformas QT3 e QT5. Os valores estimados de pI para as cinco isoformas variaram de 6 a 6,5. Os autores atribuíram que a divergência encontrada nos valores de pI pode ser causada por diferentes tecnologias utilizadas para o estudo da proteína. Quanto ao peso molecular, glicosilação heterogênea e deglicosilação espontânea no plasma podem ser responsáveis pelas diferenças observadas. Diante desses resultados controversos, mais estudos são necessários para identificar precisamente as isoformas de QT e suas diferenças (QUINTANA et al., 2006).

Hollak e colaboradores (1994) observaram que alguns pacientes com DG e indivíduos controle apresentavam completa ausência da atividade de QT. Além disso, um dos pais de um paciente com deficiência de QT também não apresentava atividade da enzima, sugerindo uma natureza familiar para a deficiência.

Mais tarde essa deficiência foi caracterizada. Trata-se de uma duplicação de 24 pb no éxon 11 de CHIT1 (fig. 5), resultando na ativação de um sítio de *splicing* alternativo em 3'. Esse processo dá origem a um mRNA mais curto com uma deleção de 87 nucleotídeos. O mRNA curto codifica uma proteína que não apresenta os aminoácidos 344 a 372, caracterizando um trecho de 29 aminoácidos, que por sua vez, são importantes para o dobramento adequado da proteína (BOOT et al., 1998, FUSETTI et al., 2002). Além disso, o resíduo de triptofano na posição 358 (Trp-358) é altamente conservado em todas as quitinases e parece ser importante para a conformação da enzima durante a hidrólise do seu substrato. Sendo assim, a deleção desses aminoácidos leva a formação de uma enzima completamente inativa (FUSETTI et al., 2002).

```

tccccctccctgcacagGTCAGCTATCTGAAGCAGAGGGACTGGGCGGGGCCATGGT
CTGGGCACTGGACTTAGATGACTTTGCCGGCTTCTCC TGCAACCAGGGCCGATACCC
CCTCATCCAGACGCTACGGCAGGAAGTGAgtagtaagggggccagggccagtggg

```

Fig. 5: **Região da mutação dup24 em CHIT1**. As letras minúsculas representam os íntrons e as letras maiúsculas, o éxon. A região destacada em cinza representa os 24 pb duplicados. O nucleotídeo G, destacado em vermelho, corresponde ao polimorfismo G354R (G>A, rs9943208). As regiões destacadas em amarelo correspondem aos *primers forward* e *reverse* para identificação de dup24. O dinucleotídeo AG, destacado em verde, representa o sítio de *splicing* críptico.

Fonte: NCBI (2012), NG\_012867.1.

Estima-se que um em cada três indivíduos de diversos grupos étnicos apresenta um gene de QT anormal com dup24. Aproximadamente 6% da população geral é homocigota para esta mutação, apresentando ausência total da atividade de QT, enquanto 33-35% da população é heterocigota para a mutação (BOOT et al., 1998).

Um estudo realizado por Rodrigues e colaboradores (2010) com 122 brasileiros voluntários saudáveis mostrou que 59 indivíduos (48%) apresentaram genótipo normal (wt/wt), 52 indivíduos (43%) foram heterocigotos (wt/dup24) e 11 indivíduos (9%) foram homocigotos para a mutação (dup24/dup24). Rodrigues e co-autores (2004) avaliaram a frequência da mutação na população portuguesa e observaram que 37% dos indivíduos pesquisados foram wt/dup24 e aproximadamente 3% foram dup24/dup24 para a mutação.

### 1.3.2 Quitotriosidase como marcador bioquímico da DG

A limitada correlação genótipo-fenótipo na DG estimulou a busca por marcadores bioquímicos secundários que possam fornecer informações úteis sobre a gravidade da doença em cada paciente (GRACE et al., 2007). Deegan e colaboradores (2005) destacam que para que um biomarcador seja ideal ele deve estar bastante elevado na doença e não apresentar sobreposição dos resultados entre pacientes não tratados e indivíduos saudáveis. Este marcador deve, ainda, refletir a gravidade da doença e sua concentração ou atividade deve ser modificada em resposta ao tratamento e a clínica dos pacientes.

Neste sentido, vários marcadores bioquímicos foram utilizados para a DG, como a fosfatase ácida 5b (TUCHMAN et al., 1956 *apud* ROBINSON e GLEW, 1980), enzima conversora de angiotensina (FROISSART, 2006), hexosaminidase e lisozima. Entretanto, tais marcadores são pouco sensíveis e apenas moderadamente aumentados quando

comparados com indivíduos saudáveis (HOLLAK et al., 2001). Entre as anormalidades bioquímicas observadas em pacientes com DG, a mais notável é a elevada atividade de QT.

Foi demonstrado que a atividade plasmática de QT está significativamente elevada em pacientes com DG tipo 1 (HOLLAK et al., 1994). As amostras de soro ou plasma destes pacientes apresentaram capacidade de 100 a 1.000 vezes mais elevada de hidrolisar 4-metilumbeliferil(4-MU)-quitotriosídeo, um substrato artificial da enzima (AGUILERA et al., 2003; HOLLAK et al., 1994). Além disso, a atividade da enzima diminui após o início do tratamento (TRE ou TRS) e aumenta quando ele é interrompido. Assim, sua atividade é útil para monitoramento da gravidade da doença e efetividade do tratamento de pacientes com DG (COX et al., 2000; HOLLAK et al., 1994; HOLLAK et al., 2001; MISTRY e ABRAHAMOV, 1997). Por ser secretada por macrófagos contendo depósito de lipídeos nos lisossomos, a QT é também utilizada para monitorar a carga de células de Gaucher nos pacientes (BUSSINK et al., 2006).

No ano de 2004, o *International Collaborative Gaucher Group (ICGG)* recomendou formalmente a inclusão da QT como biomarcador para avaliação destes pacientes (BUSSINK et al., 2009). Atualmente, é indicado que a dosagem de QT seja realizada a cada três ou seis meses ou quando o paciente demonstrar agravamento dos sintomas clínicos (CABRERA-SALAZAR et al., 2004)

O conhecimento da atividade de QT permite que seja traçado um perfil para cada paciente, que por sua vez, pode ser utilizado pelos médicos para estabelecer um regime de dosagem ótimo na intervenção terapêutica. Bussink e colaboradores (2006) e Hollak e co-autores (2001) destacam que a atividade de QT direciona o médico no início do tratamento e que uma redução de menos de 15% na sua atividade após um ano deve ser um fator importante para se considerar um aumento da dose da medicação. Os autores destacam ainda que qualquer alteração da QT durante o tratamento deve alertar o médico para a possibilidade de agravamento do estado de saúde do paciente. O uso da QT para estes propósitos levou a uma melhora dos cuidados clínicos aos pacientes e redução considerável dos custos associados ao tratamento (SCHOONHOVEN et al., 2007; VELLODI et al., 2005).

Apesar de estar elevada e ser utilizada para monitoramento dos pacientes, a QT não é específica para a DG. Um aumento da atividade da enzima foi registrado em várias outras patologias, tais como Doença de Niemann-Pick (BRINKMAN et al., 2005), gangliosidose GM1 (MALAGUARNERA, 2006),  $\beta$ -talassemia (BARONE et al., 1999), sarcoidose (BOOT et al., 2010), malária (BARONE et al., 2003), aterosclerose (ARTIEDA et al., 2003; BOOT et al., 1999), infecções fúngicas e bacterianas (IYER et al., 2009; LABADARIDIS et al., 1998). Entretanto, tais doenças apresentam atividade de QT pouco aumentada quando comparada com a atividade de pacientes com DG.

O uso da QT como marcador bioquímico para DG apresenta algumas limitações, o que torna sua determinação e interpretação dificultadas. Uma desvantagem envolve a presença de dup24 no gene CHIT1. Indivíduos homocigotos para esta alteração não produzem enzima ativa e não podem ser monitorados quanto à sua presença no plasma. Por outro lado, indivíduos heterocigotos produzem apenas metade da enzima ativa, o que pode levar a uma subestimação da gravidade da doença (BUSSINK et al., 2009). Uma vez que aproximadamente 6% e 35% da população geral é homocigota e heterocigota para dup24, respectivamente, a identificação do genótipo de cada paciente é fundamental para a interpretação da atividade de QT bem como para a interpretação das subseqüentes variações em resposta ao tratamento (GRACE et al., 2007).

Algumas outras alterações no gene CHIT1 também foram caracterizadas. G354R, no éxon 11, representa uma transição de guanina para adenina na posição 1.060 do cDNA com consequente substituição de glicina para arginina na posição 354 do polipeptídeo (c.1.060G>A; p.G354R; rs9943208). A442V, no éxon 13, representa uma transição de citosina para timina na posição 1.325 do cDNA levando a uma substituição de alanina para valina na posição 442 do polipeptídeo (c.1.325C>T; p.A442V; rs1065761). Estes dois polimorfismos estão associados à baixa atividade de QT (GRACE et al., 2007; LEE et al., 2007).

Adicionalmente, Grace e colaboradores (2007) descreveram a presença de outros polimorfismos em CHIT1 que apresentam associação com a redução da atividade de QT, tais como o alelo complexo E/I-10, que compreende três mutações: G354R, L385L e uma deleção de 4 pb no íntron 11; e o G102S (transição de guanina para adenina no códon 102 do éxon 4, c.304G>A; p.G102S; rs2297950). Este último apresentou uma frequência relativamente alta (em torno de 30%), tanto em pacientes com DG quanto nos controles. Embora Grace e colaboradores (2007) tenham registrado uma redução na atividade de QT em amostras de indivíduos portadores do polimorfismo G102S, isto não foi observado no estudo de Lee e colaboradores (2007), fazendo com que seu papel ainda não seja completamente entendido.

Outra limitação acerca da dosagem enzimática é a utilização de 4-MU-quitotriosídeo como substrato para a QT. Um estudo realizado por Aguilera e colaboradores (2003) mostrou a existência de aparente inibição do substrato, devido à atividade de transglicosilação da enzima. Em concentrações saturantes de 4-MU-quitotriosídeo, a QT não apenas cliva as moléculas do substrato e concomitantemente libera 4-MU fluorescente, mas também transfere quito-oligômeros para as moléculas de substrato. Esse processo de transglicosilação resulta na formação de 4-MU-quito-oligômeros e prejudica a liberação de 4-MU fluorescente. Dessa forma, quando são utilizadas altas concentrações dos substratos,

a formação de 4-MU fluorescente não é proporcional à concentração da enzima e sua atividade pode ser subestimada (AGUILERA et al., 2003).

Para superar esta limitação, usa-se uma concentração subsaturante do substrato 4-MU-quitotriosídeo. Como opção, pode-se utilizar um substrato desenvolvido recentemente, chamado 4-MU-deoxiquitobiosídeo. Esse substrato é somente hidrolisado e não pode agir como um acceptor na transglicosilação, aumentando a sensibilidade e reprodutibilidade da técnica (AGUILERA et al., 2003).

Diante da existência desses substratos, Bussink e colaboradores (2009) fizeram uma importante observação no que diz respeito ao polimorfismo G102S. Este polimorfismo, que prediz uma substituição de glicina para serina, afeta diferencialmente a atividade de QT dependendo do substrato utilizado na dosagem enzimática. Quando o substrato 4-MU-quitotriosídeo é utilizado, a QT contendo Ser102 apresenta reduzida eficiência catalítica. Entretanto, quando o substrato 4-MU-deoxiquitobiosídeo é utilizado, a eficiência catalítica da enzima é normal. Dessa forma, a utilização de 4-MU-quitotriosídeo frente ao polimorfismo G102S também pode levar a uma subestimação da atividade de QT.

O conhecimento dos genótipos de CHIT1 ajuda na interpretação da atividade enzimática além de personalizar este biomarcador para monitoramento da gravidade da doença e resposta a terapia (GRACE et al., 2007; RODRIGUES et al., 2004).



**JUSTIFICATIVA**

Em 2010, estavam cadastrados 92 pacientes com DG tipo 1 para tratamento com imiglucerase no estado de Minas Gerais. Os pacientes adquirem este medicamento junto à Gerência de Medicamentos Excepcionais da Superintendência de Assistência Farmacêutica da Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais por meio de processo centralizado pelo Ministério da Saúde. Do total de pacientes, 38 fazem acompanhamento periódico no Ambulatório de Hematologia do Hospital das Clínicas (HC-UFMG).

Segundo o Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos do Ministério da Saúde (DAF/SCTIE/MS), em 2003 o custo anual médio do tratamento com imiglucerase de um paciente com peso de 60 kg foi de 864 mil reais. Assim, por ser a DG doença rara com tratamento de alto custo, estudos que possam contribuir para a melhoria do acompanhamento e tratamento dos pacientes, além de ações que possam diminuir os gastos com a TRE são altamente relevantes.

Os pacientes com DG tipo 1 atendidos pelo HC-UFMG não dispunham do controle regular da QT, já que era necessário o envio das amostras para o Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), tornando sua realização bastante dificultada. O desenvolvimento deste trabalho contribuiu para a implantação e padronização da técnica de dosagem de QT no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo (LEIM/HC-UFMG). O uso da quitotriosidase para controle de pacientes com DG tipo 1 é um exame complementar adicional que tem levado a uma melhora dos cuidados clínicos aos pacientes podendo até reduzir os custos associados com a terapia (SCHOONHOVEN et al., 2007).

Entretanto, pacientes portadores de dup24 em CHIT1 não apresentam a enzima ativa e, portanto, não podem ser monitorados quanto à sua presença no plasma. Assim, tais pacientes, através da genotipagem, serão excluídos do controle regular da atividade de QT como marcador bioquímico do tratamento.

Além disso, a implantação desta técnica abrirá caminho para a implantação de métodos para atividade enzimática de outras doenças lisossomais por fluorimetria no LEIM (HC-UFMG).

**OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo geral**

- Avaliar o perfil bioquímico e molecular da QT em pacientes com DG tipo 1 em acompanhamento no HC-UFMG.

### **3.2 Objetivos específicos**

- Implantar e padronizar a técnica de dosagem da atividade de QT por fluorimetria no LEIM (HC-UFMG);
- Realizar dosagens da atividade de QT para os pacientes com DG tipo 1;
- Genotipar os pacientes com DG tipo 1 quanto ao polimorfismo dup24 no gene CHIT1 e, quando necessário, genotipá-los quanto a presença de polimorfismos no gene;
- Verificar a frequência do polimorfismo dup24 entre os pacientes com DG tipo 1;
- Comparar os resultados obtidos para os pacientes com DG com o grupo controle;
- Comparar os resultados obtidos com outros trabalhos da literatura mundial.

**METODOLOGIA**

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais sob os números ETIC 625/07 e ETIC 0414.0.203.000-09.

#### **4.1 Pacientes**

O Ambulatório de Hematologia do HC-UFMG é responsável pelo acompanhamento de 38 pacientes com DG tipo 1. No presente estudo, o consentimento informado (apêndice 1) foi obtido de apenas 33 pacientes com DG tipo 1.

#### **4.2 Grupo controle**

O grupo controle foi formado por 33 voluntários sadios. Todos eles assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE, apêndice 2) e responderam a um questionário de estado de saúde (apêndice 2) para afastar quaisquer condições patológicas que pudessem influenciar os resultados obtidos.

#### **4.3 Amostras e processamento**

Foram coletados 8 mL de sangue de vaso periférico em tubos tipo vacutainer estéril com EDTA de cada paciente com DG tipo 1. Destes, 4 mL foram centrifugados por 5 minutos a 2.000 rpm para obtenção do plasma. Coleta de 4 mL de sangue periférico em EDTA foi realizada nos indivíduos do grupo controle. O sangue foi centrifugado por 5 minutos a 2.000 rpm para obtenção do plasma. As amostras de plasma foram mantidas congeladas à - 20 °C até a realização da dosagem da atividade de QT no LEIM (HC-UFMG).

A extração de DNA foi realizada em 4 mL de sangue periférico, conforme método descrito por Miller e colaboradores (1988), ou kits de raspado bucal (kit BuccalAmp™ DNA Extraction, Epicentre). As amostras de DNA foram mantidas congeladas à - 20 °C até a realização dos ensaios no Laboratório de Genética Animal e Humana (LGAH) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG.

## 4.4 Atividade de quitotriosidase

### 4.4.1 Estabelecimento de parâmetros para fluorimetria

A técnica foi realizada por fluorimetria no Fluorímetro Hitachi F-2500. Para isso, alguns parâmetros foram estabelecidos para o substrato utilizado na dosagem enzimática de QT, 4-MU-quitotriosídeo. Os parâmetros foram: comprimento de onda de emissão (EM) e excitação (EX), fenda de passagem de luz (*slit*) de EM e EX e coeficiente de variação (CV) máximo permitido no ensaio.

Para o estabelecimento do comprimento de onda de EX e EM, 10 µL de uma solução contendo 0,001 mM de 4-MU (Sigma) em tampão glicina/NaOH (0,3 M) foi utilizada para uma varredura (*scan*) na faixa de 220 a 800 nm do fluorímetro Hitachi F-2500, a fim de detectar em quais comprimentos de onda seriam obtidos os maiores picos de EX e EM do substrato. Para os valores dos *slits* de EX e EM, todas as combinações possíveis foram testadas (2,5; 5; 10; 20 nm de EX e 2,5; 5; 10; 20 nm de EM). O CV foi escolhido baseado em trabalhos da literatura mundial.

Após o estabelecimento desses parâmetros, algumas amostras de pacientes com DG tipo 1 foram enviadas para dosagem de QT ao *Laboratório de Bioquímica y Biología Molecular y Celular* da Universidade de Zaragoza (Espanha) e para o Serviço de Genética Médica do HCPA (Rede Erros Inatos do Metabolismo Brasil) para controle de qualidade externo.

### 4.4.2 Dosagem da atividade de quitotriosidase em plasma

A dosagem da atividade de QT em plasma foi realizada no LEIM (HC-UFMG), conforme técnica descrita por Hollak e colaboradores (1994). 5 µL de plasma diluído (1:10 ou 1:50) foi incubado com 200 µL de uma solução contendo 0,022 mM do substrato artificial 4-MU-quitotriosídeo em solução tampão de citrato-fosfato (0,1/0,2M), pH 5,2, por 15 minutos, a 37 °C. A reação foi parada pela adição de 2 mL de tampão glicina 0,3M, pH 10,6. A formação de 4-MU fluorescente foi medida em fluorímetro Hitachi F-2500 com comprimento de onda de EM: 446 nm e EX: 366 nm e *slit* de EM e EX de 5 nm. Todos os testes foram realizados em duplicata, com o CV máximo permitido de 5% (CANUDAS et al.,

2001; COMABELLA et al., 2009; VELLODI et al., 2005). A atividade de QT foi medida como nanomols de substrato hidrolisado por mL por hora (nmol/h/mL).

#### 4.5 Análise moleculares

Todas as análises moleculares foram realizadas no LGAH do ICB-UFMG. As sequências referências do gene CHIT1 e respectivos mRNA e proteína foram retiradas do banco de dados do NCBI, sob os seguintes números de acesso:

NÚMERO DE ACESSO	
DNA	NG_012867.1
mRNA	NM_003465.2
Proteína	NP_003456.1

##### 4.5.1 Duplicação de 24 pb em CHIT1

A análise de dup24 foi realizada através de PCR. As reações de PCR tiveram um volume final de 20 µL, contendo tampão de PCR 10x, 0,2 mM de dNTP, 0,2 mM dos iniciadores *forward* (5'-AGCTATCTGAAGCAGAAG-3') e *reverse* (5'-GGAGAAGCCGGCAAAGTC-3') (BOOT et al., 1998), 1,25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 U da enzima *Taq* DNA Polimerase (Sigma) e 50 ng de DNA genômico. O DNA foi desnaturado inicialmente a 95 °C por 2 minutos e amplificado em 95 °C por 20 segundos, 56 °C por 20 segundos e 72 °C por 30 segundos, por 35 ciclos em termociclador (PxE, Thermo Scientific). O produto da amplificação foi separado em gel de agarose 2%, e as bandas visualizadas através de coloração com Gel Red (2 µL/100mL) ou brometo de etídio 1%. O genótipo foi determinado pela presença ou ausência das bandas tipo-selvagem (75 pb) e mutante (99 pb).



## 4.5.2 Polimorfismos G102S, G354R e A442V em CHIT1

### 4.5.2.1 Desenho dos iniciadores

A sequência dos éxons 11 e 13 do gene CHIT1 foi obtida a partir do banco de dados do NCBI (NG\_012867.1). Os *primers* foram desenhados manualmente ou com auxílio da ferramenta Primer3 (v.0.4.0) (ROZEN e SAKALETSKY, 2007; <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). A qualidade dos iniciadores foi testada com o auxílio do programa NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>).

Na tabela 1 estão detalhados todos os *primers* utilizados para a amplificação das regiões de interesse.

Tabela 1 – *Primers* utilizados para análise dos polimorfismos em CHIT1

<i>Primers</i>	Sequência (5'a 3')	Tamanho do Produto	Temperatura de Anelamento	Referência
<b>G102S</b>	f: ACATAGGCACTTTTCACACGTC	380 pb	56 °C	Lee et al. (2007)
	r: AACAGCCTGGAGCAAAGCTC			
<b>G354R</b>	f: GAATCTACAGCCACTCACAGG	551 pb	56 °C	-
	r: CAGGTAAGAGAGGAACAAGG			
<b>A442V</b>	f: GGGGAGCCTTGTTGAATCT	423 pb	56 °C	-
	r: TGAGAGCAGAAAGCCTGGATA			

### 4.5.2.2 Reação de sequenciamento

A análise dos polimorfismos G102S, G354R e A442V em CHIT1 foi realizada por sequenciamento (*forward* e *reverse*), utilizando o sequenciador automático de DNA ABI 3130 (Applied Biosystems).

As amostras de DNA foram amplificadas por PCR em um volume final de 40 µL, contendo tampão de PCR 10x, 1,5 mM de dNTP, 0,2 mM dos iniciadores *forward* e *reverse*, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 U da enzima *Taq* DNA Polimerase (Sigma) e 100 ng de DNA genômico.

O DNA foi desnaturado inicialmente a 95 °C por 2 minutos e amplificado em 95 °C por 20 segundos, 56 °C por 20 segundos e 72 °C por 30 segundos, por 35 ciclos em

termociclador (PxE, Thermo Scientific). O produto da amplificação foi separado em gel de agarose 2%, e as bandas visualizadas através de coloração com brometo de etídio 1%.

Os produtos amplificados foram purificados utilizando um protocolo contendo polietilenoglicol (PEG 8000 20% NaCl 2,5M). Foram adicionados 35  $\mu$ L da solução de PEG ao PCR e os tubos, incubados a 37  $^{\circ}$ C por 30 minutos. As amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante, descartado. Em seguida, foram adicionados 125  $\mu$ L de etanol 80% e, após repouso de 1 minuto, os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm por 5 minutos. Após descarte do sobrenadante, as amostras foram colocadas em banho seco para evaporação do etanol residual. O *pellet* foi ressuscitado em 15  $\mu$ L de água Milli-Q e colocados em banho-maria, a 37  $^{\circ}$ C, por 30 minutos.

Após o processo de purificação, as amostras foram submetidas à reação de sequenciamento, contendo 1  $\mu$ L de *BigDye Terminator v3.1 Cycle*; 1  $\mu$ L de tampão de *BigDye Terminator v1.1*; 2  $\mu$ L de iniciadores a 0,8 pmol/ $\mu$ L; 1  $\mu$ L de DNA genômico e água Milli-Q para completar o volume final de 10  $\mu$ L. A reação foi submetida à termociclagem (MJ 96+, Biocycler) utilizando os seguintes parâmetros: 96  $^{\circ}$ C por 1 minuto, seguido de 25 ciclos de 96  $^{\circ}$ C por 10 segundos, 50  $^{\circ}$ C por 5 segundos e 60  $^{\circ}$ C por 4 minutos.

Após a termociclagem, os produtos foram precipitados, utilizando 1  $\mu$ L EDTA 125 mM, 1  $\mu$ L de acetato de sódio 3 M e 25  $\mu$ L de etanol absoluto. A solução foi agitada e mantida a temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, a reação foi centrifugada a 6.000 rpm por 25 minutos, a 25  $^{\circ}$ C. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e o precipitado, lavado com 35  $\mu$ L de etanol 70% e novamente centrifugado a 4.500 rpm por 10 minutos (4  $^{\circ}$ C). Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado, submetido à secagem a temperatura ambiente.

O produto do sequenciamento foi ressuscitado em 10  $\mu$ L de formamida e aplicado no sequenciador de DNA ABI 3130 (Applied Biosystems). A análise dos eletroferogramas obtidos foi realizada utilizando o programa *Codon Code Aligner v.3.7.1. DEMO*.

#### **4.5.2.3 Clonagem**

Para confirmar a presença de heterozigose do polimorfismo G102S, foi realizada a clonagem do produto de PCR correspondente ao plasmídeo PCR@II-TOPO@ utilizando o kit TOPO TA Cloning (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), conforme as recomendações do fabricante.

A reação de ligação foi realizada com 1  $\mu$ L do vetor pCR 2.1 TOPO a 50  $\mu$ g/ $\mu$ L, 1  $\mu$ L de solução salina (1,2 M de NaCl, 0,06 M de MgCl<sub>2</sub>) diluída 4x e 4  $\mu$ L do produto de PCR,

totalizando 6  $\mu\text{L}$  de reação. A reação de ligação foi realizada *overnight*, a 4 °C. Após esse período, foi realizada a transformação das bactérias *Escherichia coli* eletrocompetentes linhagem XL1 Blue (Phoneutria). Para isso, 2  $\mu\text{L}$  da reação de ligação foram adicionados a 50  $\mu\text{L}$  das células eletrocompetentes e deixadas em repouso por 1 minuto em banho de gelo. As células foram, então, transferidas cuidadosamente para uma cubeta de eletroporação e submetidas a uma voltagem de 1800 mV, corrente de 25  $\mu\text{F}$ , e resistência de 200  $\Omega$  em eletroporador e, em seguida, foi adicionado 1 mL de meio de cultura S.O.C. (Phoneutria). As células foram transferidas para um tubo falcon estéril de 15 mL e incubadas por 1 hora a 37 °C.

Após o período de incubação, 100  $\mu\text{L}$  da suspensão celular foi plaqueada em meio de cultura LB-ágar fundido em placa de Petri, contendo o antibiótico canamicina (Phoneutria). As placas foram incubadas *overnight* a 37 °C. As colônias que cresceram foram transferidas separadamente para tubos falcon contendo 10 mL de meio LB-caldo com canamicina e incubadas *overnight* a 37 °C, sob agitação.

Após este período, as amostras foram submetidas à extração plasmidial por lise alcalina. Os tubos falcon contendo as colônias bacterianas foram centrifugados a 3.000 RCF durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 200  $\mu\text{L}$  da solução I (50 mM de glicose, 25 mM de Tris-HCl pH 8,0 e 10 mM de EDTA pH 8,0). As amostras foram, então, transferidas para um novo tubo estéril e agitadas com auxílio de um vórtex. Em seguida, foram adicionados 300  $\mu\text{L}$  de solução II (0,2 N de NaOH e 1% de SDS) e as amostras, agitadas por inversão até a lise celular. Após, 300  $\mu\text{L}$  de solução III (300 mM de acetato de sódio e 11,5% de ácido acético glacial) foram acrescentados, as amostras agitadas lentamente e em seguida, incubadas em banho de gelo por 10 minutos.

Os tubos contendo a suspensão foram centrifugados a 16.000 RCF por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo estéril, onde foram adicionados 600  $\mu\text{L}$  de isopropanol absoluto. As amostras ficaram em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente, e depois, novamente centrifugadas a 16.000 RCF por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado, lavado com etanol 70%. O DNA ficou em repouso até sua secagem e após, ressuspendido em 40  $\mu\text{L}$  de TE, contendo 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de RNAse. As amostras foram incubadas a 37 °C, por 2 horas.

#### 4.5.2.3.1 Análise das amostras

Todas as amostras obtidas foram submetidas a PCR para confirmação da presença do inserto, conforme descrito no item 4.5.2.2. As amostras contendo o inserto foram

submetidas ao sequenciamento, contendo 0,5 µL de *BigDye Terminator v3.1 Cycle*; 1,5 µL de tampão de *BigDye Terminator v1.1*; 2 µL de iniciadores a 0,8 pmol/µL; 300 ng de DNA genômico e água Milli-Q para completar o volume final de 10 µL. A reação foi submetida à termociclagem (MJ 96+, Biocycler) utilizando os seguintes parâmetros: 96 °C por 2 minutos, seguido de 44 ciclos de 96 °C por 30 segundos, 50 °C por 15 segundos e 60 °C por 4 minutos. Após a reação, as amostras foram precipitadas utilizando EDTA 125 mM, acetato de sódio 3 M e etanol absoluto.

O produto do sequenciamento foi ressuscitado em 10 µL de formamida e aplicado no sequenciador de DNA ABI 3130 (Applied Biosystems). A análise dos eletroferogramas obtidos foi realizada utilizando o programa *Codon Code Aligner v.3.7.1. DEMO*.

#### **4.6 Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas no software SPSS v.14.0. Os resultados são apresentados como mediana e intervalo de variação (mínimo e máximo). Quatro pacientes com DG tipo 1 e três voluntários saudáveis não apresentaram atividade de QT detectável e, por isso, foram excluídos das análises estatísticas (Canudas et al., 2001). O teste não-paramétrico de Friedman foi realizado para avaliar diferenças entre as atividades de QT obtidas nos diferentes laboratórios. O teste de Mann-Whitney foi usado para avaliar diferenças na atividade de QT entre os pacientes com DG tipo 1 e o grupo controle e entre pacientes e grupo controle agrupados por genótipo de dup24. O mesmo teste foi utilizado para verificar o efeito do gênero na atividade enzimática. As relações entre atividade de QT e idade foram testadas pelo coeficiente de correlação de Spearman. O teste do qui-quadrado foi realizado para avaliar diferenças na frequência do genótipo de dup24 entre os gêneros nos pacientes com DG tipo 1. Em todos os testes, o nível de significância adotado foi  $p < 0,05$ .

**RESULTADOS**

## 5.1 Atividade de quitotriosidase

### 5.1.1 Estabelecimento de parâmetros para fluorimetria

O método mais utilizado para a dosagem da atividade de QT em plasma foi descrito no ano de 1994 por Hollak e colaboradores. Ele é baseado na hidrólise de um substrato específico, 4-MU-quitotriosídeo, pela ação da QT presente no plasma. Esta reação resulta na formação de uma molécula fluorescente, 4-MU, que por sua vez, é quantificada em um fluorímetro. Para uma medida confiável da atividade da enzima, o estabelecimento dos parâmetros fluorimétricos é um processo crítico (CAI et al, 2007).

O trabalho de Hollak e colaboradores (1994), entretanto, não descreve como os parâmetros utilizados foram selecionados para a otimização do experimento. Por isso, vários comprimentos de onda foram propostos para a dosagem de QT (CAI et al., 2007; GUO et al., 1995; HOLLAK et al., 1994; KURT et al., 2007; SCHOONHOVEN et al., 2007). Diante disso, sentimos necessidade de padronizar nossa técnica de forma a obter os parâmetros mais adequados para a dosagem e resultados confiáveis.

Para o estabelecimento dos comprimentos de onda de EX e EM, foi realizada uma varredura na faixa de 220 a 800 nm do fluorímetro Hitachi F-2500. O comprimento de onda de EX máximo foi obtido em 362 nm, enquanto o comprimento de onda de EM máximo foi em 450 nm (fig.6 A e B).

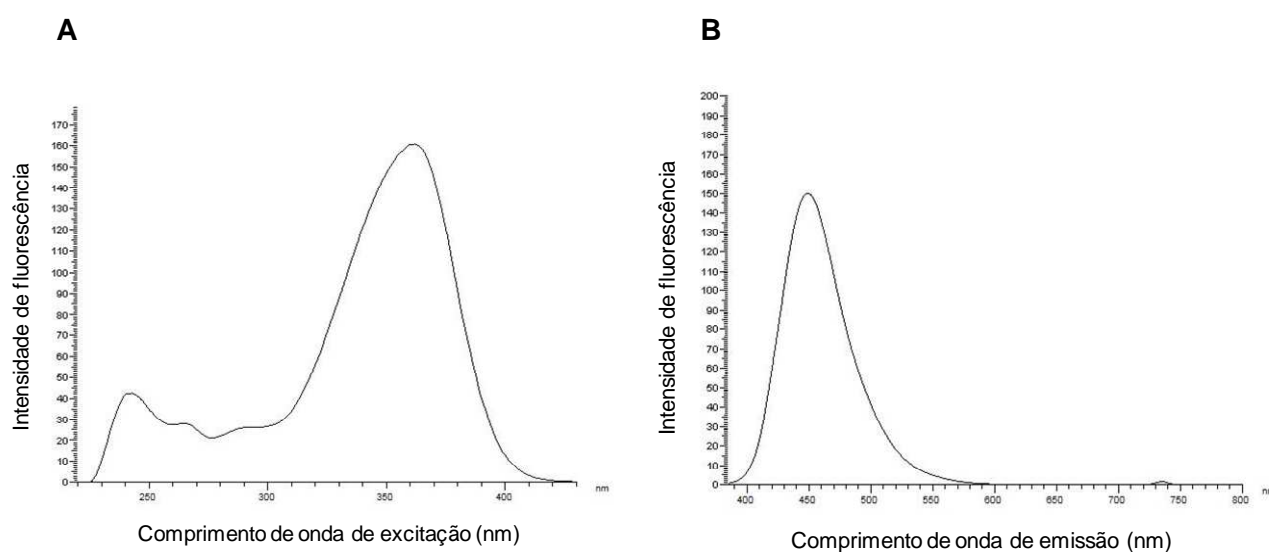


Fig. 6: **Resultado do scan para estabelecimento dos comprimentos de onda de EX e EM.**

Os picos mostram a EX (A) e EM (B) máxima obtida para o 4-MU.

Para os nossos ensaios, os comprimentos de onda de EX e EM adotados foram 366 e 446 nm, respectivamente. Esses parâmetros foram escolhidos de forma a minimizar possíveis erros no ensaio, uma vez que o pico máximo é muito instável, podendo gerar bastante variabilidade entre as amostras.

Para o estabelecimento do *slit*, todas as possíveis combinações do fluorímetro foram testadas. Como a atividade de QT é esperada estar bastante elevada em pacientes com DG tipo 1, padronizamos um valor intermediário do *slit* (5 nm para EX e EM), permitindo que altos níveis de fluorescência pudessem ser obtidos sem, no entanto, aumentar o fator de diluição das amostras.

O CV máximo permitido entre as duplicatas foi de 5%, o que torna o ensaio altamente reproduzível (CANUDAS et al., 2001; COMABELLA et al., 2009; VELLODI et al., 2005).

Após o estabelecimento de todos os parâmetros fluorimétricos necessários, encaminhamos 4 amostras de plasma de pacientes com DG tipo 1 para o *Laboratório de Bioquímica y Biología Celular y Molecular* (Universidade de Zaragoza, Espanha), um centro de referência para o diagnóstico de doenças lisossomais na Espanha, e para o Serviço de Genética Médica do HCPA, um centro de referência brasileiro para o diagnóstico de doenças lisossomais. A tabela 2 mostra os resultados da atividade de QT obtida nos diversos laboratórios.

Tabela 2 - Atividade de QT nos diferentes laboratórios

<b>ATIVIDADE DE QT *</b>			
<b>PACIENTES</b>	<b>LEIM (HC-UFG)</b>	<b>ESPANHA</b>	<b>HCPA</b>
A1	5.032	5.127	8.129
A2	19.179	12.679	27.489
A3	2.356	2.113	1.977
A4	5.092	6.268	4.169

\* em nmols/h/mL

Para verificar se houve alguma diferença estatística entre os resultados obtidos nos diferentes laboratórios, o teste de Friedman foi realizado. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada ( $p = 1,0$ ).

## 5.2 ARTIGO

Adelino TER, Martins GM, Gomes AAA, Torres AA, Silva DAS, Xavier VDO, Guimarães JPO, Araújo SSS, Fernandes RAF, Oliveira MCLA, Godard ALB, Valadares ER. (2011). **Biochemical and molecular chitotriosidase profiles in patients with Gaucher disease type 1 in Minas Gerais, Brazil: new mutation in CHIT1 gene.**



**BIOCHEMICAL AND MOLECULAR CHITOTRIOSIDASE PROFILES IN PATIENTS WITH  
GAUCHER DISEASE TYPE 1 IN MINAS GERAIS, BRAZIL: NEW MUTATION IN CHIT1  
GENE**

Talita ER Adelino<sup>1</sup>; Gustavo G Martins<sup>2</sup>; Aretta AA Gomes<sup>1</sup>; Adriana A Torres<sup>1</sup>; Daniel AS  
Silva<sup>1</sup>; Vinícius DO Xavier<sup>2</sup>; João Paulo O Guimarães<sup>2</sup>; Sérgio SS Araújo<sup>2</sup>; Rachel AF  
Fernandes<sup>2</sup>; Maria Christina LA Oliveira<sup>2</sup>; Ana Lúcia B Godard<sup>1\*</sup>; Eugênia R Valadares<sup>2,3\*†</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Genética Animal e Humana, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências  
Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil;

<sup>2</sup> Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil;

<sup>3</sup> Departamento de Propedêutica Complementar, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de  
Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

\* co-senior authors

† Corresponding author:

Eugênia Ribeiro Valadares

Departamento de Propedêutica Complementar

Universidade Federal de Minas Gerais

Avenida Professor Alfredo Balena, 190, 31130-100, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

Phone/Fax: + 55 031 3409-9774

Email address: eugenia@medicina.ufmg.br

**Words count of text:** 3,128

**Words count of abstract:** 223

**Number of tables:** 2

**Number of figures:** 2

**ABSTRACT**

Chitotriosidase (ChT) is a human chitinase secreted by activated macrophages and its activity is used in therapeutic monitoring of Gaucher disease (GD), the most common lysosomal storage disease. About 6% of the population is homozygous for a duplication of 24 bp in exon 11 of the CHIT1 gene (dup24), which is the main polymorphism that results in absence of ChT. As ChT enzyme activity can be used as a biomarker in GD, it is important to know the CHIT1 genotype of each patient. In this study, ChT activity and CHIT1 genotype were evaluated in 33 GD type 1 patients under treatment in the state of Minas Gerais, Brazil, and compared to healthy controls. As expected, the enzyme activity was found to be higher in GD type 1 patients than in healthy subjects. Four patients had no ChT activity. Their genotype revealed three patients (9%) homozygous for dup24 allele and one patient with two polymorphisms in exon 11: G354R and a 4 bp deletion at the exon-intron 11 boundary (g.16993\_16996delGAGT), the later described for the first time in literature. Two other patients with lower ChT activity presented a polymorphism in exon 4 (c.304G>A, p.G102S), without dup24 allele. In conclusion, this study demonstrated that ChT activity can be used for therapeutic monitoring in 82% of GD patients of the state of Minas Gerais, Brazil.

**Synopsis:** Biochemical and molecular chitotriosidase profiles in Brazilian patients of Minas Gerais state, affected by Gaucher disease type 1, including the discovery of a new mutation in CHIT1 gene, are reported.

**CONFLICT OF INTEREST**

None declared

## INTRODUCTION

Gaucher disease (GD; MIM 230800), the most prevalent of the sphingolipid storage disorders, is caused by a genetic defect that leads to glucocerebrosidase ( $\beta$ -glucosidase) deficiency (EC 3.2.1.45) and progressive accumulation of its substrate, glucocerebroside, in cells of monocyte/macrophage origin (Brady et al 1965; Beutler and Grabowski 1995). Most patients present progressive visceral enlargement and gradual replacement of the bone marrow with lipid-laden macrophages, haematological abnormalities, and structural skeletal changes. Progressive neurologic deterioration develops in a minority (Beutler and Grabowski 1995).

Patients with GD type 1 are commonly treated by enzyme replacement therapy (ERT) with imiglucerase, only produced by Genzyme Corporation (Cambridge, MA, UK), a high-cost treatment provided by the Brazilian Ministry of Health. The parameter most frequently employed to monitor effectiveness of this therapeutic intervention is the activity of chitotriosidase (ChT) (Cox et al 2000, Hollak et al 1994, Hollak et al 2001, Mistry and Abrahamov 1997), a chitinase encoded by the chitotriosidase gene (CHIT1; MIM 600031). The CHIT1 gene is currently known to possess 13 exons with sizes ranging from 30 to 1055 bp (NG\_012867.1, National Center for Biotechnology Information, 2012; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1118>).

The enzyme is synthesized by activated macrophages and is usually highly increased in serum from GD type 1 patients (Froissart 2006, Hollak et al 1994). However, monitoring therapeutic response by measuring plasma ChT activity has a pitfall: the complete absence of enzymatic activity in approximately 6% of individuals (Boot et al 1998). This observation can be explained by the homozygosity for a duplication of 24 bp in exon 11 of the CHIT1 gene (dup24, rs3831317) preventing formation of active enzyme (Boot et al 1998). However, dup24, the main mutation described, is not the only one with implications for diagnosis and

therapeutic monitoring of patients. Some polymorphisms, such as G102S (c.304G>A, p.G102S, rs2297950), G354R (c.1060G>A, p.G354R, rs9943208) and A442V (c.1325C>T, p.A442V, rs1065761) have been associated with reduced ChT activity (Bussink et al 2009, Grace et al 2007, Lee et al 2007).

The relative scarceness of data regarding the incidence of GD in Brazil, the evidence that, as a group, Brazilian patients may have a more aggressive form of the disease (Sobreira et al 2007), and the high cost of ERT to the public health budget prompted us to study the biochemical and molecular ChT profiles in an effort to assess treatment efficacy. Indeed, in 2007, about 500 patients with GD type 1 were treated in Brazil with 177,280 bottles of ERT being purchased at a cost of over US\$ 125 million (Souza et al 2010). The effective dose of imiglucerase is individually adjusted according to the clinical status and treatment response of the patient. The dose ranges from 15 to 60 U/kg and is supplied every two weeks (Martins et al 2009). For this purpose we correlated the measure of plasma ChT activity with CHIT1 genotypes of GD type 1 patients from the Hospital das Clinicas of the Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG), and compared with healthy controls. Ultimately we reasoned that such studies could be valuable for the monitoring of ERT effectiveness and help physicians to devise the best treatment protocol strategies which would represent a more adequate use of treatment resources and improvement of therapy results for patients. We found that 9% of the patients analyzed (P1, P2 and P3) presented null or low ChT activity levels in spite of homozygous or heterozygous for the dup24 wild type allele.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Samples**

Seventeen female and 16 male GD type 1 patients under treatment (32 in ERT with imiglucerase and one in substrate reduction therapy - SRT) at the reference center in HC-

UFMG participated of this study. The median age of the patients was 27 years (range: 5-62 years) and the median treatment time was 11 years (range: 1-14 years). All patients had diagnosis confirmed by measurement of glucocerebrosidase activity in leukocytes (Beutler and Kuhl 1970) or cultured fibroblasts (Beutler et al 1971). The control group consisted of 33 healthy volunteers of which 18 were females and 15 were males. The median age of the control group was 24 years (range: 8-52 years).

## **Ethics**

The study was approved by the Ethics in Research Committee of Universidade Federal de Minas Gerais, under the numbers ETIC 625/07 and ETIC 0414.0.203.000-09, and informed consent was obtained from all participants.

## **CHIT1 genotyping**

Samples of 4 mL of peripheral blood were collected from GD type 1 patients in tubes containing EDTA and immediately subjected to DNA extraction according to the method described by Miller and coworkers (1988). DNA samples from 33 healthy controls were collected using buccal swabs and extracted with the BuccalAmp™ DNA Extraction Kit (Epicentre, Madison, WI, USA). The DNA samples were stored at -20 °C until molecular analysis.

Genotyping for dup24 in CHIT1 gene was performed by PCR using specific primers (ChTF: AGCTATCTGAAGCAGAAG and ChTR: GGAGAAGCCGGCAAAGTC) as previously described (Boot et al 1998). The 20 µL reaction contained 1x PCR Buffer (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), 0.2 mM dNTPs, 0.2 mM of each primer, 1.25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 U Taq polymerase (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) and 50 ng of DNA template. The DNA was denatured at 95 °C for 2 min, and amplification was performed by 35 cycles at 95 °C for

20 s, 56 °C for 20 s and 72 °C for 30 s. The amplified fragments were separated by electrophoresis on a 2% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. Genotypes were determined by the presence or absence of wild type (75 bp) and/or mutant (99 bp) bands.

The three patients (P1, P2, and P3) who presented null or low levels of ChT activity in spite of being homozygous or heterozygous for the dup24 wild type allele were screened for three polymorphisms in CHIT1 that correlate with reduced ChT activity: G102S, G354R and A442V (Bussink et al 2009, Grace et al 2007, Lee et al 2007). PCR amplification of the regions containing the polymorphisms G102S (exon 4), G354R (exon 11) and A442V (exon 13) was performed using specific primers detailed in Table 1. The 40 µL reaction contained 1x PCR Buffer (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), 1.5 mM dNTPs, 0.2 mM of each primer, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 U Taq polymerase (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) and 100 ng of DNA template. The DNA was denatured at 95 °C for 2 min, and amplification was performed by 35 cycles at 95 °C for 20 s, 56 °C for 20 s and 72 °C for 30 s. The amplified fragments were separated by electrophoresis on a 2% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining.

Fragments were purified from the agarose gel using the Promega Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System kit (Promega Corporation, Madison, WI, USA) as recommended by the manufacturer. The purified samples were sequenced (forward and reverse direction) in the ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems Inc, Foster City, CA, USA), using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Inc, Foster City, CA, USA) as recommended by the manufacturer. Sequences were analyzed and aligned to the reference sequence of CHIT1 gene NG\_012867.1 using the CodonCode Aligner software (<http://www.codoncode.com/aligner/>).

To confirm heterozygosity for the G102S polymorphism in patient P2, the fragment containing the possible alteration was cloned. Cloning was performed on PCR®II-TOPO® plasmid using the TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) as recommended by the manufacturer.

### **Plasma ChT activity**

Plasma was obtained by centrifugation from peripheral venous blood collected in EDTA and stored at - 20 °C until enzymatic analysis at the Laboratory of Inborn Errors of Metabolism of HC-UFMG. The measurement of the ChT activity was performed as previously described by Hollak and coworkers (1994). Briefly, 5 µL of diluted plasma was incubated with 200 µL of a solution containing 0.022 mM of the artificial substrate 4-methylumbelliferyl-β-D-N'-N"-triacetylchitotrioside (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) in citrate-phosphate buffer (0.1/0.2 M) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), pH 5.2, for 15 minutes at 37 °C. The reaction was interrupted by adding 2 mL of 0.3 M glycine buffer (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), pH 10.6. The fluorescent 4-MU was measured with a spectrofluorometer Hitachi F-2500 (Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japan), excitation (EX) at 366 nm and emission (EM) at 446 nm. The slit width was 5 nm, both EM and EX. The coefficient of variation (CV) between duplicates was 5%, which makes the test highly reproducible (Canudas et al 2001, Comabella et al 2009, Vellodi et al 2005). ChT activity was expressed in nanomols of hydrolyzed substrate per hour per mL (nmol/h/mL).

### **Statistical analysis**

Analyses were performed using the statistical software package SPSS 14.0. Results are presented as median and range (minimum and maximum). Four GD type 1 patients and three healthy controls showed no detectable ChT activity and therefore were excluded from further statistical analysis (Canudas et al 2001). The non-parametric Mann-Whitney test was



used in order to evaluate differences in ChT activity between GD type 1 patients and controls, and also among patients and control individuals grouped by genotype. The same test was used to verify the effect of gender on enzyme activity. The relations between ChT activity and age were tested by the Spearman correlation. Chi-square test was used to evaluate differences in frequency of dup24 genotype between genders in GD type 1 patients. In all tests, the level of significance was set at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

Of the 33 GD type 1 patients, 23 (70%), seven (21%) and three (9%) were, respectively, wild type (wt/wt), heterozygous (wt/dup24) and homozygous (dup24/dup24) mutants for the allele dup24 (Figure 1). Among healthy controls, 15 (45.5%), 15 (45.5%) and three (9%) showed, respectively, wt/wt, wt/dup24 and dup24/dup24 genotypes. The frequency of the wt and dup24 alleles among patients was 0.803 and 0.197, respectively, and 0.682 and 0.318 in the control group. The genotype distribution was in Hardy-Weinberg equilibrium.

As expected, plasma ChT activity was 176 times higher in 29 treated patients with GD type 1 (median: 5092, range: 115-29284 nmol/h/mL) than in control group (median: 29, range: 7-68 nmol/h/mL;  $p < 0.0001$ ) (Table 2). Patients with wt/wt genotype (median: 6011, range: 115-29284 nmol/h/mL) showed ChT activity 194 times higher than healthy controls with the same genotype (median: 31, range: 17-68 nmol/h/mL;  $p < 0.0001$ ). Patients with the genotype wt/dup24 (median: 2496 nmol/h/mL, range: 652-4417 nmol/h/mL) showed ChT activity 119 times higher than healthy wt/dup24 controls (median: 21, range: 7-52 nmol/h/mL;  $p < 0.0001$ ) (Table 2). GD type 1 patients and controls with the genotype dup24/dup24 presented no ChT activity. Considering GD type 1 patients with different genotypes, the ChT activity was about twice lower in patients with the genotype wt/dup24 when compared to patients with the wt/wt genotype ( $p < 0.05$ ).

No correlation was observed between ChT activity and age in both populations ( $p>0.05$ ). No relationship was noted between gender and ChT activity ( $p>0.05$ ) or gender and distribution of dup24 genotype ( $p>0.05$ ) in GD type 1 patients.

Two homozygous (P1 and P2) and one heterozygous (P3) patients for the dup24 wild type allele showed lower ChT activity levels than the average reported in their group (Figure 1). Consequently, they were screened for three polymorphisms that have been shown to reduce ChT enzyme activity. We found that patient P1 (ChT activity of 115 nmol/h/mL) was homozygous for the polymorphism G102S, which is a guanine to adenine transition at position 304 of the cDNA (c.304G>A). Patient P2 (ChT activity of 206 nmol/h/mL) was heterozygous for the same polymorphism. Cloning confirmed the heterozygosity in this patient. Patient P3 (null ChT activity) presented two alterations in exon 11. This patient was found to be heterozygous for the polymorphism G354R, which is a guanine to adenine transition at position 1060 of the cDNA (c.1060G>A) and for a 4-base deletion in exon-intron 11 boundary (g.16993\_16996delGAGT; rs143439055) (Figure 2). This is the first report on this deletion to date.

None of the patients evaluated presented the polymorphism A442V, which is a cytosine to thymine transition at the position 1325 of the cDNA (c.1325C>T).

## **DISCUSSION**

To achieve a better monitoring of GD type 1 patients and correlate ChT activity with treatment efficacy we measured the enzyme levels and correlated them with the CHIT1 genotype of each of the 33 GD type 1 patients under treatment.

Our results showed that the ChT activity was higher in most GD type 1 patients analyzed than in the healthy controls, which is in accordance with previous studies (Hollak et al 1994,

Ries et al 2006, Wajner et al 2004, Wajner et al 2007). Wajner and colleagues (2004 and 2007) reported that the ChT activity was around 600-fold greater in untreated GD patients of Brazilian origin than in healthy individuals. In the present study, GD type 1 patients also showed an elevation in the levels of enzyme activity, however it was only 176 times higher. The divergence may be explained by the fact that all patients in our study were under treatment, whereas patients reported by Wajner and colleagues were receiving no treatment. We observed that ChT activity in GD type 1 patients homozygous wild-type was approximately twice higher than in heterozygous patients. This result is in accordance with Schoonhoven and co-authors (2007), and can be explained by the presence of the null allele *dup24*, which does not produce active enzyme (Boot et al 1998).

The causes for this activity increase are not yet established. Some studies suggest that in GD type 1 patients the accumulation of the immunogenic components in macrophages, such as ceramide and sphingolipids, causes cellular activation and consequently ChT secretion, which may mediate the immune response involved (Ballou et al 1996, van Eijk et al 2005). Increased ChT activity was also recorded in several other diseases, such as Niemann-Pick (Brinkman et al 2005), GM1 gangliosidosis (Malaguarnera 2003),  $\beta$ -thalassemia (Barone et al 1999), sarcoidosis (Boot et al 2010), malaria (Barone et al 2003), atherosclerosis (Artieda et al 2003, Boot et al 1999), and fungal and bacterial infections (Iyer et al 2009, Labadaridis et al 1998). The role of ChT enzyme is unclear, but a possible role in defense against chitin-containing pathogens and host immune response has been suggested (Choi et al 2001, Di Luca et al 2007, Di Rosa et al 2005, Gordon-Thomson et al 2009, Malaguarnera et al 2005, van Eijk et al 2005).

It is estimated that approximately 6% and 33-35% of the general population is homozygous and heterozygous for the mutation *dup24*, respectively (Boot et al 1998). In our study, we found that 9% and 21% of GD type 1 patients present the genotypes *dup24/dup24* and *wt/dup24*, respectively. Among healthy controls, 9% were *dup24/dup24*, and 45.5% were

wt/dup24. The deviations observed can be attributed to the not large enough number of evaluated samples, and also to selection bias, since among GD type 1 patients there were 6 families, and 12 related individuals. The Hardy-Weinberg test revealed that the frequency of dup24 genotypes in GD type 1 patients and healthy controls is in equilibrium. However, the p value observed for the group of GD type 1 patients was  $p=0.06$ , which is very close to the level of significance cut-off. This may also be due to the number of patients genotyped and/or selection bias.

Genotyping of polymorphisms in the CHIT1 gene for three patients (P1, P2 and P3) who presented divergent correlation between dup24 genotype and ChT activity revealed that patients P1 and P2 were, respectively, homozygous and heterozygous for G102S polymorphism. Grace and co-workers (2007) showed, using 4-MU-chitotrioside as substrate, that recombinant expressed G102S ChT had only 23% residual activity in relation to the wild-type ChT. On the other hand, Lee and colleagues (2007) analyzing GD type 1 patients noted that this polymorphism was not associated with reduced enzyme activity. Bussink and co-authors (2009) reported that G102S affects differentially the ChT activity depending on the substrate used for enzyme measurement: when the substrate 4-MU-chitotrioside was used, the mutated ChT containing Ser102 showed reduced catalytic efficiency; whereas normal catalytic efficiency of the enzyme containing Ser102 was observed when the substrate 4-MU-deoxychitobioside (Aguilera et al 2003) was used. In the present study, we used the substrate 4-MU-chitotrioside, and this may explain the low enzyme activity observed. Furthermore, the mentioned authors reported a considerable overlap of results and a relatively high frequency of the G102S allele in different ethnic groups. Thus, we cannot exclude the possibility that GD type 1 patients that were not genotyped do not present this polymorphism.

The patient P3 showed more complex changes in CHIT1 gene. Besides presenting the wt/dup24 genotype, this patient is heterozygous for the G354R polymorphism in exon 11,

which has been previously associated with reduced ChT activity (Grace et al 2007, Lee et al 2007). Interestingly, this patient presented a 4-base deletion at the exon-intron 11 boundary (g.16993\_16996delGAGT), first reported in this study. This deletion involves the last two bases of exon 11 and the first two positions of intron 11, altering the 5' donor splice-site. A similar genotype was described by Grace and colleagues (2007), whose patient with GD type 1 showed three alterations, called 'complex E/I-10 allele': a G354R polymorphism, a silent base change (L385L) in exon 11, and a 4-base deletion in intron 11. The mutation described in the present study changes the 5' donor splice-site, leading to a splice error which may underlie the absence of ChT activity observed in patient P3. This mutation may produce a truncated ChT enzyme, but future studies will be needed to confirm this hypothesis.

In conclusion, this study characterized the ChT activity in 33 GD type 1 patients from Minas Gerais state under ERT and SRT treatment and described a novel mutation in the CHIT1 gene with important implications for diagnosis and therapeutic monitoring of patients. We found that ChT activity cannot be used as biomarker in 18% of GD patients evaluated, since these patients had null (four patients) or low (P1 and P2) ChT activity. Such knowledge can better planning of treatment aiming at improving the response of GD type 1 patients to ERT and SRT.

**TABLE 1**

Primers used for analysis of the CHIT1 polymorphisms

<b>Polymorphisms</b>	<b>Primers (5' - 3')</b>	<b>Fragment Size</b>	<b>Annealing temperature</b>	<b>Reference</b>
<b>G102S</b>	F: ACATAGGCACTTTTCACACGTC R: AACAGCCTGGAGCAAAGCTC	380 bp	56 °C	Lee et al (2007)
<b>G354R*</b>	F: GAATCTACAGCCACTCACAGG R: CAGGTAAGAGAGGAACAAGG	551 bp	56 °C	-
<b>A442V*</b>	F: GGGGAGCCTTGGTTGAATCT R: TGAGAGCAGAAAGCCTGGATA	423 bp	56 °C	-

\* The primers for analysis of the G354R and A442V polymorphisms were based on CHIT1 genomic sequence from NCBI database (NG\_012867.1).

**TABLE 2**

Dup24 genotype and ChT activity in GD type 1 patients and controls

	N° of subjects	Genotype (%)	ChT activity (nmols/h/mL)
			Median (minimum-maximum)
<b>GD type 1</b>	33	100	5092 (115-29284)
wt/wt	23	70	6011 (115-29284)
wt/dup24	7	21	2496 (652-4417)
dup24/dup24	3	9	0
<b>Control group</b>	33	100	29 (7-68)
wt/wt	15	45.5	31 (17-68)
wt/dup24	15	45.5	21 (7-52)
dup24/dup24	3	9	0

FIGURE 1

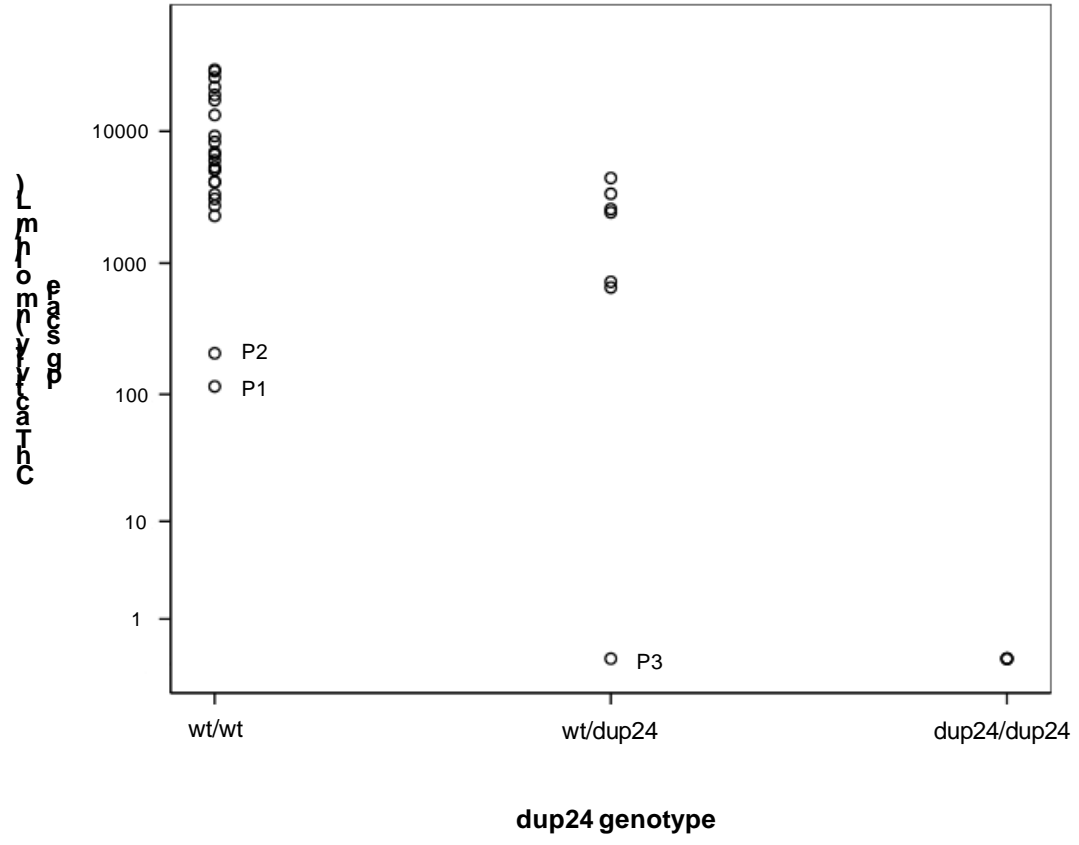




FIGURE 2

Patient P3	CGGCAGGAACT----	AAGTAAGGGGC
Reference Sequence	CGGCAGGAACTGAGT	AAGTAAGGGGC
	Exon 11	Intron 11

## LEGENDS FOR ILLUSTRATIONS

**Figure 1:** Levels of ChT activity in 33 GD type 1 patients. Circles represent the ChT activity in each GD type 1 patient evaluated conform dup24 genotype. The enzyme activity was undetectable in patients with dup24/dup24 genotype (n=3) and in patient P3 and reduced in patients with wt/dup24 genotype (n=7). Patients P1, P2 and P3 are highlighted on the graph.

**Figure 2:** 4-base deletion (g.16993\_16996delGAGT) at the exon-intron 11 boundary in patient P3. This deletion involves the last two bases of exon 11 (GA) and the first two positions of intron 11 (GT). The nomenclature g.16993\_16996delGAGT was based on CHIT1 genome sequence from NBCI (NG\_012867.1).

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank all the patients and control group for participation and for their cooperation, Prof. Luiz Alberto Cury, from Department of Physics - UFMG, Prof. Miguel Pocoví and Pilar Alfonso Palacín from the *Laboratorio de Bioquímica y Biología Celular y Molecular* - University of Zaragoza, Spain, and Mrs. Annelie Schlenger of the Biochemical Laboratory at the Children's Hospital at University of Mainz, Germany, for the valuable discussions; the physicians of the Hematology Clinic at *HC-UFMG* for the good interaction with us in the laboratory; the *Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais* for the financial support and master degree scholarship.

## REFERENCES

- Aguilera B, Ghauharali-van der Vlugt K, Helmond MT et al (2003) Transglycosidase activity of chitotriosidase: improved enzymatic assay for the human macrophage chitinase. *J Biol Chem* 278: 40911-40916.
- Artieda M, Cenarro A, Gañán A et al (2003) Serum chitotriosidase activity is increases in subjctcs with atherosclerosis disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 1645-1652.
- Ballou LR, Laulederkind SJ, Rosloniec EF, Raghow R (1996) Ceramide signaling and the immune response. *Biochim Biophys Acta* 1301: 273-287.
- Barone R, Di Gregorio F, Romeo MA, Schilirò G, Pavone L (1999) Plasma chitotriosidase activity in patients with  $\beta$ -thalassemia. *Blood Cells Mol Dis* 25: 1-8.
- Barone R, Simporé J, Malaguarnera L, Pignatelli S, Musumeci S (2003) Plasma chitotriosidase activity in acute *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Chim Acta* 331: 79-85.

Beutler E, Grabowski GA (1995) Gaucher Disease. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill, 2641-2670.

Beutler E, Kuhl W (1970) The diagnosis of the adult type of Gaucher's disease and its carrier state by demonstration of deficiency of beta-glucosidase activity in peripheral blood leukocytes. *J Lab Clin Med* 76: 747-755.

Beutler E, Kuhl W, Trinidad F, Teplitz R, Nadler H (1971) Beta-glucosidase activity in fibroblasts from homozygotes and heterozygotes for Gaucher's disease. *Am J Hum Genet* 23: 62-66.

Boot RG, Hollak CEM, Verhoek M, Alberts C, Jonkers RE, Aerts JM (2010) Plasma chitotriosidase and CCL18 as surrogate markers for granulomatous macrophages in sarcoidosis. *Clin Chim Acta* 411: 31-36.

Boot RG, Renkema GH, Verhoek M et al (1998) The human chitotriosidase gene: nature of inherited enzyme deficiency. *J Biol Chem* 273: 25680-25685.

Boot RG, van Aqterberg TAE, van Aken BE et al (1999) Strong induction of members of the chitinase family of proteins in atherosclerosis chitotriosidase and human cartilage gp-39 expressed in lesion macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 687-694.

Brady RO, Kanfer J, Shapiro D (1965) The metabolism of glucocerebrosides. I. Purification and properties of a glucocerebroside-cleaving enzyme from spleen tissue. *J Biol Chem*, 240: 39-43.

Brinkman J, Wijburg FA, Hollak CEM et al (2005) Plasma chitotriosidase and CCL18: early biochemical surrogate markers in type B Niemann-Pick disease. *J Inherit Metab Dis* 28: 13-20.

Bussink AP, Verhoek M, Vreede J et al (2009) Common G102S polymorphism in chitotriosidase differentially affects activity towards 4-methylumbelliferyl substrates. *FEBS J* 276: 5678-5688.

Canudas J, Cenarro A, Civeira F et al (2001) Chitotriosidase genotype and serum activity in subjects with combined hyperlipidemia: effect of the lipid-lowering agents, atorvastatin and bezafibrate. *Metabolism* 50: 447-450.

Choi EH, Zimmerman PA, Foster CB et al (2001) Genetic polymorphisms in molecules of innate immunity and susceptibility to infection with *Wuchereria bancrofti* in South India. *Genes Immun* 2: 248-253.

Comabella M, Domínguez C, Rio J et al (2009) Plasma chitotriosidase activity in multiple sclerosis. *Clin Immunol* 131: 216-222.

Cox T, Lachmann R, Hollak CEM et al (2000) Novel oral treatment of Gaucher's disease with N-butyldeoxynojirimycin (OGT 918) to decrease substrate biosynthesis. *Lancet* 355: 1481-1485.

Di Luca M, Romi R, Severini F et al (2007) High levels of human chitotriosidase hinder the formation of peritrophic membrane in anopheline vectors. *Parasitol Res* 100: 1033-1039.

Di Rosa M, Musumeci M, Scuto A, Musumeci S, Malaguarnera L (2005) Effect of interferon- $\gamma$ , interleukin-10, lipopolysaccharide and tumor necrosis factor- $\alpha$  on chitotriosidase synthesis in human macrophages. *Clin Chem Lab Med* 43: 499-502.

Froissart R (2006) Biomarqueurs actuels et futurs de la maladie de Gaucher. *Rev Med Interne* 27 : S22-S25.

Gordon-Thomson C, Kumari A, Tomkins L et al (2009) Chitotriosidase and gene therapy for fungal infections. *Cell Mol Life Sci* 66: 1116-1125.

Grace ME, Balwani M, Nazarenko I, Prakash-Cheng A, Desnick RJ (2007) Type 1 Gaucher disease: null and hypomorphic novel chitotriosidase mutations - implications for diagnosis and therapeutic monitoring. *Hum Mutat* 28: 866-873.

Hollak CEM, Evers L, Aerts JMFG, van Oers MHJ (1997) Elevated levels of M-CSF, SCD14 and IL8 in type 1 Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis* 23: 201-212.

Hollak CEM, Maas M, Aerts JM (2001) Clinically relevant therapeutic endpoints in type I Gaucher disease. *J Inherit Metab Dis* 24:Suppl:97-105.

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

Iyer A, van Eijk M, Silva E et al (2009) Increased chitotriosidase activity in serum of leprosy patients: association with bacillary leprosy. *Clin Immunol* 131: 501-509.

Labadaridis J, Dimitriou E, Costalos C et al (1998) Serial chitotriosidase activity estimations in neonatal systemic candidiasis. *Acta Paediatr* 87: 605.

Lee P, Waalen J, Crain K, Smargon A, Beutler E (2007) Human chitotriosidase polymorphisms G354R and A442V associated with reduced enzyme activity. *Blood Cells Mol Dis* 39: 353-360.

Malaguarnera L, Musumeci M, Di Rosa M, Scuto A, Musumeci S (2005) Interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and lipopolysaccharide promote chitotriosidase gene expression in human macrophages. *J Clin Lab Anal* 19: 128-132.

Malaguarnera L, Simporè J, Prodi DA et al (2003) 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* 4: 570-574.

Martins AM, Valadares ER, Porta G (2009) Recommendations on diagnosis, treatment, and monitoring for Gaucher Disease. *J Pediatr* 155: S10-18.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16: 1215.

Mistry PK, Abrahamov A (1997) A practical approach to diagnosis and management of Gaucher's disease. *Baillieres Clin Haematol* 10: 817-838.

Ries M, Schaefer E, Luhrs T et al (2006) 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* 29: 647-652.

Schoonhoven A, Rudensky B, Elstein D et al (2007) Monitoring of Gaucher patients with a novel chitotriosidase assay. *Clin Chim Acta* 381: 136-139.

Sobreira E, Pires RF, Cizmarik M, Grabowski GA (2007) Phenotypic and genotypic heterogeneity in Gaucher disease type 1: a comparison between Brazil and the rest-of-the-world. *Mol Genet Metab* 90: 81-86.

Souza MV, Krug BC, Picon PD, Schwartz IV (2010) Medicamentos de alto custo para doenças raras no Brasil: o exemplo das doenças lisossômicas. *Cien Saude Colet* 15: 3443-3454.

van Eijk M, van Roomen CPAA, Renkema GH (2005) Characterization of human phagocyte-derived chitotriosidase, a component of innate immunity. *Int Immunol* 17: 1505-1512.

Vellodi A, Foo Y, Cole TJ (2005) Evaluation of three biochemical markers in the monitoring of Gaucher disease. *J Inherit Metab Dis* 28: 585-92.

Wajner A, Michelin K, Burin MG et al (2004) Biochemical characterization of chitotriosidase enzyme: comparison between normal individuals and patients with Gaucher and with Niemann-Pick diseases. *Clin Biochem* 37: 893-897.

Wajner A, Michelin K, Burin MG et al (2007) Comparison between the biochemical properties of plasma chitotriosidase from normal individuals and from patients with Gaucher disease, GM1-gangliosidosis, Krabbe disease and heterozygotes for Gaucher disease. *Clin Biochem* 40: 365-369.



**DISCUSSÃO**

A QT é uma importante ferramenta para a avaliação e monitoramento de pacientes com DG (BALDELLOU et al., 2004; COX et al., 2000; CZARTORYSKA et al., 2000; HOLLAK et al., 1994; HOLLAK et al., 2001; MISTRY e ABRAHAMOV, 1997). A técnica para dosagem de sua atividade foi proposta por Hollak e colaboradores (1994) e, a partir de então, tem sido amplamente utilizada para acompanhamento do tratamento destes pacientes.

Embora seja bastante utilizado, o estudo de Hollak e colaboradores (1994) não descreve como a técnica de dosagem de QT foi padronizada. Por isso, diversos parâmetros foram propostos para tal e, estes, geralmente variam de acordo com o fluorímetro disponível para o teste. Diante disso, sentimos necessidade de padronizar nosso ensaio de forma a obter os parâmetros mais adequados para a dosagem enzimática e resultados confiáveis.

Todos os ensaios enzimáticos foram realizados utilizando os comprimentos de onda de EX e EM padronizados neste estudo: 366 e 446 nm, respectivamente. Como pode ser observado, o valor obtido para o comprimento de onda de EX é menor do que aquele obtido para a EM. Isso ocorre porque a energia emitida é sempre menor do que a utilizada para gerar o estado excitado (BARBOSA, 2008). Esse fato pode ser melhor visualizado através da fórmula:

$$E = h \nu, \text{ onde } \nu = c / \lambda$$

*E*: energia

*h*: constante de Planck

*c*: velocidade da luz no vácuo

$\lambda$ : comprimento de onda

Assim, *E* é inversamente proporcional a  $\lambda$ , o que significa que quanto menor o comprimento de onda, maior a energia do fóton de luz. Isso garante que toda a amostra analisada seja excitada e emita valores reais de fluorescência.

Como destacado anteriormente, após a padronização do nosso ensaio, algumas amostras de plasma de pacientes com DG tipo 1 foram enviadas para dois laboratórios de referência no diagnóstico de doenças lisossomais. Apesar de nenhuma diferença estatisticamente significativa ter sido observada entre o nosso resultado e aqueles obtidos nos diferentes laboratórios, uma variação entre os valores foi percebida, provavelmente por pequenas modificações da técnica ou mesmo diferenças entre os fluorímetros utilizados no ensaio. Isso destaca a importância de se realizar o controle do paciente sempre no mesmo laboratório e sob as mesmas condições experimentais, minimizando possíveis erros na interpretação dos resultados.

No presente trabalho, foram caracterizados 33 pacientes tratados com DG tipo 1 do estado de Minas Gerais quanto a atividade de QT e genótipo de CHIT1, sendo 17 (51,5%) do sexo feminino e 16 (48,5%) do sexo masculino. A média de idade entre eles foi de 29

anos (de 5 a 62 anos). Todos os pacientes são atendidos pelo Ambulatório de Hematologia do HC-UFG.

A atividade de QT foi, de forma geral, 176 vezes mais elevada nos pacientes tratados com DG tipo 1 do que nos indivíduos saudáveis. Este resultado está de acordo com estudos anteriores, que mostram que a atividade da enzima está de 100 a 1.000 vezes mais elevada nestes pacientes (AGUILERA et al., 2003; HOLLAK et al., 1994; WAJNER et al., 2004; WAJNER et al., 2007).

Apesar de apresentar um aumento bastante pronunciado, a causa de sua elevação ainda não está completamente estabelecida (WAJNER et al., 2007). Alguns estudos destacam que essa elevação pode ser ocasionada pelo acúmulo de componentes imunogênicos nos macrófagos, tais como ceramida e esfingolipídeos. Tal acúmulo provoca ativação celular e conseqüentemente secreção de QT, que, por sua vez, pode mediar a resposta imunes envolvida nesta patologia (BALLOU et al., 1996; VAN EIJK, et al., 2005).

Os macrófagos são considerados importantes componentes do sistema imune e é a principal fonte de QT (MALAGUARNERA, 2006). Em certas condições, a QT é a principal proteína secretada, representando cerca de 1% do total (BOOT et al., 1995). O papel desta enzima como elemento do sistema imune emergiu de estudos que demonstraram que sua atividade está elevada em indivíduos infectados por *P. falciparum* (BARONE et al., 2003) e em infecções fúngicas (GORDON-THOMSON et al., 2009; LABADARIDIS et al., 1998; VAN EIJK, et al., 2005) e bacterianas (IYER et al., 2009) e que indivíduos que apresentam genótipo dup24/dup24 são mais susceptíveis a infecções por nematódeos (CHOI et al., 2001).

Evidências adicionais da possível participação da enzima na resposta imune do hospedeiro surgiram com a observação de que importantes moduladores da resposta imune, como IFN- $\gamma$ , LPS, TNF- $\alpha$  (DI ROSA et al., 2005; MALAGUARNERA et al., 2005), IL-12 (LAUW et al., 1999) e prolactina (MALAGUARNERA et al., 2004), aumentam a expressão de CHIT1 em macrófagos, enquanto IL-10, um importante imunossupressor, provoca a supressão de sua expressão (DI ROSA et al., 2005). Juntos, esses achados sugerem uma forte ligação entre os eventos envolvendo importantes citocinas imunomodulatórias e atividade de QT na proteção contra infecções.

Além de estar bastante elevada, a atividade de QT mostrou-se altamente variável entre os pacientes com DG tipo 1 e entre os indivíduos do grupo controle. A alta variabilidade pode ser explicada pela influência de vários fatores, como massa corporal, idade e gravidade da doença.

Giraldo e colaboradores (2001) verificaram uma correlação entre a atividade da enzima e índice de massa corporal dos indivíduos. Além disso, observaram que indivíduos adultos apresentaram atividade de QT maior que crianças. A correlação entre atividade de

QT e idade dos indivíduos foi observada também por Czartoryska e co-autores (1998), Guo e colaboradores (1995), e Kurt e co-autores (2007). Entretanto, no presente estudo, nenhuma correlação foi encontrada entre estes parâmetros, podendo ser atribuída ao pequeno número de amostras estudadas quando comparado com outros trabalhos da literatura.

Outro fator que pode contribuir para a alta variabilidade observada na atividade de QT é a gravidade da DG entre os pacientes. Foi observado que pacientes com casos mais graves da doença apresentam atividade de QT mais elevada do que aqueles com quadros mais leves (BOOT et al., 2004; CABRERA-SALAZAR et al., 2004; CZARTORYSKA et al., 2000; HOLLAK et al., 2001; GIRALDO et al., 2001). É importante ressaltar, entretanto, que a QT não reflete um sintoma particular, mas é associada com a carga total da doença (BOOT et al., 2004; BUSSINK et al., 2006; LUKINA et al., 2010).

Para que a QT possa ser utilizada como biomarcador para a DG, é necessário que o genótipo dos pacientes sejam conhecidos. A principal alteração descrita para o gene CHIT1 é dup24, um polimorfismo amplamente distribuído nos diversos grupos étnicos. Estima-se que, de forma geral, 6% da população seja homocigota para dup24, apresentando atividade de QT nula, enquanto cerca de 35% é heterocigota, produzindo apenas metade da enzima ativa (BOOT et al., 1998). As tabelas 3 e 4 destacam a grande variedade de frequências observadas entre as diversas populações e entre diferentes grupos de pacientes com DG.

Tabela 3 – Frequência de dup24 em diversas populações

POPULAÇÃO	N	GENÓTIPO			REFERÊNCIA
		wt/wt (%)	wt/dup24 (%)	dup24/dup24 (%)	
Holanda	171	58,5	35,1	6,4	Boot et al. (1998)
Judeus Ashkenazi	68	60,3	33,8	5,9	Boot et al. (1998)
Portugual	295	60	37,3	2,7	Rodrigues et al. (2004)
Espanha	116	54,3	39,6	6,03	Canudas et al. (2001)
Sicília	100	51,01	44,54	5,45	Malaguarnera et al. (2003)
Sardinha	107	65,56	32,71	3,73	Malaguarnera et al. (2003)
Benin	100	100	0	0	Malaguarnera et al. (2003)
Burkina Faso	100	98	2	0	Malaguarnera et al. (2003)
Sul da Índia	180	32,2	47,2	20,6	Choi et al. (2001)
Taiwan	82		69,5	30,5	Chien et al (2005)
Papua-Nova Guiné	906	76,6	22,6	0,8	Hise et al. (2003)
França	128	59,4	31,3	9,3	Piras et al. (2007)
Itália	99	63,7	34,3	2	Piras et al. (2007)
Turquia	95	66,3	29,5	4,2	Piras et al. (2007)

Brasil	122	48	43	9	Rodrigues et al. (2010)
Minas Gerais	33	45,5	45,5	9	Presente estudo

Tabela 4 – Frequência de dup24 entre os pacientes com DG de diversas populações

POPULAÇÃO	N	GENÓTIPO			REFERÊNCIA
		wt/wt (%)	wt/dup24(%)	dup24/dup24 (%)	
Nova York	320	58,8	37,2	4	Grace et al. (2007)
Alemanha	28	68	32	0	Ries et al. (2006)
Israel	91	63,7	36,3	0	Schoonhoven et al. (2007)
Holanda	86	67	27	6	Bussink et al. (2009)
São Paulo	14		93	7	Rodrigues et al. (2009)
Minas Gerais	33	70	21	9	Presente estudo

Podemos observar que para os grupos étnicos de Benin e Burkina Faso, uma baixa incidência da mutação foi encontrada. Malaguarnera e colaboradores (2003) sugerem que a alta incidência de doenças parasitárias na região africana pode contribuir para a manutenção do alelo tipo selvagem na população, uma vez que a enzima atua na defesa contra patógenos. Esta hipótese foi corroborada pelo estudo de Choi e colaboradores (2001), os quais observaram que entre a população residente de áreas endêmicas para a filariose, indivíduos homozigotos para dup24 são mais susceptíveis a infecção do que indivíduos que apresentam o genótipo selvagem.

No presente estudo, também verificamos um desvio da frequência relatada na literatura. Entre os pacientes com DG tipo 1, 70%, 21% e 9% são wt/wt, wt/dup24 e dup24/dup24, respectivamente. O desvio encontrado pode ser atribuído ao pequeno número de amostras avaliadas quando comparado com outros trabalhos da literatura ou, ainda, ao viés de seleção, uma vez que, entre os pacientes com DG tipo 1 existem 7 famílias, e portanto, 14 indivíduos aparentados. Dessa forma, o presente estudo reforça o proposto por Malaguarnera (2006), que destacou que a diferença da incidência de dup24 entre os diversos grupos étnicos é uma questão bastante instigante e que mais estudos são necessários para determinar se alguma pressão seletiva pode ter influenciado polimorfismos no gene CHIT1.

O resultado da genotipagem para dup24 mostra que a QT pode ser utilizada como marcador bioquímico em 82% dos pacientes com DG avaliados, enquanto 18% não podem ser monitorados quanto à presença da enzima no plasma. Apesar de ser a principal mutação já descrita em CHIT1, dup24 não é a única com implicações para o diagnóstico e

monitoramento terapêutico dos pacientes. Podemos verificar que três pacientes com DG não apresentaram correspondência entre atividade de QT e genótipo para dup24, sugerindo a presença de outras alterações moleculares em CHIT1. Dois destes pacientes com o genótipo wt/wt (P1 e P2) apresentaram o polimorfismo G102S, apesar de um deles (P2) ser heterozigoto.

Grace e colaboradores (2007) estudaram o efeito deste polimorfismo na eficiência catalítica de QT. Os autores observaram que G102S, que prediz uma substituição de glicina para serina, provoca uma redução de aproximadamente cinco vezes na eficiência catalítica de QT quando comparado com a enzima selvagem. Entretanto, Lee e colaboradores (2007) não observaram nenhum efeito deste polimorfismo na atividade da enzima.

Dois anos mais tarde, Bussink e co-autores (2009) fizeram uma importante observação com relação a G102S. Quando a atividade de QT foi avaliada utilizando o substrato 4-MU-quitotriosídeo, a enzima recombinante SerQT apresentou reduzida atividade quando comparada com a enzima recombinante GlyQT selvagem. Entretanto, a atividade de SerQT foi normal quando avaliada com o substrato 4-MU-deoxiquitobiosídeo. Dessa forma, o conhecimento do genótipo de G102S é fundamental para a interpretação da atividade de QT quando é realizada com 4-MU-quitotriosídeo. No presente estudo, todas as dosagens de QT foram realizadas utilizando 4-MU-quitotriosídeo como substrato, o que pode explicar a baixa atividade enzimática obtida para os dois pacientes portadores do polimorfismo G102S.

O paciente P3, por sua vez, apresentou alterações mais complexas em CHIT1. Além de ser heterozigoto para dup24, ele apresentou o polimorfismo G354R no éxon 11, uma substituição de glicina para arginina na posição 354 do polipeptídeo. O polimorfismo G354R está associado com reduzida atividade de QT nos pacientes (GRACE et al., 2007; LEE et al., 2007). Além dessas duas alterações, o paciente apresentou uma deleção de 4 pb na junção éxon/íntron 11, envolvendo as duas últimas bases do último códon (códon 385) e as duas primeiras posições do íntron 11.

Grace e colaboradores (2007) descreveram uma mutação parecida em um paciente com DG tipo 1. Este paciente apresentou, além do polimorfismo G354R, uma mudança silenciosa da base da terceira posição do códon 385 (L385L) e uma deleção de 4 pb no íntron 11, alterando o sítio doador de *splice* em 5'. Ao avaliar a expressão deste alelo complexo, os autores encontraram seis sequências de cDNA derivadas de CHIT1, das quais duas tiveram alterações de *splicing*. Uma delas não apresentava o éxon 11, mas tinha o éxon 12, raramente utilizado (BOOT et al., 1998), enquanto o outro cDNA não apresentava os éxons 11 e 12. As quatro sequências de cDNA restantes apresentaram *splicing* normal, mas continham as duas alterações: G354R e L385L. Por se tratar de outro alelo nulo, nenhuma atividade de QT foi detectada neste paciente.

A deleção de 4 pb identificada no paciente P3 também altera o sítio doador de *splice* em 5'. Como pode ser observado na figura 8, a sequência deste paciente parecia em apenas 6 das 9 posições da sequência consenso do sítio doador de *splice* em 5'. Isso, provavelmente, leva a um erro de *splice* e à produção de uma enzima truncada, fato que explica a atividade QT nula observada para este paciente.

<b>Consenso:</b>	(A/C)AGgt(a/g)agt
<b>Referência:</b>	TGAgtaagtaagggg
<b>E/I-10:</b>	TAAgtaagtaagggg
<b>P3:</b>	TGAgtaagtaagggg

Fig. 7: **Representação da junção éxon/intron 11 do gene CHIT1.** 'Consenso' representa a sequência consenso do sítio doador de *splice* em 5'. 'Referência' representa a sequência referência do gene CHIT1 (NCBI). 'E/I-10' representa a mutação identificada por Grace et al., (2007); a base destacada em cinza representa o polimorfismo L385L e a região sublinhada corresponde a sequência deletada. 'P3' representa a mutação encontrada neste estudo; a região sublinhada corresponde aos 4 pb deletados.

Nosso trabalho apresenta dados importantes com relação à atividade de QT e genótipo de CHIT1 dos pacientes com DG tipo 1 de Minas Gerais. Esta doença, por sua vez, é considerada rara e pouco conhecida no meio médico nacional, fato observado pela demora do diagnóstico após o paciente ter dado início às suas manifestações clínicas. Estudos relacionados a esta doença podem auxiliar na sua divulgação bem como contribuir para a organização e a melhoria da atenção médica aos seus portadores. Acreditamos que os dados apresentados neste estudo podem ser utilizados para um monitoramento mais efetivo da progressão e efetividade de tratamento da doença, refletindo, assim, na qualidade de vida dos pacientes.

## **CONCLUSÕES**



- A técnica da dosagem da atividade de QT deve ser padronizada em cada laboratório de referência a fim de se obter otimização do ensaio.
- As dosagens de QT para os pacientes com DG tipo 1 devem ser realizadas sempre no mesmo laboratório e sob as mesmas condições experimentais, minimizando, dessa forma, erros na interpretação dos resultados.
- Para uma avaliação e monitoramento terapêutico efetivos em pacientes com DG, a análise molecular em CHIT1 é de fundamental importância.
- A genotipagem revelou que a QT pode ser utilizada como marcador bioquímico em 82% dos pacientes com DG tipo 1 avaliados. 18% dos pacientes apresentaram alterações em CHIT1 e, por isso, não podem ser monitorados quanto à presença da enzima no plasma.
- Em caso de não correspondência entre atividade de QT e genótipo de dup24, a pesquisa de outros polimorfismos deve ser realizada, tendo em vista a importância da enzima no diagnóstico e monitoramento terapêutico dos pacientes.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AGUILERA, B.; GHAUHARALI-VAN DER VLUGT, K.; HELMOND, M.T.J.; OUT, J.M.M.; DONKER-KOOPMAN, W.E.; GROENER, J.E.M.; BOOT, R.G.; RENKEMA, G.H.; VAN DER MAREL, G.A.; VAN BOOM, J.H.; OVERKLEEF, H.S.; AERTS, J.M.F.G. Transglycosidase activity of chitotriosidase: improved enzymatic assay for the human macrophage chitinase. *J Biol Chem*, v. 278, n. 42, p. 40911-40916, out. 2003.

ALFONSO, P.; PAMPÍN, S.; ESTRADA, J.; RODRÍGUEZ-REY, J.C.; GIRALDO, P.; SANCHO, J.; POCÓVI, M. Miglustat (NB-DNJ) works as a chaperone for mutated acid  $\beta$ -glucosidase in cells transfected with several Gaucher disease mutations. *Blood Cells Mol Dis*, v. 35, n. 2, p. 268-276, set.-out. 2005.

ARTIEDA, M.; CENARRO, A.; GAÑÁN, A.; JERICÓ, I.; GONZALVO, C.; CASADO, J. M.; VITORIA, I.; PUZO, J.; POCÓVI, M.; CIVEIRA, F. Serum chitotriosidase activity is increases in subjets with atherosclerosis disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, v. 23, n. 9, p. 1645-1652, set. 2003.

AVIEZER, D.; BRILL-ALMON, E.; SHAALTIEL, Y.; HASHMUELI, S.; BARTFELD, D.; MIZRACHI, S.; LIBERMAN, Y.; FREEMAN, A.; ZIMRAN, A.; GALUN, E.. A plant-derived recombinant human glucocerebrosidase enzyme - a preclinical and phase I investigation. *PLoS ONE*, v. 4, n. 3, p. 1-6, mar. 2009.

BALLOU, L.R.; LAULEDERKIND, S.J.; ROSLONIEC, E.F.; RAGHOW, R. Ceramide signaling and the immune response. *Biochim Biophys Acta*, v. 1301, n. 3, p. 273-287, jun. 1996.

BALDELLOU, A.; ANDRIA, G.; CAMPBELL, P.E.; CHARROW, J.; COHEN, I.J.; GRABOWSKI, G.A.; HARRIS, C.M.; KAPLAN, P.; McHUGH, K.; MENGEL, E.; VELLODI, A. Paediatric non-neuronopathic Gaucher disease: recommendations for treatment and monitoring. *Eur J Pediatr*, v. 163, n. 2, p. 65-67, fev. 2004.

BARAK, V.; ACKER, M.; NISMAN, B.; KALICKMAN, I.; ABRAHAMOV, A.; ZIMRAN, A.; YATZIV, S. Cytokines in Gaucher's disease. *Eur Cytokines Netw*, v. 10, n. 2, p. 205-210, jun. 1999.

BARBOSA, A. **Otimização de metodologias para determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos:** aplicação em água do Rio Potengi. 2008. 162f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências Exatas e da Terra, Natal.

BARONE, R.; DI GREGORIO, F.; ROMEO, M.A.; SCHILIRÒ, G.; PAVONE, L. Plasma chitotriosidase activity in patients with  $\beta$ -thalassemia. *Blood Cells Mol Dis*, v. 25, n. 1, p. 1-8, fev. 1999.

BARONE, R.; SIMPORÉ, J.; MALAGUARNERA, L.; PIGNATELLI, S.; MUSUMECI, S. Plasma chitotriosidase activity in acute *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Chim Acta*, v. 331, p. 79-85, maio 2003.

BARRANGE, J.A.; RICE, E.O.; DUNIGAN, J.; SANSIERI, C.; TAKIYAMA, N.; BEELER, M.; LANCIA, J.; LUCOT, S.; SCHEIRER-FOCHLER, S.; MOHNEY, T.; SWANEY, W.; BAHNSON, A.; BALL, E. Gaucher's disease: studies of gene transfer to haematopoietic cells. *Baillière's Clin Haematol*, v.10, n. 4, p. 765-778, dez. 1997.

BARTON, N.W.; FURBISH, F.S.; MURRAY, G.J.; GARFIELD, M.; BRADY, R.O. Therapeutic response to intravenous infusions of glucocerebrosidase in a patient with Gaucher disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 87, n. 5, p. 1913-1916, mar.1990.

- BECK, M. Therapy for lysosomal storage disorders. *IUBMB Life*, v. 62, n. 1, p. 33-40, jan. 2010.
- BERG-FUSSMAN, A.; GRACE, M.E.; IOANNOU, Y.; GRABOWSKI, G.. Human acid  $\beta$ -glucosidase: N-glycosylation site occupancy and the effect of glycosylation on enzymatic activity. *J Biol Chem*, v. 268, n. 20, p. 14861-14866, jul. 1993.
- BERGMANN, J.E.; GRABOWSKI, G.A. Posttranslational processing of human lysosomal acid  $\beta$ -glucosidase: a continuum of defects in gaucher disease type I and type 2 fibroblasts. *Am J Hum Gene.*, v. 44, n. 5, p. 741-750, maio 1989.
- BEUTLER, E. Gaucher disease: new molecular approaches to diagnosis and treatment. *Science*, v. 256, n. 5058, p. 794-799, maio 1992.
- BEUTLER, E.; DEMINA, A.; GELBART, T. Glucocerebrosidase mutations in Gaucher disease. *Mol Med*, v. 1, n. 1, p. 82-92, nov. 1994.
- BEUTLER, E.; KAY, A.; SAVEN, A.; GAMER, P.; THURSTON, D.; DAWSON, A.; ROSENBLOOM, B. Enzyme replacement therapy for Gaucher disease. *Blood*, vol. 78, n. 5, p. 1183-1189, set. 1991.
- BOHLEGA, S.; KAMBOURIS, M.; SHAHID, M.; AL HOMSI, M.; AL SOUS, W. Gaucher disease with oculomotor apraxia and cardiovascular calcification (Gaucher type IIIC). *Neurology*, v. 54, n. 1, p. 261-263, jan. 2000.
- BOOT, R.G.; HOLLAK, C.E.M.; VERHOEK, M.; ALBERTS, C.; JONKERS, R.E.; AERTS, J.M. Plasma chitotriosidase and CCL18 as surrogate markers for granulomatous macrophages in sarcoidosis. *Clin Chim Acta*, v. 411, n. 1-2, p. 31-36, jan. 2010.
- BOOT, R.G.; RENKEMA, G.H.; STRIJLAND, A.; VAN ZONNEVELD, A.J.; AERTS, J.M.F.G. Cloning of a cDNA encoding chitotriosidase, a human chitinase produced by macrophages. *J Biol Chem*, v. 270, n. 44, p. 26252-26256, nov. 1995.
- BOOT, R.G.; RENKEMA, G.H.; VERHOEK, M.; STRIJLAND, A.; BLIEK, J.; MEULEMEESTER, T.M.A.M.O.; MANNENS, M.M.A.M.; AERTS, J.M.F.G. The human chitotriosidase gene: nature of inherited enzyme deficiency. *J Biol Chem*, v. 273, n. 40, p. 25680-25685, out. 1998.
- BOOT, R.G.; VAN AQTERBERG, T.A.E.; VAN AKEN, B.E.; RENKEMA, G.H.; JACOBS, M.J.H.M.; AERTS, J.M.F.G.; DE VRIES, C.J.M. Strong induction of members of the chitinase family of proteins in atherosclerosis chitotriosidase and human cartilage gp-39 expressed in lesion macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, v. 19, n. 3, p. 687-694, mar. 1999.
- BOOT, R.G.; VERHOEK, M.; DE FOST, M.; HOLLAK, C.E.M.; MAAS, M.; BLEIJLEVENS, B.; VAN BREEMEN, M.J.; VAN MEURS, M.; BOVEN, L.A.; LAMAN, J.D.; MORAN, M.T.; COX, T.M.; AERTS, J.M.F.G. Marked elevation of the chemokine CCL18/PARC in Gaucher disease: a novel surrogate marker for assessing therapeutic intervention. *Blood*, v. 103, n. 1, p. 33-39, jan. 2004.
- BOUZAS, L.; GUINARTE, J.C.; TUTOR, J.C. Chitotriosidase activity in plasma and mononuclear and polymorphonuclear leukocyte populations. *J Clin Lab Anal*, v. 17, n. 6, p. 271-275, 2003.
- BRADY, R.O. Gaucher's disease: past, present and future. *Baillière's Clin Haematol*, v. 10, n. 4, p. 621-634, dez. 1997.

- BRADY, R.O.; KANFER, J.; SHAPIRO, D. The metabolism of glucocerebrosides. I. Purification and properties of a glucocerebroside-cleaving enzyme from spleen tissue. *J Biol Chem*, v. 240, n. 1, p. 39-43, jan. 1965.
- BRINKMAN, J.; WIJBURG, F.A.; HOLLAK, C.E.; GROENER, J. E.; VERHOEK, M.; SCHEIJ, S.; ATEN, J.; BOOT, R.G.; AERTS, J.M. Plasma chitotriosidase and CCL18: early biochemical surrogate markers in type B Niemann-Pick disease. *J Inherit Metab Dis*, v. 28, n. 1, p. 13-20, 2005.
- BRUMSHTEIN, B.; SALINAS, P.; PETERSON, B.; CHAN, V.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J.L.; SAVICKAS, P.J.; ROBINSON, G.S.; FUTERMAN, A.H. Characterization of gene-activated human acid- $\beta$ -glucosidase: crystal structure, glycan composition, and internalization into macrophages. *Glycobiology*, v. 20, n. 1, p. 24-32, jan. 2010.
- BRUNEL-GUITTON, C.; RIVARD, G.E.; GALIPEAU, J.; ALOS, N.; MIRON, M.C.; THERRIEN, R.; MITCHELL, G., LAPIERRE, G.; LAMBERT, M. Enzyme replacement therapy in pediatric patients with Gaucher disease: What should we use as maintenance dosage? *Mol Genet Metab*, v. 96, n. 2, p. 73-76, fev. 2009.
- BUSSINK, A.P.; VAN EIJK, M.; RENKEMA, G.H.; AERTS, J.M.; BOOT, R.G. The biology of the Gaucher cell: the cradle of human chitinases. *Int Rev Cytol*, v. 252, p. 71-128, 2006.
- BUSSINK, A.P.; VERHOEK, M.; VREEDE, J.; GHAUHARALI-VAN DER VLUGT, K.; DONKER-KOOPMAN, W.E.; SPRENGER, R.R., HOLLAK, C.E.; AERTS, J. M.F.G.; BOOT, R.G. Common G102S polymorphism in chitotriosidase differentially affects activity towards 4-methylumbelliferyl substrates. *FEBS J*, v. 276, n. 19, p. 5678-5688, out. 2009.
- CABRERA-SALAZAR, M.A.; O'ROURKE, E.; HENDERSON, N.; WESSEL, H.; BARRANGER, J.A. Correlation of surrogate markers of Gaucher disease: implications for long-term follow up of enzyme replacement therapy. *Clin Chim Acta*, v. 344, n. 1-2, p. 101-107, jun. 2004.
- CAI, C.L.; ZHOU, X.; ZHAO, L.; YAO, X.J.; TU, J.C.; ZHENG, F.; QU, X.Y. Optical detection of plasma chitotriosidase activity in healthy Chinese children using fluorescence spectrophotometry. *Clin Chim Acta*, v. 379, n. 1-2, p.134-138, abr. 2007.
- CANUDAS, J.; CENARRO, A.; CIVEIRA, F.; GARCÍA-OTÍN, A.L.; ARÍSTEGUI, R.; DÍAZ, C.; MASRAMON, X.; SOL, J.M.; HERNÁNDEZ, G.; POCOVÍ, M. Chitotriosidase genotype and serum activity in subjects with combined hyperlipidemia: effect of the lipid-lowering agents, atorvastatin and bezafibrate. *Metabolism*, v. 50, n. 4, p. 447-450, abr. 2001.
- CHEN, M.; WANG, J.. Gaucher disease: review of the literature. *Arch Pathol Lab Med*, v. 132, n. 5, p. 851-853, maio 2008.
- CHIEN, Y.H.; CHEN, J.H.; HWU, W.L. Plasma chitotriosidase activity and malaria. *Clin Chim Acta*, v. 353, n. 1-2, p. 215, mar. 2005.
- CHOI, E.H.; ZIMMERMAN, P.A.; FOSTER, C.B.; ZHU, S.; KUMARASWAMI, V.; NUTMAN, T.B.; CHANOCK, S.J. Genetic polymorphisms in molecules of innate immunity and susceptibility to infection with *Wuchereria bancrofti* in South India. *Genes Immun*, v. 2, n.5, p. 248-253, ago. 2001.
- COMABELLA, M.; DOMÍNGUEZ, C.; RIO, J.; MARTÍN-GALLÁN, P.; VILCHES, A.; VILARRASA, N.; ESPEJO, C.; MONTALBAN, X. Plasma chitotriosidase activity in multiple sclerosis. *Clin Immunol*, v. 131, n. 2, p. 216-222, maio. 2009.

COSTELLO, R.; O'CALLAGHAN, T.; SÉBAHOUN, G. Gaucher disease and multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*, v. 47, n. 7, p. 1365-1368, jul. 2006.

COX, T.; LACHMANN, R.; HOLLAK, C.; AERTS, J.; VAN WEELY, S.; HREBÍČEK, M.; PLATT, F.; BUTTERS, T.; DWEK, R.; MOYSES, C.; GOW, I.; ELSTEIN, D.; ZIMRAN, A. Novel oral treatment of Gaucher's disease with N-butyldeoxynojirimycin (OGT 918) to decrease substrate biosynthesis. *Lancet*, v. 355, n. 9214, p. 1481-1485, abr. 2000.

COX-BRINKMAN, J.; VAN BREEMEN, M.J.; VAN MALDEGEM, B.T.; BOUR, L.; DONKER, W.E.; HOLLAK, C.E.M.; WIJBURG, F.A.; AERTS, J.M.F.G. Potential efficacy of enzyme replacement and substrate reduction therapy in three siblings with Gaucher disease type III. *J Inherit Metab Dis*, v. 31, n. 6, p. 745-752, dez. 2008.

CZARTORYSKA, B.; TYLKI-SZYMANSKA, A.; LUGOWSKA, A. Serum chitotriosidase activity in Gaucher patients on enzyme replacement therapy (ERT). *Clin Biochem*, v. 31, n. 5, p. 417-420, jul. 1998.

CZARTORYSKA, B.; TYLKI-SZYMANSKA, A.; LUGOWSKA, A. Changes in serum chitotriosidase activity with cessation of replacement enzyme (cerebrosidase) administration in Gaucher Disease. *Clin Biochem*, v. 33, n. 2, p. 147-149, mar. 2000.

DEEGAN, P.B.; MORAN, M.T.; McFARLANE, I.J.; SCHOFIELD, P.; BOOT, R.G.; AERTS, J.M.F.G.; COX, T.M. Clinical evaluation of chemokine and enzymatic biomarkers of Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis*, v. 35, n. 2, p. 259-267, set.-out., 2005.

DE FOST, M.; AERTS, J.M.F.G.; HOLLAK, C.E.M. Gaucher disease: from fundamental research to effective therapeutic interventions. *J Med*, v. 61, n. 1, p. 3-7, jan. 2003.

DI LUCA, M.; ROMI, R.; SEVERINI, F.; TOMA, L.; MUSUMECI, M.; FAUSTO, A. M.; MAZZINI, M.; GAMBELLINI, G.; MUSUMECI, S. High levels of human chitotriosidase hinder the formation of peritrophic membrane in anopheline vectors. *Parasitol Res*, v. 100, n. 5, p. 1033-1039, abr. 2007.

DI ROSA, M.; MUSUMECI, M.; SCUTO, A.; MUSUMECI, S.; MALAGUARNERA, L. Effect of interferon- $\gamma$ , interleukin-10, lipopolysaccharide and tumor necrosis factor- $\alpha$  on chitotriosidase synthesis in human macrophages. *Clin Chem Lab Med*, v. 43, n. 5, p. 499-502, 2005.

DVIR, H.; HARE, M.; McCARTHY, A.A.; TOKER, L.; SILMAN, I.; FUTERMAN, A.H.; SUSSMAN, J.L. X-ray structure of human acid- $\beta$ -glucosidase, the defective enzyme in Gaucher disease. *EMBO reports*, v. 4, n. 7, p. 704-709, jul. 2003.

EBLAN, M.J.; GOKER-ALPAN, O.; SIDRANSKY, E. Perinatal lethal Gaucher disease: a distinct phenotype along the neuronopathic continuum. *Fetal Pediatr Pathol*, v. 24, n. 4-5, p. 205-222, jul.-out. 2005.

EIBERG, H.; DEN TANDT, W.R. Assignment of human plasma methylumbelliferyl-tetra-N-acetylchitotetraoside hydrolase or chitinase to chromosome 1q by a linkage study. *Hum Genet*, v. 101, n. 2, p. 205-207, dez. 1997.

FERREIRA, J.S.; FERREIRA, V.L.P.C; FERREIRA, D.C. Estudo da doença de Gaucher em Santa Catarina. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 30, n. 1, p. 5-11, jan.-fev. 2008.

FROISSART, R. Biomarqueurs actuels et futurs de la maladie de Gaucher. *Rev Med Interne*, v. 27, p. S22-S25, mar. 2006.

FUSETTI, F.; VON MOELLER, H.; HOUSTON, D.; ROZEBOOM, H.J.; DIJKSTRA, B.W.; BOOT, R.G.; AERTS, J.M.F.G.; AALTEN, D.M.F.V. Structure of human chitotriosidase implications for specific inhibitor design and function of mammalian chitinase-like lectins. *J Biol Chem*, v. 277, n. 28, p. 25537-25544, jul. 2002.

GEORGE, R.; MCMAHON, J.; LYTTLE, B.; CLARK, B.; LIQTIN, A. Severe valvular and aortic arch calcification in a patient with Gaucher's disease homozygous for the D409H mutation. *Clin Genet*, v. 59, n. 5, p. 360-363, maio 2001.

GINNS, E.I.; CHOUDARY, P.V.; TSUJI, S.; MARTIN, B.; STUBBLEFIELD, B.; SAWYER, J.; HOZIER, J.; BARRANGER, J.A. Gene mapping and leader polypeptide sequence of human glucocerebrosidase: implications for Gaucher disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 82, n. 20, p. 7101-7105, out. 1985.

GIRALDO P., CENARRO A., ALFONSO P., PÉREZ-CALVO J.I., RUBIO-FÉLIX D., GIRALT M., POCOVI, M. Chitotr La Revue de Médecine Interne iosidase genotype and plasma activity with type 1 Gaucher's disease and their relatives (carriers and non-carriers). *Haematologica*, v. 86, n. 9, p.977-984, set. 2001.

GLEW, R.H.; BASU, A.; PRENCE, E.M.; REMALEY, A.T. Lysosomal storage diseases. *Lab Invest*, v. 53, n. 3, p. 250-269, set. 1985.

**GENZYME.** Modelo de bula: Cerezyme®. Disponível em: <[http://www.genzyme.com.br/thera/cz/br\\_pdf\\_cz\\_pi.pdf](http://www.genzyme.com.br/thera/cz/br_pdf_cz_pi.pdf)>. Acesso em: 11 nov. 2010.

GOKER-ALPAN, O.; SCHIFFMANN, R.; PARK, J.K.; STUBBLEFIELD, B.K.; TAYEBI, N.; SIDRANSKY, E. Phenotypic continuum in neuronopathic Gaucher disease: an intermediate phenotype between type 2 and type 3. *J Pediatr*, v. 143, n. 2, p. 273-276, ago. 2003.

GOLDBLATT, J. Type I Gaucher disease. *J Med Genet*, v. 25, n.6, p. 415-418, jun. 1988.

GORDON-THOMSON, C.; KUMARI, A.; TOMKINS, L.; HOLFORD, P.; DJORDJEVIC, J.T.; WRIGHT, L.C.; SORRELL, T.C.; MOORE, G.P.M. Chitotriosidase and gene therapy for fungal infections. *Cell Mol Life Sci*, v. 66, n. 6, p. 1116-1125, mar. 2009.

GORNATI, R.; BERRA, B.; MONTORFANO, G.; MARTINI, C.; CIANA, G.; FERRARI, P.; ROMANO, M.; BEMBI, B. Glycolipid analysis of different tissues and cerebrospinal fluid in type II Gaucher disease. *J Inherit Metab Dis*, v. 25, n. 1, p. 47-55, fev. 2002.

GRABOWSKI, G.A.; BARTON, N.W.; PASTORES, G.; DAMBROSIA, J.M.; BANERJEE, T.K.; MCKEE, M.A.; PARKER, C.; SCHIFFMANN, R.; HILL, S.C.; BRADY, R.O. Enzyme therapy in type 1 Gaucher disease: comparative efficacy of mannose-terminated glucocerebrosidase from natural and recombinant sources. *Ann Intern Med*, v. 122, n.1, p. 33-39, jan. 1995.

GRABOWSKI, G.A.; SAAL, H.M.; WENSTRUP, R.J.; BARTON, N.W. Gaucher disease: a prototype for molecular medicine. *Crit Rev Oncol Hematol*, v. 23, n. 1, p. 25-55, maio 1996.

GRACE, M.E.; NEWMAN, K.M.; SCHEINKER, V.; BERG-FUSSMAN, A.; GRABOWSKI, G.A. Analysis of human acid  $\beta$ -glucosidase by site-directed mutagenesis and heterologous expression. *J Biol Chem*, v. 269, n. 3, p. 2283-2291, jan. 1994.

GRACE, M.E.; BALWANI, M.; NAZARENKO, I.; PRAKASH-CHENG, A.; DESNICK, R.J. Type 1 Gaucher disease: null and hypomorphic novel chitotriosidase mutations - implications for diagnosis and therapeutic monitoring. *Hum Mutat*, v. 28, n. 9, p. 866-873, set. 2007.

GUGGENBUHL, P.; GROSBOIS, B.; CHALÈS, G. Gaucher disease. *Joint Bone Spine*, v. 75, n. 2, p. 116-124, mar. 2008.

GUO, Y.; HE, W.; BOER, A.M.; WEVERS, R.A.; DE BRUIJN, A.M.; GROENER, J.E.; HOLLAK, C.E.; AERTS, J.M.; GALJAARD, H.; VAN DIGGELEN, O.P. Elevated plasma chitotriosidase activity in various lysosomal storage disorders. *J Inher Metab Dis*, v. 18, n. 6, p. 717-722, 1995.

HISE, A.G.; HAZLETT, F.E.; BOCKARIE, M.J.; ZIMMERMAN, P.A.; TISCH, D.J.; KAZURA, J.W. Polymorphisms of innate immunity genes and susceptibility to lymphatic filariasis. *Genes Immun*, v. 4, n.7, p. 524-527, out. 2003.

HOLLAK, C.E.M.; VAN WEELY, S.; VAN OERS, M.H.J.; AERTS, J.M.F.G. Marked elevation of plasma chitotriosidase activity: a novel hallmark of Gaucher disease. *J Clin Invest*, v. 93, n. 3, p. 1288-1292, mar. 1994.

HOLLAK, C.E.M.; EVERS, L.; AERTS, J.M.F.G.; VAN OERS, M.H.J. Elevated levels of M-CSF, SCD14 and IL8 in type 1 Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis*, v. 23, n. 11, p. 201-212, jun. 1997.

HOLLAK, C.E.M.; MAAS, M.; AERTS, J.M. Clinically relevant therapeutic endpoints in type I Gaucher disease. *J Inher Metab Dis*, v. 24, suppl. 2, p. 97-105, 2001.

HONG, Y.B.; KIM, E.Y.; YOO, H.W.; JUNG, S.C. Feasibility of gene therapy in Gaucher disease using an adeno-associated virus vector. *J Hum Genet*, v. 49, n. 10, p.536-543, set. 2004.

HUGHES, D.A.; PASTORES, G.M. The pathophysiology of GD - current understanding and rationale for existing and emerging therapeutic approaches. *Wien Med Wochenschr*, v. 160, n. 23-24, p. 594-599, dez. 2010.

HRUSKA, K.S.; LAMARCA, M.E.; SCOTT, C.R.; SIDRANSKY, E. Gaucher disease: mutation and polymorphism spectrum in the glucocerebrosidase gene (GBA). *Hum Mutat*, v. 29, n. 5, p. 567-583, maio 2008.

IYER, A.; VAN EIJK, M.; SILVA, E.; HATTA, M.; FABER, W.; AERTS, J.M.F.G.; DAS, P.K. Increased chitotriosidase activity in serum of leprosy patients: association with bacillary leprosy. *Clin Immunol*, v.131, n. 3, p. 501-509, jun. 2009.

JMOUDIAK, M.; FUTERMAN, A.H. Gaucher disease: pathological mechanisms and modern management. *Br J Haematol*, v. 129, n. 2, p. 178-188, abr. 2005.

KAHN, H.; PHELPS, R.G. Pseudogaucher cells in cutaneous *Mycobacterium avium* intracellulare infection: report of a case. *Am J Dermatopathol*, v. 21, n. 1, p. 51-54, fev. 1999.

KATTLOVE, H.E.; WILLIAMS, J.C.; GAYNOR, E.; SPIVACK, M.N; BRADLEY, R.M.; BRADY, R.O. Gaucher cells in chronic myelocytic leukemia: an acquired abnormality. *Blood*, v. 33, n. 2, p. 379-390, fev. 1969.

KOPRIVICA, V.; STONE, D.L.; PARK, J.K.; CALLAHAN, M.; FRISCH, A.; COHEN, I.J.; TAYEBI, N.; SIDRANSKY, E. Analysis and classification of 304 mutant alleles in patients with type 1 and type 3 Gaucher disease. *Am J Hum Genet*, v. 66, n. 6, p. 1777-1786, maio 2000.



KRUG, BÁRBARA CORRÊA. **Avaliação da implemetação do protocolo clínico e diretrizes terapêuticas do Ministério da Saúde para Doença de Gaucher no Centro de Referência Estadual:** impacto sobre os pacientes e sobre o Sistema Único de Saúde. 2007. 115f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

KURT, I.; ABASLI, D.; CIHAN, M.; SERDAR, M.A.; OLGUN, A.; SARUHAN, E.; ERBIL, M.K. Chitotriosidase levels in healthy elderly subjects. *Ann NY Acad Sci* v. 1100, p. 185-188, 2007.

LABADARIDIS, J.; DIMITRIOU, E.; COSTALOS, C.; AERTS, J.; VAN WEELY, S.; DONKER-KOOPMAN, W. E.; MICHELAKAKIS, H. Serial chitotriosidase activity estimations in neonatal systemic candidiasis. *Acta Paediatr*, v. 87, n. 5, p. 605-606, maio 1998.

LAUW, F.N.; VELDE, A.A.T.; DEKKERS, P.E.P.; SPEELMAN, P.; AERTS, J.M.F.G.; HACK, C.E.; VAN DEVENTER; S.J.H.; VAN DER POLL, T. Activation of mononuclear cells by interleukin-12: an in vivo study in chimpanzees. *J Clin Immunol*, v. 19, n. 4, p. 231-238, jul. 1999.

LEE, P.; WAALLEN, J.; CRAIN, K.; SMARGON, A.; BEUTLER, E. Human chitotriosidase polymorphisms G354R and A442V associated with reduced enzyme activity. *Blood Cells Mol Dis*, v. 39, n. 3, p. 353-360, nov.-dez. 2007.

LUKINA, E.; WATMAN, N.; ARREGUIN, E.A.; BANIKAZEMI, M.; DRAGOSKY, M.; IASTREBNER, M.; ROSENBAUM, H.; PHILLIPS, M.; PASTORES, G.M.; ROSENTHAL, D.I.; KAPER, M.; SINGH, T.; PUGA, A.C.; BONATE, P.L.; PETERSCHMITT, M.J. A phase 2 study of eliglustat tartrate (Genz-112638), an oral substrate reduction therapy for Gaucher disease type 1. *Blood*, v. 116, n. 6, p. 893-899, ago. 2010.

MALAGUARNERA, L.; MUSUMECI, M.; DI ROSA, M.; SCUTO, A.; MUSUMECI, S. Interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and lipopolysaccharide promote chitotriosidase gene expression in human macrophages. *J Clin Lab Anal*, v. 19, n. 3, p. 128-132, 2005.

MALAGUARNERA, L.; MUSUMECI, M.; LICATA, F.; DI ROSA, M.; MESSINA, A.; MUSUMECI, S. Prolactin induces chitotriosidase gene expression in human monocyte-derived macrophages. *Immunol Lett*, v. 94, n. 1-2, p. 57-63, jun. 2004.

MALAGUARNERA, L.; SIMPORÈ, J.; PRODI, D.A.; ANGIU, A.; SASSU, A.; PERSICO, I.; BARONED, 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*, v. 4, n. 8, p. 570-574, dez. 2003.

MALAGUARNERA, L. Chitotriosidase: the yin and yang. *Cell Mol Life Sci*, v. 63, n. 24, p. 3018-3029, dez. 2006.

MARTINS, A.M.; VALADARES, E.R.; PORTA, G.; COELHO, J.; SEMIONATO FILHO, J.; PIANOVSKI, M.A.D.; KERSTENETZKY, M.S.; MONTORIL, M.F.P.; ARANDA, P.C.; PIRES, R.F.; MOTA, R.M.V.; BORTOLHEIRO, T.C. Recommendations on diagnosis, treatment, and monitoring for Gaucher Disease. *J Pediatr*, v. 155, n. 4, p. 10-18, out. 2009.

MEIKLE, P.J.; WHITFIELD, P.D.; ROZAKLIS, T.; BLACKLOCK, D.; DUPLOCK, S.; ELSTEIN, D.; ZIMRAN, A.; MENGEL, E.; CANNELL, P.; HOPWOOD, J.J.; FULLER, M. Plasma lipids are altered in Gaucher disease: biochemical markers to evaluate therapeutic intervention. *Blood Cells Mol Dis*, v. 40, n. 3, p. 420-427, maio-jun. 2008.

MICHELIN, K.; WAJNER, A.; GOULART, L.S.; FACHEL, A.A.; PEREIRA, M.L.S.; MELLO, A.S.; SOUZA, F.T.S.; PIRES, R.F.; GIUGLIANI, R.; COELHO, J.C. Biochemical study on  $\beta$ -glucosidase in individuals with Gaucher's disease and normal subjects. *Clin Chim Acta*, v. 343, n. 1-2, p. 145-153, maio 2004.

MILLER, S.A.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, v. 16, n. 3, p. 1215, fev. 1988.

MISTRY, P.K.; ABRAHAMOV, A. A practical approach to diagnosis and management of Gaucher's disease. *Bailliere's Clin Haematol*, v. 10, n. 4, p. 817-838, dez. 1997.

MIZUKAMI, H.; MI, Y.; WADA, R.; KONO, M.; YAMASHITA, T.; LIU, Y.; WERTH, N.; SANDHOFF, R.; SANDHOFF, K.; PROIA, R.L. Systemic inflammation in glucocerebrosidase-deficient mice with minimal glucosylceramide storage. *J Clin Invest*, v. 109, n. 9, p. 1215-1221, maio 2002.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. NCBI. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>>.

NETPRIMER. Disponível em: <<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>>.

NILSSON, O.; SVENNERHOLM, L. Accumulation of glucosylceramide and glucosylsphingosine (psychosine) in cerebrum and cerebellum in infantile and juvenile Gaucher disease. *J Neurochem*, v. 39, n. 3, p. 709-718, set.1982.

NILSSON, O.; GRABOWSKI, G.A.; LUDMAN, M.D.; DESNICK, R.J.; SVENNERHOLM, L. Glycosphingolipid studies of visceral tissues and brain from type 1 Gaucher disease variants. *Clin Genet*, v. 27, n. 5, p. 443-450, maio 1985.

PIRAS, I.; MELIS, A.; GHIANI, M.E.; FALCHI, A.; LUISELLI, D.; MORAL, P.; VARESI, L.; CALÒ, C.M.; VONA, G. Human CHIT1 gene distribution: new data from Mediterranean and European populations. *J Hum Genet*, v. 52, n. 2, p. 110-116, 2007.

PLATT, F.M.; NEISES, G.R.; DWEK, R.A.; BUTTERS, T.D. N-Butyldeoxynojirimycin is a novel inhibitor of glycolipid biosynthesis. *J Biol Chem*, v. 269, n. 11, p. 8362-8365, mar. 1994.

QUINTANA, L.; MONASTERIO, A.; ESCUREDO, K.; AMO, J.D.; ALFONSO, P.; ELORTZA, F.; SANTA CRUZ, S.; SIMÓN, L.; MARTÍNEZ, A.; GIRALDO, P.; POCOVÍ, M.; CASTRILLO, J.L. Identification of chitotriosidase isoforms in plasma of Gaucher disease patients by two dimensional gel electrophoresis. *Biochim Biophys Acta*, v. 1764, n. 7, p. 1292-1298, jun. 2006.

RAGHAVAN, S.S.; TOPOL, J.; KOLODNY, E.H. Leukocyte  $\beta$ -glucosidase in homozygotes and heterozygotes for Gaucher disease. *Am J Hum Genet*, v. 32 n. 2, p. 158- 173, mar. 1980.

RENKEMA, G.H.; BOOT, R.G.; MUIJSERS, A.O.; DONKER-KOOPMAN, W.E.; AERTS, J.M.F.G. Purification and characterization of human chitotriosidase, a novel member of the chitinase family of proteins. *J Biol Chem*, v. 270, n. 5, p. 2198-2202, fev. 1995.

RENKEMA, G.H.; BOOT, R.G.; STRIJLAND, A.; DONKER-KOOPMAN, W.E.; VAN DEN BERG, M.; MUIJSERS, A.O.; AERTS, J.M.F.G. Synthesis, sorting, and processing into distinct isoforms of human macrophage chitotriosidase. *Eur J Biochem*, v. 244, n. 2, p. 279-285, mar. 1997.

RENKEMA, G.H.; BOOT, R.G.; AU, F.L.; DONKER-KOOPMAN, W.E.; STRIJLAND, A.; MUIJSERS, A.O.; HREBICEK, M.; AERTS, J.M.F.G. Chitotriosidase, a chitinase, and the 39-kDa human cartilage glycoprotein, a chitin-binding lectin, are homologues of family 18 glycosyl hydrolases secreted by human macrophages. *Eur J Biochem*, v. 251, p. 504-509, jan. 1998.

RIES, M; SCHAEFER, E; LUHRS, T; MANI, L; KUHN, J; VANIER, M.T.; RUMMENAUER, F.; GAL, A.; BECK, M.; MENGEL, E. 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.*, v. 29, n. 5, p. 647-52, out. 2006.

ROBINSON, D.B.; GLEW, R. H. Acid phosphatase in Gaucher's Disease. *Clin Chem*, v. 26, n. 3, p. 371-382, mar. 1980.

RODRIGUES, M.D.B.; MULLER, K.B.; PEREIRA, V.G.; MARTINS, A.M.; D'ALMEIDA, V. Chitotriosidase deficiency in Brazil: evaluation of enzyme activity and genotypes. *Blood Cells Mol. Dis*, v. 44, n. 4, p. 305-306, abr. 2010.

RODRIGUES, M.D.B.; OLIVEIRA, A.C.; MÜLLER, K.B.; MARTINS, A.M.; D'ALMEIDA, V. Chitotriosidase determination in plasma and in dried blood spots: a comparison using two different substrates in a microplate assay. *Clin Chim Acta*, v. 406, n. 1-2, p. 86-88, ago. 2009.

RODRIGUES, M.R.; SÁ MIRANDA, M.C.; AMARAL, O. Allelic frequency determination of the 24-bp chitotriosidase duplication in the Portuguese population by real-time PCR. *Blood Cells Mol Dis*, v. 33, n. 3, p. 362-364, nov-dez. 2004.

ROZENBERG, R. **Análise molecular das Doenças de Gaucher e Tay-Sachs no Brasil.** 2006. 123f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, São Paulo.

ROZEN, S.; SAKALETSKY, H. *Primer 3*. [Cambridge, MA]: Whitehead Institute for Biomedical Research, 2007. Disponível em: <<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>>.

SAWKAR, A.R.; CHENG, W.C; BEUTLER, E.; WONG, C.H.; BALCH, W.E.; KELLY, J.W. Chemical chaperones increase the cellular activity of N370S  $\beta$ -glucosidase: a therapeutic strategy for Gaucher disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 99, n. 24, p. 15428-15433, nov. 2002.

SCHOONHOVEN, A.; RUDENSKY, B.; ELSTEIN, D.; ZIMRAN, A.; HOLLAK, C.E.M.; GROENER, J.E.; AERTS, J.M.F.G. Monitoring of Gaucher patients with a novel chitotriosidase assay. *Clin Chim Acta*, v. 381, n. 2, p. 136-139, jun. 2007.

SIBILLE, A.; ENG, C.M.; KIM, S.J.; PASTORES, G.; GRABOWSKI, G.A. Phenotype/genotype correlations in Gaucher disease type I: clinical and therapeutic implications. *Am J Hum Genet*, v. 52, n. 6, p. 1094-1101, jun. 1993.

SIDRANSKY, E. Gaucher disease: complexity in a “simple” disorder. *Mol Genet Metab*, v. 83, n. 1-2, p. 6-15, set.-out. 2004.

SIDRANSKY, E.; GINNS, E.I. Gaucher's disease: the best laid schemes of mice and men. *Baillière's Clin Haematol*, v. 10, n. 4, p. 725-737, dez. 1997.

SORGE, J.; GROSS, E.; WEST, C.; BEUTLERT, E. High level transcription of the glucocerebrosidase pseudogene in normal subjects and patients with Gaucher disease. *J Clin Invest*, v. 86, n. 4, p. 1137-1141, out. 1990.

STAHL, P.D.; RODMAN, J.S.; MILLER, M.J.; SCHLESINGER, P.H. Evidence for receptor-mediated binding of glycoproteins, glycoconjugates, and lysosomal glycosidases by alveolar macrophages. *Proc Natl Acad Scm USA*, v. 75, n. 3, p. 1399-1403, mar. 1978.

STONE, D.L.; VAN DIGGELEN, O.P.; DE KLERK, J.B.C.; GAILLARD, J.L.J.; NIERMEIJER, M.F.; WILLEMSSEN, R.; TAYEBI, N.; SIDRANSKY, E. Is the perinatal lethal form of Gaucher disease more common than classic type 2 Gaucher disease? *Eur J Hum Genet*, v. 7, n. 4, p. 505-509, maio-jun. 1999.

STONE, D.L.; TAYEBI, N.; ORVISKY, E.; STUBBLEFIELD, B.; MADIKE, V.; SIDRANSKY, E. Glucocerebrosidase gene mutations in patients with type 2 Gaucher disease. *Hum Mutat*, v. 15, n. 2, p. 181-188, 2000.

TAYEBI, N.; CUSHNER, S.R.; KLEIJER, W.; LAU, E.K.; DAMSCHRODER-WILLIAMS, P.J.; STUBBLEFIELD, B.K.; HOLLANDER, J.D.; SIDRANSKY, E. Prenatal lethality of a homozygous null mutation in the human glucocerebrosidase gene. *Am J Med Genet*, v. 73, n. 1, p. 41-47, nov. 1997.

TAYEBI, N.; STUBBLEFIELD, B.K.; PARK, J.K.; ORVISKY, E.; WALKER, J.M.; LAMARCA, M.E.; SIDRANSKY, E. Reciprocal and nonreciprocal recombination at the glucocerebrosidase gene region: implications for complexity in Gaucher disease. *Am J Hum Genet*, v. 72, n. 3, p. 519-534, mar. 2003.

TSUJI, S.; CHOUDARY, P.V.; MARTIN, B.M.; WINFIELD, S.; BARRANGER, J.A.; GINNS, E.I. Nucleotide sequence of cDNA containing the complete coding sequence for human lysosomal GCCase. *J Biol Chem*, v. 261, n. 1, p. 50-53, jan. 1986.

TYLKI-SZYMANSKA, A.; CZARTORYSKA, B.; VANIER, M.T.; POORTHUIS, B.J.M.H.; GROENER, J.A.E.; QUGOWSKA, A.; MILLAT G.; VACCARO, A.M.; JURKIEWICZ, E. Non-neuronopathic Gaucher disease due to saposin C deficiency. *Clin Genet*, v. 72, n. 6, p. 538-542, dez. 2007.

VAN EIJK, M.; VAN ROOMEN, C.P.A.A.; RENKEMA, G.H.; BUSSINK, A.P.; ANDREWS, L.; BLOMMAART, E.F.C.; SUGAR, A.; VERHOEVEN, A.J.; BOOT, R.G.; AERTS, J.M.F.G. Characterization of human phagocyte-derived chitotriosidase, a component of innate immunity. *Int Immunol*, v. 17, n. 11, p. 1505-1512, nov. 2005.

VELLODI, A.; FOO, Y.; COLE, T.J. Evaluation of three biochemical markers in the monitoring of Gaucher disease. *J Inherit Metab Dis*, v. 28, n. 4, p. 585-592, 2005.

WAJNER A. ; MICHELIN K. ; BURIN M.G.; PIRES R.F.; PEREIRA M.L.S.; GIUGLIANI R.; COELHO, J.C. Biochemical characterization of chitotriosidase enzyme: comparison between normal individuals and patients with Gaucher and with Niemann–Pick diseases. *Clin Biochem*, v. 37, n. 10, p. 893-897, out. 2004.

WAJNER A. ; MICHELIN K. ; BURIN M.G.; PIRES R.F.; PEREIRA M.L.S.; GIUGLIANI R.; COELHO, J.C. 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*, v. 40, n. 5-6, p. 365-369, mar. 2007

WEINREB, N.J.; CHARROW, J.; ANDERSSON, H.C.; KAPLAN, P.; KOLODNY, E.H.; MISTRY, P.; PASTORES, G.; ROSENBLOOM, B.E.; SCOTT, C.R.; WAPPNER, R.S.; ZIMRAN, A. Effectiveness of enzyme replacement therapy in 1028 patients with type 1 Gaucher Disease after 2 to 5 years of treatment: a report from the Gaucher Registry. *Am J Med*, v. 113, n. 2, p. 112-119, ago. 2002.

WEINREB, N.J.; BARRANGER, J.A.; CHARROW, J.; GRABOWSKI, G.A.; MANKIN, H.J.; MISTRY, P. Guidance on the use of miglustat for treating patients with type 1 Gaucher Disease. *Am J Hematol*, v. 80, n. 3, p. 223-229, nov. 2005.

WINFIELD, S.L.; TAYEBI, N.; MARTIN, B.M.; GINNS, E.I.; SIDRANSKY, E. Identification of three additional genes contiguous to the glucocerebrosidase locus on chromosome 1q21: implications for Gaucher disease. *Genome Res*, v. 7, n. 10, p. 1020-1026, out. 1997.

ZIMRAN, A.; LOVEDAY, K.; FRATAZZI, C.; ELSTEIN, D. A pharmacokinetic analysis of a novel enzyme replacement therapy with Gene-Activated® human glucocerebrosidase (GA-GCB) in patients with type 1 Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis*, v. 39, n. 1, p. 115-118, jul-ago 2007.

ZIMRAN, A.; SORGE, J.; GROSS, E.; KUBITZ, M.; WEST, C.; BEUTLER, E. A glucocerebrosidase fusion gene in Gaucher disease: implications for the molecular anatomy, pathogenesis, and diagnosis of this disorder. *J Clin Invest*, v. 85, n. 1, p. 219-222, jan. 1990.

**APÊNDICES**

**APÊNDICE 1**

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para os pacientes com Doença de  
Gaucher tipo 1**

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS - UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**Pesquisa:** “Comparação do custo-eficácia do tratamento de Doença de Gaucher com imiglucerase antes e após estruturação da atenção médica e laboratorial ao paciente com DG em Minas Gerais”.

**Coordenadora:** Profa. Dra. Eugênia Ribeiro Valadares - Tel: (031) 3409-9262

**Pesquisadora:** Talita Émile Ribeiro Adelino – Tel: (031) 3409-9262

**Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG:** Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II 2º andar - SL 2005 - CEP: 31.270-901-BH/MG - Tel: (031) 3409-4592. e-mail: prpq@coep.ufmg.br

Prezado Senhor (a),

Você está sendo convidado para participar de uma pesquisa que propõe a estruturação da atenção médica e laboratorial ao paciente com Doença de Gaucher. A proposta é de atendimento clínico descentralizado para a Doença de Gaucher em Minas Gerais, que seja orientado e checado por uma equipe competente não ligada à indústria farmacêutica, e laboratório centralizado para análises enzimáticas e moleculares específicas, com dados clínicos e de exames complementares armazenados num programa para processamento de banco de dados.

Para participar desta pesquisa é necessário que o Sr.(a) permita que seus dados clínicos e laboratoriais sejam armazenados por seu médico num banco de dados computadorizado, sem a identificação da sua pessoa e que você preencha um questionário de avaliação de qualidade de vida.

O objetivo final deste estudo é o levantamento da evolução clínica e laboratorial dos pacientes com Doença de Gaucher, visando alcançar melhores resultados clínicos no tratamento com imiglucerase (Cerezyme®), a partir da adequação individual de doses com eficácia terapêutica ótima e menor custo.

Após realização dos exames, as amostras serão armazenadas durante um ano e então serão descartadas. É importante que você saiba que estes exames fazem parte da rotina de seu tratamento, não constituindo nenhum procedimento adicional.

Se concordar em participar, pedimos que assine esse papel. Se o Sr.(a) deseja mais esclarecimentos ou se tem qualquer dúvida sobre a pesquisa nós estamos dispostos a responder qualquer pergunta. Se o Sr(a). não quiser participar ou se quiser desistir em qualquer momento, isso não vai implicar em nenhum prejuízo de qualquer natureza para a sua pessoa ou familiares.

Autorizo a utilização e publicação dos dados clínicos e laboratoriais analisados e obtidos nesta pesquisa em revistas científicas, periódicos, livros, pôsteres, apresentações em slides e na dissertação de mestrado na qual este projeto está vinculado, sem a identificação do meu nome. Estou ciente de que não serei remunerado pelo uso destas informações.

Tenho ciência do exposto e concordo em participar deste estudo.

Belo Horizonte, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20 .

Assinatura do paciente ou responsável:

---

Testemunha: \_\_\_\_\_

Testemunha: \_\_\_\_\_



**HOSPITAL DAS CLÍNICAS - UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**Pesquisa:** “Comparação do custo-eficácia do tratamento de Doença de Gaucher com imiglucerase antes e após estruturação da atenção médica e laboratorial ao paciente com DG em Minas Gerais”.

**Coordenadora:** Profa. Dra. Eugênia Ribeiro Valadares - Tel: (031) 3409-9262

**Pesquisadora:** Talita Émile Ribeiro Adelino – Tel: (031) 3409-9262

**Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG:** Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II 2º andar - SL 2005 - CEP: 31.270-901-BH/MG - Tel: (031) 3409-4592. e-mail: prpq@coep.ufmg.br

Prezado Senhor (a),

Você está sendo convidado para participar de uma pesquisa que propõe a estruturação da atenção médica e laboratorial ao paciente com Doença de Gaucher. A proposta é de atendimento clínico descentralizado para a Doença de Gaucher em Minas Gerais, que seja orientado e checado por uma equipe competente não ligada à indústria farmacêutica, e laboratório centralizado para análises enzimáticas e moleculares específicas, com dados clínicos e de exames complementares armazenados num programa para processamento de banco de dados.

Para participar desta pesquisa é necessário que o Sr.(a) permita que seus dados clínicos e laboratoriais sejam armazenados por seu médico num banco de dados computadorizado, sem a identificação da sua pessoa e que você preencha um questionário de avaliação de qualidade de vida.

O objetivo final deste estudo é o levantamento da evolução clínica e laboratorial dos pacientes com Doença de Gaucher, visando alcançar melhores resultados clínicos no tratamento com imiglucerase (Cerezyme®) ou outra medicação, a partir da adequação individual de doses com eficácia terapêutica ótima e menor custo.

Após realização dos exames, as amostras serão armazenadas durante um ano e então serão descartadas. É importante que você saiba que estes exames fazem parte da rotina de seu tratamento, não constituindo nenhum procedimento adicional.

Se concordar em participar, pedimos que assine esse papel. Se o Sr.(a) deseja mais esclarecimentos ou se tem qualquer dúvida sobre a pesquisa nós estamos dispostos a responder qualquer pergunta. Se o Sr(a). não quiser participar ou se quiser desistir em qualquer momento, isso não vai implicar em nenhum prejuízo de qualquer natureza para a sua pessoa ou familiares.

Autorizo a utilização e publicação dos dados clínicos e laboratoriais analisados e obtidos nesta pesquisa em revistas científicas, periódicos, livros, pôsteres, apresentações em slides e na dissertação de mestrado na qual este projeto está vinculado, sem a identificação do meu nome. Estou ciente de que não serei remunerado pelo uso destas informações.

Tenho ciência do exposto e concordo em participar deste estudo.

Belo Horizonte, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20 .

Assinatura do paciente ou responsável:

---

Testemunha: \_\_\_\_\_

Testemunha: \_\_\_\_\_

**APÊNDICE 2**

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e questionário de estado de saúde para os voluntários**

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS - UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**Pesquisa:** “Comparação do custo-eficácia do tratamento de Doença de Gaucher com imiglucerase antes e após estruturação da atenção médica e laboratorial ao paciente com Doença de Gaucher no Estado de Minas Gerais”

**Coordenadora:** Profa. Dra. Eugênia Ribeiro Valadares

**Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG:** Av. Antônio Carlos, 6627 – Unidade Administrativa II – 2º andar – Sala 2005 – CEP: 31.270-901 – Belo Horizonte - MG – Telefax: (031) 3409-4592 – e-mail: coep@prpq.ufmg.br

Prezado Senhor (a),

Estamos realizando pesquisa que envolve a dosagem de quitotriosidase no sangue. A quitotriosidase é uma enzima que tem sido utilizada para ajuda ao diagnóstico e controle de algumas doenças, como a doença de Gaucher. Como o método está sendo implantado no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do Hospital das Clínicas da UFMG, necessitamos conhecer os valores de referência (valores encontrados em pessoas sadias) na nossa população.

Você está sendo convidado a participar como voluntário para estabelecermos os valores de referência da quitotriosidase no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do Hospital das Clínicas da UFMG.

Para participar da pesquisa, é necessário que você permita a coleta de 4 ml de sangue periférico para a realização da dosagem da atividade de quitotriosidase e responda um questionário contendo perguntas sobre seu estado de saúde. Este questionário, sem identificação do seu nome, será utilizado para informar se você possui alguma condição patológica que possa influenciar o resultado do exame. Após a realização do mesmo, sua amostra será armazenada durante um ano e então descartada.

Se concordar em participar, pedimos que assine esse papel. Caso deseje mais esclarecimentos ou se tem qualquer dúvida sobre a pesquisa nós estamos dispostos a responder qualquer pergunta. Se você não quiser participar ou se quiser desistir a qualquer momento, isso não vai implicar em nenhum prejuízo de qualquer natureza para a sua pessoa ou familiares.

Tenho ciência do exposto e concordo em participar deste estudo.

Belo Horizonte, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20 .

Assinatura do paciente ou responsável:

---

Testemunha: \_\_\_\_\_

Testemunha: \_\_\_\_\_

## QUESTIONÁRIO - ESTADO DE SAÚDE

**Pesquisa:** “Comparação do custo-eficácia do tratamento de Doença de Gaucher com imiglucerase antes e após estruturação da atenção médica e laboratorial ao paciente com Doença de Gaucher no Estado de Minas Gerais”

**Coordenadora:** Profa. Dra. Eugênia Ribeiro Valadares

### 1) Identificação do voluntário

Código: \_\_\_\_\_ Data de nascimento/idade: \_\_\_\_\_ Sexo: ( ) F ( ) M

**2) O senhor (a) possui alguma (as) das doenças ou hábitos listados abaixo? Caso positivo, marque com um 'x' nos parênteses correspondentes.**

- |   |                                      |
|---|--------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Hipotireoidismo          | <input type="checkbox"/> Artrite     |
| <input type="checkbox"/> Hipertireoidismo         | <input type="checkbox"/> Talassemia  |
| <input type="checkbox"/> Diabetes mellitus tipo 1 | <input type="checkbox"/> Malária     |
| <input type="checkbox"/> Diabetes mellitus tipo 2 | <input type="checkbox"/> Tabagismo   |
| <input type="checkbox"/> Dislipidemia             | <input type="checkbox"/> Etilismo    |
| <input type="checkbox"/> Infecção fúngica         | <input type="checkbox"/> Qual: _____ |
| <input type="checkbox"/> Infecção bacteriana      | <input type="checkbox"/> Qual: _____ |
| <input type="checkbox"/> Infecção viral           | <input type="checkbox"/> Qual: _____ |
| <input type="checkbox"/> Doença pulmonar          | <input type="checkbox"/> Qual: _____ |
| <input type="checkbox"/> Doença cardíaca          | <input type="checkbox"/> Qual: _____ |
| <input type="checkbox"/> Doença renal             | <input type="checkbox"/> Qual: _____ |
| <input type="checkbox"/> Doença hepática          | <input type="checkbox"/> Qual: _____ |
| <input type="checkbox"/> Doença óssea             | <input type="checkbox"/> Qual: _____ |
| <input type="checkbox"/> Doença neurológica       | <input type="checkbox"/> Qual: _____ |
| <input type="checkbox"/> Doença genética          | <input type="checkbox"/> Qual: _____ |
| <input type="checkbox"/> Doença auto-imune        | <input type="checkbox"/> Qual: _____ |
| <input type="checkbox"/> Neoplasia                | <input type="checkbox"/> Qual: _____ |

Se o senhor (a) possui alguma doença e/ou hábito não listada acima, favor citá-lo neste campo:

---



---

**3) O senhor(a) está fazendo uso de algum medicamento?**

- Não  
 Sim      Qual (is): \_\_\_\_\_

Agradecemos sua participação!