

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**AVALIAÇÃO ABRANGENTE DA DOENÇA DE GAUCHER: DA INFILTRAÇÃO  
DA MEDULA ÓSSEA AO TRATAMENTO COM ALFATALIGLICERASE**

Livia d'Avila Paskulin

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (Genética e Biologia Molecular).

Orientadora: Profa. Dra. Ida Vanessa Doederlein Schwartz

Porto Alegre, setembro de 2019.

Este trabalho foi desenvolvido no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e no Centro de Pesquisa Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

#### INSTITUIÇÕES FINANCIADORAS

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

FIPE-HCPA - Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

## **AGRADECIMENTOS**

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ida Vanessa D. Schwartz pela oportunidade ao longo desses 10 anos de trabalho em conjunto.

Ao Dr. Filippo Pinto Vairo, pela sua dedicação e parceria nestes 10 anos. Teu profissionalismo, dedicação e efetividade serão sempre um exemplo a ser seguido por mim!

Aos membros da banca avaliadora desse trabalho, Dr<sup>a</sup>. Maria Teresa Sanseverino, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Juliana Ávila Duarte e Prof. Dr. André Anjos da Silva e à relatora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lavínia Schuller-Faccini por aceitarem fazer parte deste trabalho e da minha história.

Aos membros do Grupo de Pesquisa em Doença de Gaucher do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) pela oportunidade de crescermos juntos e ao Serviço de Radiologia HCPA e à Dra. Débora Bertholdo pela ajuda ao longo destes anos.

Aos meus amigos e colegas de residência por me apoiarem neste longo e difícil caminho, me auxiliando nas atividades do dia-a-dia e por não me deixarem desistir nunca. Aos médicos contratados e professores do Serviço de Genética do HCPA, especialmente ao Prof. Dr. Jonas Saute, és exemplo de médico, professor e pesquisador a ser seguido por mim.

Um agradecimento muito especial à minha família: meu pai, que foi meu primeiro e melhor exemplo de dedicação à carreira médica e científica, exercendo sempre seu papel com ética e comprometimento; meu irmão, pelo exemplo e pelas conversas trocadas ao longo dessa trajetória; a minha mãe, que me forneceu total suporte ao longo desses anos, o que propiciou que eu pudesse me dedicar exclusivamente à minha formação e que, em conjunto com meu pai me ensinaram valores éticos que carreguei por todos os anos de pesquisa; e, finalmente, um agradecimento especial ao meu avô Cyro Paulo d'Ávila que, com sua paixão por livros, foi meu grande incentivador aos estudos.

Ao Victor Possebon Waghetti, que sempre esteve ao meu lado me apoiando e me dando forças ao longo destes anos.

E, por fim, aos pacientes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, que foram fundamentais para que este trabalho se concretizasse.

## SUMÁRIO

<b>Lista de abreviaturas</b> .....	6
<b>Lista de Figuras</b> .....	7
<b>Lista de Quadros e Tabelas</b> .....	8
<b>Resumo</b> .....	9
<b>Abstract</b> .....	11
<b>Capítulo I – Introdução</b> .....	13
1.1 Doença de Gaucher – Base Histórica.....	13
1.2 Epidemiologia.....	14
1.3 Fisiopatogenia.....	15
1.3.1 Fisiopatogenia da Doença Óssea.....	18
1.3.2 Base Genética e o Gene <i>GBA1</i> .....	19
1.4 Diagnóstico.....	20
1.5 Manifestações Clínicas.....	21
1.5.1 Manifestações Ósseas.....	23
1.5.2 Comorbidades Associadas.....	25
1.5.2.1 Doenças Onco-Hematológicas.....	25
1.5.2.2 Doença de Parkinson.....	25
1.5.3 Correlação Genótipo-Fenótipo.....	26
1.6 Tratamento.....	27
1.6.1 Terapia de Reposição Enzimática.....	27
1.6.1.1 A Alfataliglicerase.....	29
1.6.1.2 A Terapia Enzimática em Gestantes e Puérperas.....	31
1.6.2 Terapia de Redução de Substrato.....	33
1.6.3 O Manejo Clínico na DG tipo 2.....	33
1.6.4 Terapias Futuras.....	34
1.7 Seguimento Clínico.....	35
1.8 O Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas do Ministério da Saúde do Brasil .....	38
1.8.1 Indicação de Tratamento e Doses Recomendadas.....	38
1.8.2 Monitorização do Tratamento.....	39
1.8.3 Avaliação da Resposta Terapêutica.....	40

1.9 Ferramentas Utilizadas na Avaliação da Infiltração da Medula Óssea.....	41
1.9.1 O escore Bone Marrow Burden de Maas.....	42
1.9.2 O escore de Dusseldorf.....	46
1.9.3 Avaliações da Infiltração Medular a Longo Prazo.....	47
<b>Capítulo II – Objetivos.....</b>	<b>49</b>
2.1 Objetivos Gerais.....	49
2.2 Objetivos Específicos .....	49
<b>Capítulo III – Artigo 1 .....</b>	<b>50</b>
<b>Capítulo IV – Artigo 2 .....</b>	<b>68</b>
<b>Capítulo V – Artigo 3 .....</b>	<b>82</b>
<b>Capítulo VI – Artigo 4 .....</b>	<b>100</b>
<b>Capítulo VII – Discussão.....</b>	<b>102</b>
<b>Capítulo VIII – Conclusão.....</b>	<b>104</b>
<b>Capítulo IX – Perspectivas.....</b>	<b>106</b>
<b>Capítulo X – Referências Bibliográficas.....</b>	<b>107</b>
<b>Capítulo XI – Anexos.....</b>	<b>117</b>
11.1 Carta de Aprovação do Projeto (GPPG – nº 110617).....	117
11.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (GPPG – nº 110617).....	118
11.3 Carta de Aprovação do Projeto (GPPG – nº 110475).....	121
11.4 Carta de Aprovação do Projeto (GPPG – nº 150083).....	122
11.5 Artigo “Serum $\beta$ 2-microglobulin is frequently elevated in type 1 Gaucher patients”.....	123
11.6 Artigo “The prognostic value of the serum ferritin in a southern Brazilian cohort of patients with Gaucher Disease”.....	126
11.7 Apresentação Oral no Congresso Mundial de Doenças Lisossômicas (WORLD 2018).....	131

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ANVISA:** Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**BMB:** *Bone Marrow Burden Score*

**DG:** Doença de Gaucher

**DS3:** Disease Scoring System

**EMA:** *European Medicines Agency*

**FDA:** *Food and Drug Agency*

**PCDT:** Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas

**SNC:** Sistema Nervoso Central

**SSI:** Severity Score Index

**TRE:** Terapia de Reposição Enzimática

**TRS:** Terapia de Redução de Substrato

**QCSI:** Quantitative Chemical Shift Imaging

**DEXA:** Dual Energy X-ray Absorptiometry

**SRT:** Substrate Reduction Therapy

**ERT:** Enzyme Replacement Therapy

**EWGGD:** European Working Group on Gaucher Disease

**MRI:** Magnetic Resonance Imaging

## LISTA DE FIGURAS:

**Figura 1:** Rota de degradação dos Esfingolipídios (Adaptado de Voet et al, 2002).

**Figura 2:** Célula de Gaucher na coloração Leishman de aspirado de Medula Óssea (Adaptado de Allen et al, 1997).

**Figura 3:** Resumo das vias fisiopatogênicas que culminam em alterações ósseas (Adaptado de Mikosch et al, 2010).

**Figura 4:** Figura 4. Espectro fenotípico da Doença de Gaucher, classicamente dividido entre a presença e a ausência de sintomas neurológicos. Existe uma “zona cinza”, representada pelas linhas vermelhas, em que não está claro se os sintomas neurológicos apresentados pelo paciente são em decorrência a DG ou são secundários (Adaptado de Sidransky 2004).

**Figura 5:** Deformidade em frasco de Erlenmeyer. Note a forma triangular da metáfise e a perda da diferenciação córtico-medular, típicas desta deformidade.

**Figura 6:** Imagens da mesma paciente antes da TRE e 20 meses após a TRE, de coluna lombar sagital T1 (A) e T2 (B) e de fêmures coronal T1 (C) e T2 (D). Na avaliação pré-TRE a paciente apresentava hipointensidades grau 4 na coluna com distribuição 3; e hipointensidade máxima de grau 5 em fêmures com distribuição 3, atingindo inclusive as epífises, garantindo um escore total pré-tratamento = 15/16. Vinte meses após TRE, a paciente apresentava hipointensidades grau 1 com distribuição 3 na coluna e hipointensidades grau 5 com distribuição grau 1, totalizando um escore 10/16 (Adaptado de Robertson et al, 2007).

## LISTA DE QUADROS E TABELAS:

**Quadro 1:** Monitorização mínima recomendada pelo Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas do Ministério da Saúde Brasileiro.

**Quadro 2:** Alvos terapêuticos na Doença de Gaucher.

**Quadro 3:** Escore *Bone Marrow Burden* – Coluna Lombar (adaptado de Maas, 2003).

**Quadro 4:** Escore *Bone Marrow Burden* – Fêmur (adaptado de Maas, 2003)

**Tabela 1:** Resumo das características bioquímicas e indicação das enzimas recombinantes disponíveis para terapia de reposição enzimática na DG.

**Tabela 2:** Alvos terapêuticos a curto prazo da DG tipo 1 (Adaptado de Biegstraaten et al 2018).

**Tabela 3:** Alvos terapêuticos a longo prazo da DG tipo 1 (Adaptado de Biegstraaten et al 2018).



## RESUMO

**Introdução:** A Doença de Gaucher (DG) é uma das doenças lisossômicas mais prevalentes no mundo, com média de incidência de 1/40.000 nascidos vivos. Variantes patogênicas no gene *GBA1* causam atividade deficiente da glicocerebrosidase, o que resulta em acúmulo de glicocerebrosídeos em macrófagos, que se tornam ativados, liberando diversas citocinas sistematicamente, culminando com os achados fenotípicos da DG (hepatoesplenomegalia, citopenias, dor e crises ósseas agudas). A doença pode ser classificada em 3 subtipos clínicos de acordo com o acometimento neurológico e a progressão da doença, que variam de morte intra-útero até pacientes oligossintomáticos. A DG é tratada com terapia de reposição enzimática (TRE) ou com terapia de redução do substrato. Existem 3 enzimas disponíveis no mercado para TRE, a imiglucerase, produzida em células de ovário de hamster chinês (a mais longo tempo no mercado), a alfavelaglicerase, produzida em células humanas, e a alfataliglicerase, produzida a partir de células vegetais. A partir de 2014, a alfataliglicerase foi reconhecida como a enzima de primeira linha de tratamento para pacientes com DG tipos 1 e 3 no Brasil. Sua efetividade e segurança foram avaliadas apenas em ensaios clínicos fora do Brasil, ou em estudo brasileiro de apenas 3,5 anos de seguimento, limitado em relação a dados de efetividade e principalmente de segurança. O acometimento ósseo da DG ocorre devido à infiltração das células de Gaucher (macrófagos ativados) na medula óssea dos pacientes. Tal infiltração gera uma diferença na pressão intramedular e na vascularização local que culmina com a substituição da medula óssea por células de Gaucher, com o aumento da probabilidade de eventos isquêmicos ósseos, remodelamento ósseo e complicações crônicas de morfologia óssea e de lesão articular. Esta infiltração pode ser avaliada semiquantitativamente através de escore calculado por ressonância magnética de coluna lombar e fêmures, o escore *Bone Marrow Burden*. **Objetivos:** Caracterizar a coorte de pacientes com Doença de Gaucher do Rio Grande do Sul em relação à infiltração da medula óssea e ao uso da alfataliglicerase. **Métodos:** O estudo foi realizado em duas etapas. Etapa 1: vinte e cinco pacientes do Centro de Referência em DG do Rio Grande do Sul realizaram ressonâncias magnéticas a

cada 2 anos durante 6 anos de estudo para cálculo do BMB. Etapa 2: dezoito pacientes em uso de alfatiglicerase, do mesmo Centro, foram seguidos durante 6 anos, e dados de eficácia (parâmetros hematológicos, viscerais e ósseos) e de segurança (registro de qualquer tipo de eventos adversos durante os 6 anos de tratamento) foram avaliados. **Resultados:** Em relação à Etapa 1, os resultados estão descritos nos artigos 1 e 2: todos os pacientes apresentaram algum grau de envolvimento ósseo, e esta infiltração se reduz nos primeiros 5 anos de tratamento com TRE, e, após, mantém-se estável, conforme avaliação por BMB. Além disso, o genótipo do gene *GBA1* de duas irmãs com DG tipo 1 E349K/S366N foi associado a envolvimento ósseo grave e à doença visceral e hematológica brandas. Em relação à Etapa 2, os resultados estão descritos nos artigos 3 e 4: todos os parâmetros de eficácia mantiveram-se estáveis ou melhoraram durante os 6 anos do estudo. Nove (50%) pacientes apresentaram efeitos adversos durante o tratamento com alfatiglicerase, sendo que, destes, 7 foram considerados relacionados à TRE. A TRE com alfatiglicerase mostrou-se segura e eficaz também durante a gestação e lactação em nossa coorte. **Discussão e conclusões:** A enzima alfatiglicerase mostrou ser eficaz e segura durante o período do estudo, sendo observado apenas aumento da taxa de eventos adversos quando comparado a estudos prévios, mostrando ser uma boa opção como primeira linha de tratamento para pacientes com DG, inclusive durante os períodos de gestação e amamentação. Em relação ao acometimento ósseo, a infiltração medular se comportou como reportado em único estudo prévio, sendo que a taxa de redução do escore por ano durante os primeiros 5 anos de tratamento, em nossa amostra, foi maior do que em estudo prévio. Recomenda-se, portanto, a realização assistencial do escore BMB após 5 anos de TRE apenas para pacientes não aderentes ou para pacientes com sintomas ósseos agudos.

## ABSTRACT

**Introduction:** Gaucher disease (GD) is one of the most common lysosomal disorders, with an overall frequency of 1 in 40,000 live births worldwide; it is caused by deficient activity of lysosomal glucocerebrosidase, the enzyme encoded by the *GBA1* gene, which leads to a build-up of glucocerebroside in macrophages. This, in turn, causes macrophage malfunction and shifts their immunological activation profile, ultimately leading to symptoms such as hepatosplenomegaly, thrombocytopenia, osteonecrosis, and, in some patients, neurological deficits. GD is categorized into three types according to the extent of neurological involvement, and may vary from perinatal death to asymptomatic patients. GD can be treated either with enzyme replacement therapy or with substrate reduction therapy. There are three recombinant enzymes available for clinical use: imiglucerase, which is produced from Chinese hamster ovaries cells (the one with the longest time in the market); velaglucerase alfa, derived from human cells; and taliglucerase alfa, which is produced from carrot cells. Since 2014, taliglucerase alfa became the first option of treatment for GD types 1 and 3 in Brazil. Its safety and efficacy have been evaluated previously by only foreign clinical trials, and from only one study in a Brazilian population, in which patients were follow-up for 3.5 years and limited data regarding safety and efficacy were available. Bone involvement on GD occurs because of Gaucher cells infiltration in the bone marrow. This, in turn, creates a change in the intramedullary tension and vascularization, culminating in substitution from bone marrow to Gaucher cells and increasing the probability of ischemic events, bone remodeling and chronic complications involving bone morphology and articular lesions. This infiltration may be measured semiquantitatively through femur and lumbar spine MRI, which is the Bone Marrow Burden score (BMB). **Objectives:** To characterize the Rio Grande do Sul cohort of GD patients regarding bone marrow infiltration and treatment with taliglucerase alfa. **Methods:** This study was performed in two phases. Phase 1: twenty five patients from the Reference Center of Rio Grande do Sul for GD were enrolled to perform MRIs every other year during 6 years, for BMB score. Phase 2: eighteen patients in ERT with taliglucerase alfa from the same Center were followed-up for 6 years, and data regarding efficacy (hematological, visceral and bone

parameters) and safety (registry of any kind of adverse events during follow-up) were analyzed. **Results:** regarding Phase 1, the results are described in articles 1 and 2: all the evaluated patients presented some degree of bone marrow involvement with the infiltration decreasing only during the first five years of treatment. After this period, the score remained stable. Also, the E349K/S366N *GBA1* genotype of two sisters with GD type 1 was associated with severe bone involvement and mild visceral and hematological involvement. Regarding Phase 2, results are described in articles 3 and 4: all the parameters of interest remained stable or improved during the study period. Nine (50%) patients presented adverse effects during ERT with taliglucerase alfa; out of these, 7 were considered related to ERT. ERT with taliglucerase alfa also seems to be safe and effective during pregnancy and lactation periods. **Discussion and conclusions:** Taliglucerase alfa has demonstrated to be effective and safe during the study period, even though we did see a higher rate of adverse events in our cohort when compared to the previous studies. Based in our findings, ERT with taliglucerase alfa is an effective and safe approach for treatment of patients with GD, even during pregnancy and lactation periods. Regarding bone involvement, medullary infiltration has evolved as reported in a single previous study; although, in our study, the rate of the BMB decrease per year during the first 5 years of ERT was higher than in the previous study. We believe that MRI for BMB measurement should only be performed after 5 years of treatment in non-adherent or in patients who present with acute skeletal symptoms.

### 1.1. Doença de Gaucher – Base Histórica

A Doença de Gaucher (DG) foi a primeira doença lisossômica descrita na literatura em 1882 por Phillippe Gaucher. Gaucher, em sua tese, descreveu-a como sendo uma doença que afetava o baço com epitelioma e hipertrofia do órgão, sem estar associado a processos linfoides malignos<sup>1</sup>. Em 1912, após 11 famílias já terem sido descritas como “Baço de Gaucher”, estava claro de que se tratava de uma doença hereditária, mas sua etiopatogenia estava longe de ser descrita. À época, teorias como a de se tratar de um tumor benigno de baço que, após anos, evoluía para maligno, “hiperplasia pura do baço” ou de que se tratava de envenenamento eram as dominantes<sup>2</sup>. Mandlebaum e Libman, em 1909, pela primeira vez descreveram histologicamente células grandes com núcleos pequenos e citoplasma hialino, com presença de pigmento de ferro no baço, fígado, linfonodos e na medula óssea; Risel, em 1909, determinou que tais células teriam origem no sistema hematopoiético<sup>2</sup>. Em 1924, Lieb propôs que na DG existiria depósito de algum tipo de carboidrato, mas apenas em 1958 que Rosemberg e Chargaff descreveram que havia depósito de glicocerebrosídeo no baço de pacientes com DG<sup>3</sup>.

A ideia de que existiriam diferentes formas fenotípicas da doença foi publicada em 1945 por Franco, na descrição de uma criança com DG e com uma síndrome neurológica aguda e maligna<sup>4</sup>. A partir de 1948 foi identificado que os pacientes com DG também poderiam ter afetado o sistema esquelético, não apenas a medula óssea, sendo publicados relatos de casos de pacientes com esclerose e necrose asséptica associadas<sup>5-9</sup>.

Em relação ao padrão de herança desta doença, Gerken, em 1964, sugeriu que o melhor padrão de herança para esta patologia seria o autossômico recessivo<sup>10</sup>. No ano seguinte, 1965, Brady publicou sobre a “enzima clivadora de glicocerebrosídeo” (à época assim denominada), conferindo a ela a função de clivar a glicose do glicocerebrosídeo<sup>11</sup>. Em sua próxima publicação, Brady comprovou que pacientes com DG apresentavam atividade deficiente desta enzima<sup>12</sup>. Em 1968, Ockerman identificou que a enzima com atividade reduzida

nos pacientes com DG tratava-se da enzima glicocerebrosidase<sup>13</sup>. Em 1970, Beutler et al publicaram a técnica laboratorial capaz de quantificar a atividade enzimática da glicocerebrosidase, sendo possível diagnosticar pacientes e heterozigotos para esta condição realizando a análise em leucócitos de sangue periférico<sup>14</sup> e, posteriormente, em fibroblastos<sup>15</sup>.

Até a década de 1990, o tratamento proposto para a DG era a esplenectomia total. Snapper, em 1943, associou pela primeira vez piora das lesões ósseas com a esplenectomia<sup>16</sup>. Foram também realizados alguns transplantes esplênicos, sem sucesso, na tentativa de cura da doença em pacientes em estado terminal da DG<sup>17,18</sup>. Em 1974, Brady et al publicaram a primeira evidência de que terapia de reposição enzimática para a DG poderia mudar a história natural desta doença: realizaram um ensaio clínico em que administraram a enzima glicocerebrosidase purificada, extraída de placenta humana, em dois pacientes por dois dias seguidos, identificando que o acúmulo de glicocerebrosídeos reduziu em ambos os pacientes<sup>19</sup>. Este estudo possibilitou modificar totalmente a história natural não apenas da DG, mas também a de outras doenças lisossomais como a doença de Fabry, as Mucopolissacaridoses e a doença de Pompe<sup>20</sup>.

## 1.2 Epidemiologia

Aproximadamente 1 em 5.000 nascidos vivos apresentam alguma doença lisossômica, sendo a DG e a doença de Fabry (ambas esfingolipidoses) as mais frequentes<sup>21</sup>. A DG é considerada uma doença pan-étnica e sua incidência varia de 1/40.000 (estudo realizado na Austrália, numa população predominantemente branca<sup>22</sup>) a 1/50.000 nascidos vivos no mundo, podendo alcançar incidências de até 1/800 nascidos vivos com DG tipo I em populações de Judeus Ashkenazi. Nesta população específica, a taxa de heterozigotos chega a 1 em 15 indivíduos<sup>23</sup>. Em relação a números brasileiros, não existe um estudo específico de incidência em nossa população. Em 2007, Sobreira et al publicaram dados comparativos do Registro de DG do Grupo Colaborativo Internacional (maior estudo observacional em DG no mundo), em que relatam pelo menos 223 pacientes com DG no Brasil<sup>24</sup>. Em 2014, no Protocolo Clínico e Diretrizes

Terapêuticas do Ministério da Saúde do Brasil, a estimativa era de 700 pacientes com DG em tratamento no Brasil<sup>25</sup>.

### 1.3 Fisiopatogenia

A DG é causada por variantes patogênicas no gene *GBA1*, que codifica a proteína glicocerebrosidase, também conhecida por beta-glicosidase ácida. Esta enzima participa na rota de degradação dos esfingolipídios, e é responsável por clivar a glicosilceramida em glicose e ceramida [Figura 1]. Esfingolipídios são compostos encontrados em todas as membranas celulares, e tem como seu principal papel intermediar diversas funções celulares, além de funcionarem como receptores celulares e marcadores de reconhecimento celular. Em seu ciclo, eles são transportados aos lisossomos para então serem degradados e reciclados<sup>21</sup>. A DG é classificada como um erro inato do metabolismo justamente pela sua fisiopatogenia: a ausência ou redução da atividade da enzima culmina em acúmulo do seu substrato e na redução do seu produto. No caso da DG, o acúmulo de glicosilceramida ocorre principalmente dentro dos lisossomos macrófagos de tecidos do sistema reticuloendotelial, portanto baço, fígado e medula óssea<sup>26</sup>. Estes macrófagos anormais, que ficam aumentados de tamanho e com aparência de papel amassado [Figura 2] pelo depósito de glicosilceramida são denominados Células de Gaucher. Estas células são encontradas nos sinusóides do baço, substituem as células de Kupfer no fígado e nos alvéolos pulmonares e ainda infiltram a medula óssea<sup>21</sup>.

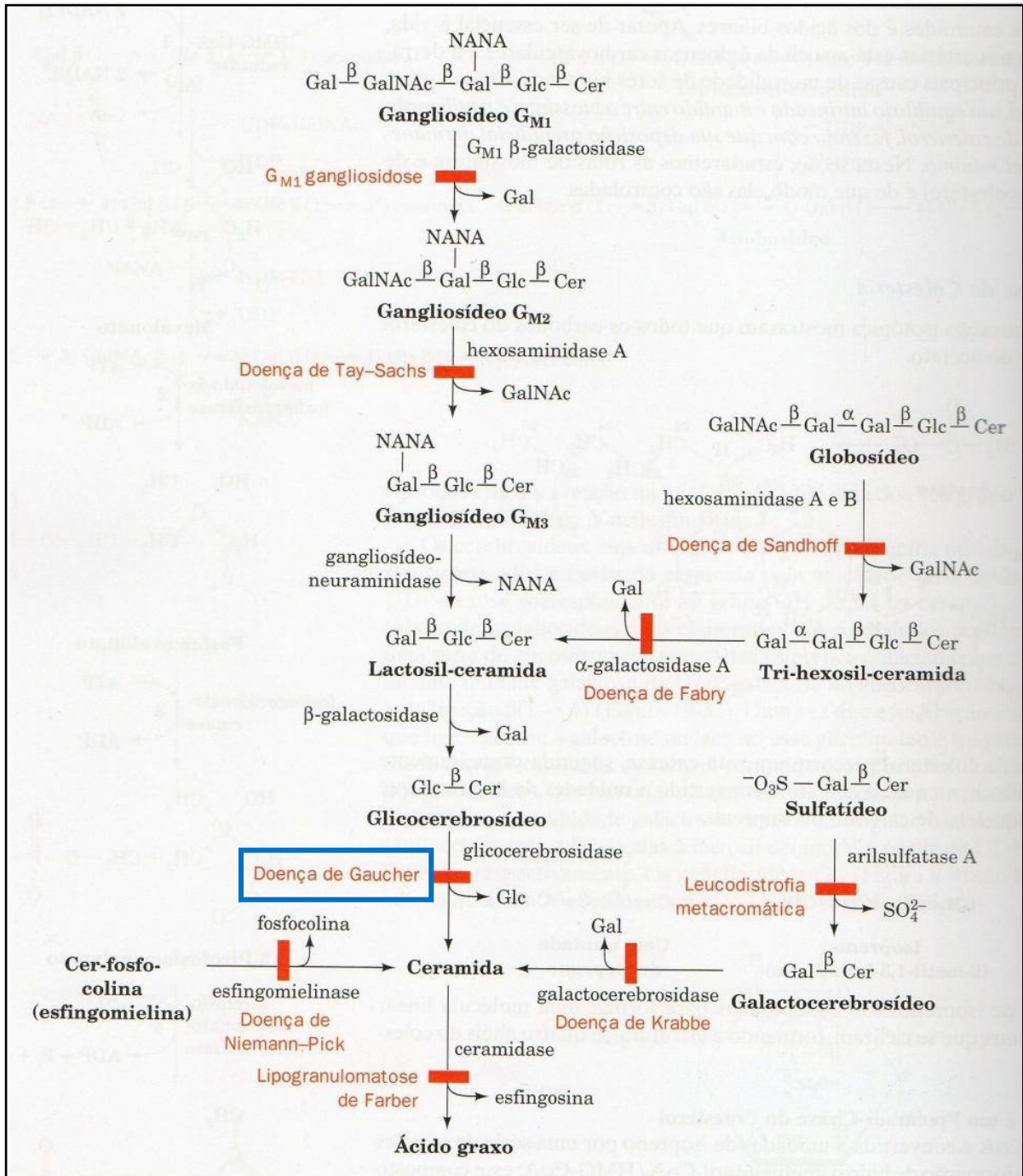


Figura 1. Rota de degradação dos Esfingolípídios. Adaptado de Voet et al, 2002<sup>27</sup>.



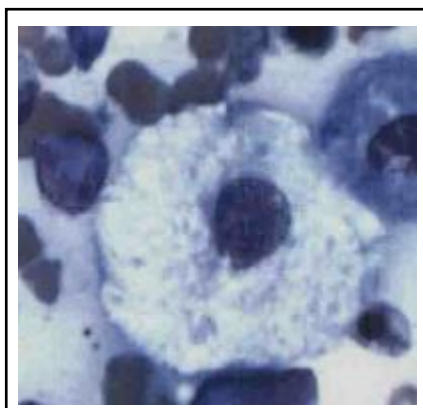


Figura 2. Célula de Gaucher na coloração Leishman de aspirado de Medula Óssea. Adaptado de Allen et al, 1997<sup>28</sup>.

Apesar de o defeito genético e da rota metabólica estarem plenamente descritos na literatura, a compreensão de como o depósito de glicosilceramida está envolvido na patogênese da doença ainda não está completamente estabelecida. Antigamente, acreditava-se que o fígado, o baço e a medula óssea tornavam-se aumentados de volumes em decorrência diretamente do acúmulo de glicosilceramida<sup>28</sup>. Sabe-se, no entanto, que apenas 2% do volume destes órgãos é devido ao acúmulo do substrato<sup>29</sup> e, portanto, não se pode justificar o aumento do volume do órgão, bem como suas consequências fisiopatológicas simplesmente pelo acúmulo de glicosilceramida. A fisiopatogenia mais aceita atualmente é a de que o acúmulo de glicosilceramida dentro destes macrófagos age como um disruptor de diversas funções celulares, causando estresse no retículo endoplasmático<sup>30</sup>, defeito na homeostase do cálcio (que seria um importante causador de dano neuronal, visto nos DG tipo I e III)<sup>31</sup>, aumento da sensibilidade a estresse oxidativo<sup>32</sup> e mudanças no próprio sistema fagocitário<sup>33</sup>. O acúmulo de glicosilceramida intramacrofágico é considerado um potente estimulador de resposta inflamatória, ativando estas células e provocando a liberação de fatores pró-inflamatórios cronicamente. É bem documentado que na DG existe aumento de quitotriosidase, CCL18, enzima conversora de angiotensina e catepsina S – indicadores de ativação macrofágica<sup>23</sup>. De fato, na DG, diversas citocinas estão elevadas, entre elas IL-1, IL-6, IL-10, TNF-alfa e M-CSF, que agirão local e sistemicamente causando dano celular mediado pelas mesmas<sup>34</sup>. O dano inflamatório local e sistêmico causaria aumento de volume e

mau funcionamento do baço e fígado principalmente, culminando em hepatopatia crônica e progressiva e hiperesplenismo com trombocitopenia grave<sup>23</sup>. Anemia grave é menos frequente, e ocorre como consequência da infiltração de células de Gaucher na medula óssea, provocando falência medular e substituição do sistema hematopoiético pelas próprias células de Gaucher. Outros órgãos podem também ser acometidos pelo mesmo mecanismo fisiopatológico, como o pulmão e o coração, mas em uma escala infinitamente menor e menos frequente, geralmente presentes em crianças com doença grave<sup>23</sup>.

Em relação ao acometimento neurológico, a fisiopatogenia é bastante distinta da relatada anteriormente, visto que ela reside em morte neuronal. A teoria é de que a pequena quantidade de glicosilceramida acumulada em neurônios desencadearia um desvio de rota metabólica para a reação de desacetilação, culminando com a formação de glicosilesfingosina, metabólito solúvel em água, facilmente transportado por difusão simples e tóxico para o sistema nervoso central, causando morte neuronal e posteriormente, gliose<sup>23</sup>.

### **1.3.1 Fisiopatogenia da Doença Óssea**

A DG afeta tanto o compartimento da medula óssea quanto o compartimento mineralizado do osso. Em relação à medula óssea, ocorre infiltração de células de Gaucher primariamente na coluna, pelve e na diáfise de ossos longos. O acúmulo destas células na medula óssea gera uma expansão centrífuga da medula óssea vermelha. A substituição da medula óssea amarela pela vermelha na periferia gera alteração tanto da vascularização quanto da pressão intramedular, contribuindo para formação de trombose e infartos pelas células de Gaucher<sup>35</sup>. Isto explica parcialmente as osteonecroses, infartos medulares, osteoescleroses, infartos corticais, destruição articular e deformidades que os pacientes com DG apresentam. Associado às consequências da própria infiltração celular reside o fato de que o estado pró-inflamatório dos macrófagos levam a um perfil alterado de ativação e inativação de osteoblastos e de osteoclastos, levando a um crônico remodelamento do mineralizado ósseo, originando constantes mudanças e perdas de material ósseo, culminando com osteopenia e osteoporose, além de alterações morfológicas esqueléticas como o

déficit de crescimento observado em jovens com DG e a deformidade óssea em frasco de Erlenmeyer<sup>21,35</sup>. A osteopenia ou osteoporose, em conjunto com as lesões líticas encontradas nos ossos destes pacientes contribuem para a fragilidade óssea e à propensão em fraturas patológicas. O infarto e a necrose ósseas causam clinicamente o que é conhecido por “crise óssea aguda” e pode gerar osteomielite séptica ou asséptica, uma importante comorbidade óssea vista nestes pacientes<sup>35</sup>. Um resumo da fisiopatogenia na doença óssea pode ser observado na Figura 3, adaptada de Mikosch et al, 2010.

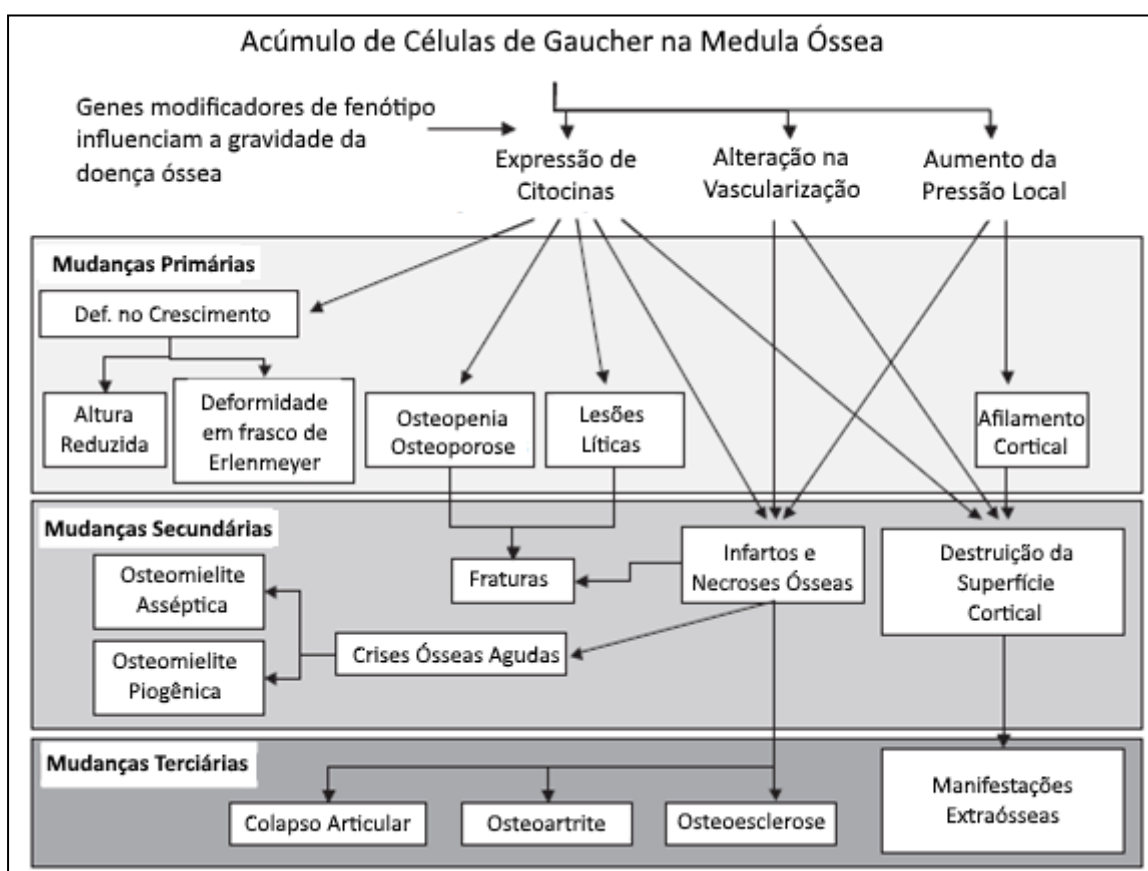


Figura 3. Resumo das vias fisiopatogênicas que culminam em alterações ósseas. Adaptado de Mikosch et al, 2010<sup>35</sup>.

### 1.3.2 Base Genética e o Gene *GBA1*

A DG é uma doença de herança autossômica recessiva causada por variantes patogênicas bialélicas no gene *GBA1*, localizado no cromossomo 1q21<sup>36</sup>. O gene tem 7,6kb e 11 exons<sup>37</sup>. Até hoje, 495 variantes patogênicas já foram descritas neste gene<sup>38</sup>, e a maioria delas são restritas às famílias e incluem

variantes de troca de sentido, sem sentido, pequenas inserções ou deleções que alteram ou não a matriz de leitura, alterações em sítios de processamento e alelos complexos com duas ou mais variantes em *cis*. Um gene homólogo (96% de homologia) ao *GBA1*, de 5,7kb, é o pseudogene (*GBAP*), localizado 16kb *downstream*, com exatamente a mesma organização de exons. Pelo fato destes dois genes dividirem 96% de sua homologia, é natural que haja recombinação homóloga entre eles. De fato, diversos alelos recombinantes já foram descritos como patogênicos, sendo resultado de eventos como conversão, fusão ou duplicação<sup>39</sup>. Algumas variantes são muito mais prevalentes do que outras, especialmente entre o tipo I da DG, em que se destacam a N370S e a L444P, variantes que contribuem em até 90% dos alelos encontrados na população de Judeus Ashkenazi<sup>40</sup>.

#### 1.4. Diagnóstico

O diagnóstico da DG é baseado em 4 pilares: clínica, histopatologia, bioquímica e genética. As manifestações clínicas serão abordadas no próximo item desta tese. A alteração histopatológica da DG são as Células de Gaucher, que são consideradas praticamente patognomônicas desta doença, quando observadas por patologistas experientes. Elas são observadas em amostras de baço, fígado ou medula óssea e são células reticuloendoteliais oligo ou multinucleadas, com citoplasma estriado na coloração de Leishman ou em aspecto de papel amassado na coloração com hematoxilina e eosina<sup>21,41,42</sup>. A alteração bioquímica esperada para pacientes com DG é a redução da atividade da glicocerebrosidase, que pode ser aferida a partir de qualquer célula nucleada, mas rotineiramente é realizada em leucócitos (sangue periférico) ou em fibroblastos (biópsia de pele). Até hoje, este é o padrão-ouro para diagnóstico desta doença. A detecção de variantes patogênicas bialélicas no gene *GBA1* também pode confirmar o diagnóstico de DG. As variantes patogênicas podem ser detectadas em sua vasta maioria através de técnicas de sequenciamento de DNA, seja através de painéis de “*Next Generation Sequencing*”, seja através do sequenciamento completo do gene<sup>23</sup>. Em menos de 1% dos casos foi encontrada uma variante de número de cópias através de técnicas como “*Multiplex Ligation-*

*dependent Probe Amplification*<sup>39</sup>. Além de ser uma ferramenta de auxílio diagnóstico, a determinação das variantes permite testar familiares em risco e realizar aconselhamento genético mais preciso<sup>23</sup>.

### 1.5 Manifestações Clínicas

A DG é uma doença com ampla variedade clínica, sendo classicamente dividida em 3 tipos em relação à progressão e à presença ou não de sintomas neurológicos: o tipo 1, sendo o mais brando e frequente de todos e que não apresenta sintomas neurológicos primariamente; o tipo 2, também conhecido como neurológico agudo; e o tipo 3, também conhecido como neurológico crônico. Apesar de ainda ser classificada nestas categorias, hoje se acredita que as subdivisões são, na verdade, um espectro de gravidade da mesma doença, estando no extremo mais brando da doença o tipo I oligossintomático, e no mais grave, o tipo II, com hidropsia fetal e morte intra-útero<sup>42</sup>, Figura 4.

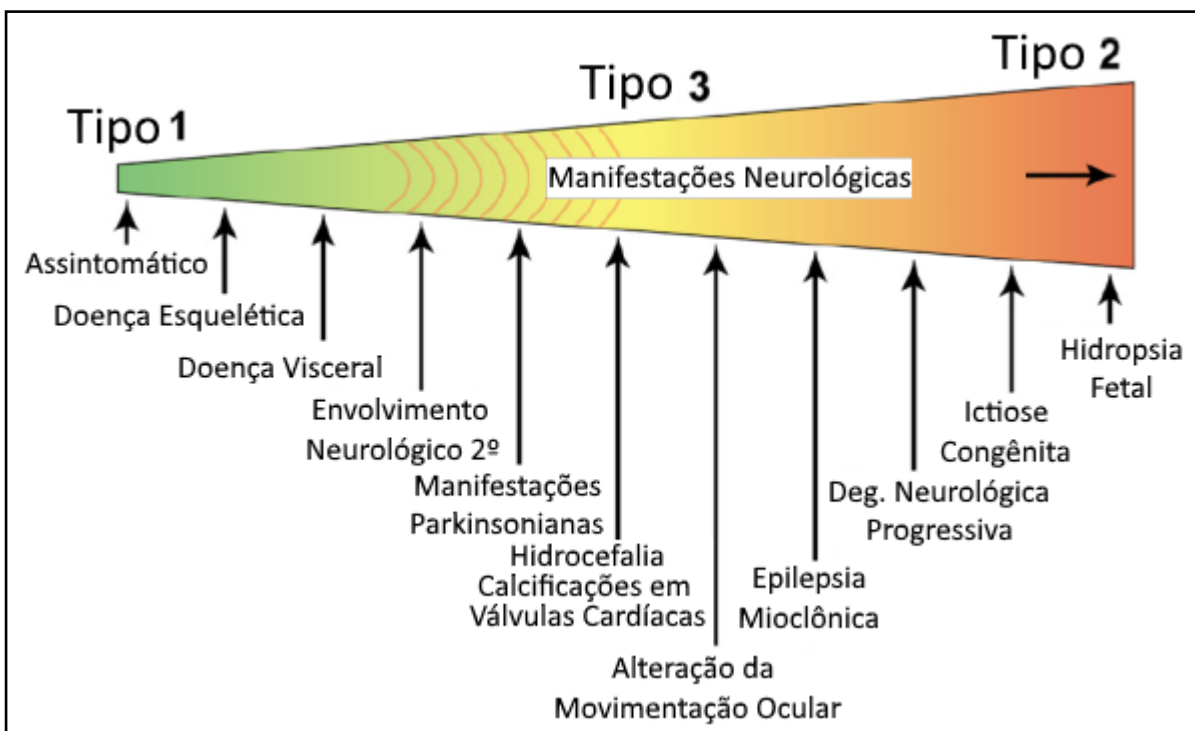


Figura 4. Espectro fenotípico da Doença de Gaucher, classicamente dividido entre a presença e a ausência de sintomas neurológicos. Existe uma “zona cinza”, representada pelas linhas vermelhas, em que não está claro se os sintomas

neurológicos apresentados pelo paciente são em decorrência a DG ou são secundários. Adaptado de Sidransky 2004<sup>42</sup>.

O tipo 1 da DG é o melhor estudado e também compreende indivíduos com ampla variação fenotípica: de indivíduos oligossintomáticos a outros gravemente afetados com doença visceral e óssea importantes. Trinta por cento destes indivíduos são diagnosticados antes dos 10 anos de vida, e já está estabelecido que, quanto mais precoce forem os sintomas, mais grave a doença se comporta<sup>23</sup>. Estes pacientes costumam apresentar, em 50% das vezes, anemia ou trombocitopenia secundários ao acometimento visceral, e, em até 90% dos casos, manifestação óssea da doença<sup>23,40</sup>. Na era pré-tratamento, estes pacientes apresentavam uma expectativa de vida que girava em torno dos 60 anos de idade. Hoje, com o advento da TRE os pacientes apresentam expectativa de vida semelhante à população local<sup>21</sup>.

O tipo 2 da doença é o mais grave de todos, com apresentação dos sintomas nos primeiros dias a meses de vida, com progressão rápida e deterioração neurológica grave, apresentando envolvimento bulbar e paresia oculomotora. A maioria dos pacientes vão a óbito no primeiro ou segundo anos de vida<sup>40</sup>. Outras formas de acometimento na DG tipo 2 é (1) a hidropsia fetal, em que geralmente ocorre morte intrauterina<sup>23</sup>; (2) a ictiose congênita, em que o recém-nascido perde sua pele nas primeiras semanas de vida, quando o quadro dermatológico melhora e os sintomas viscerais e neurológicos pioram; (3) a presença de dismorfias com orelhas baixo implantadas e pequenas, narinas antevertidas e ponte nasal plana<sup>43</sup>.

O tipo 3 da DG é intermediário em relação aos outros dois, e é o subtipo que mais apresenta variação fenotípica, podendo apresentar ampla doença visceral, com hepato e esplenomegalias, sacadas oculares lentas, ataxia, epilepsia e demência, além de comprometimento esquelético importante. As manifestações clínicas podem começar desde os primeiros meses de vida com apenas alterações oculomotoras, mas sem sintomas bulbares associados. Este tipo pode ser subdividido em 3: o subtipo 3a, é caracterizado por doença visceral leve, mas com envolvimento do sistema nervoso central grave, com epilepsia

mioclônica que levam à morte nas primeiras duas décadas de vida; o 3b apresenta doença visceral grave com apenas leve envolvimento do sistema nervoso central aos 10-20 anos de idade; e o 3c é o subtipo relacionado ao predomínio de doença cardíaca, além de também apresentar acometimento ósseo, visceral e neurológico<sup>23</sup>.

### **1.5.1 Manifestações Ósseas**

Entre 2004 pacientes acompanhados no maior estudo observacional de registro da DG (ICGG), até os anos 2000, setenta e seis a 94% apresentavam manifestações de doença óssea, entre elas infiltração da medula óssea, deformidade em frasco de Erlenmeyer ou osteonecrose. Geralmente a infiltração da medula óssea precede as manifestações clínicas de osteonecrose, dor, fraturas, crises ósseas e possível osteomielite, e ocorre primeiramente no esqueleto axial e depois no apendicular. A osteonecrose (que também pode ser referida como necrose avascular, necrose asséptica ou infarto ósseo) ocorre em até 48% dos pacientes adultos com DG<sup>44</sup> e é consequência direta da infiltração de células de Gaucher na medula óssea. Novas lesões podem ocorrer em qualquer época da vida, e podem ter alguma relação com gestação e puberdade. A principal causa de dor e redução de qualidade de vida entre os pacientes com DG é a osteonecrose, e pode exigir tratamentos cirúrgicos com necessidade de próteses ortopédicas<sup>45</sup>. Ela é suspeitada sempre que o paciente manifestar uma crise óssea, caracterizada por dor aguda e grave óssea ou articular, acompanhada por febre, edema e resposta inflamatória local ou sistêmica. Os sintomas geralmente são incapacitantes, necessitando imobilização e analgésicos opióides. Ainda, a presença de osteonecrose é fator de risco importante para fragilidade e fratura óssea, além de, se localizada em regiões de epífise, contribuem para o colapso articular. É de extrema importância ressaltar que o principal fator de risco para desenvolver osteonecrose é a esplenectomia, uma vez que após a remoção cirúrgica do baço, ocorre um excesso de células de Gaucher que infiltrarão a medula óssea, aumentando, assim, a ocorrência de osteonecroses<sup>21</sup>.

A apresentação radiológica dos ossos do paciente com DG mais comum, que pode estar presente em até 80% dos casos, é a deformidade em frasco de Erlenmeyer, Figura 5. Sua formação ocorre antes da puberdade, e sua aparência é o resultado do alargamento metafisário concomitante ao apagamento da concavidade metafisária. Esta deformidade é normalmente assintomática e pode ser vista na maioria dos ossos longos tubulares, principalmente nos fêmures. A relevância clínica desta deformidade ainda não é clara na literatura, não se tem dados de correlação com fragilidade óssea ou osteonecrose. Os pacientes com DG também podem apresentar lesões ósseas líticas, que são incomuns, mas que ao contrário da deformidade em frasco de Erlenmeyer, são um dos principais fatores de risco para fragilidade e fratura óssea, sendo de extrema importância realizar diagnóstico diferencial com as malignidades ósseas, que também podem ocorrer na DG em uma taxa maior do que na população em geral<sup>21</sup>.



Figura 5. Deformidade em frasco de Erlenmeyer. Note a forma triangular da metáfise e a perda da diferenciação córtico-medular, típicas desta deformidade. Adaptado de Hughes et al 2019<sup>46</sup>.

Todos os pacientes com DG podem desenvolver cifose, principalmente torácica, ao longo dos anos, em consequência à fragilidade vertebral pela reduzida mineralização óssea nesta região. Há, no entanto, outra manifestação



torácica que é distinta da cifose, a giba. Esta última ocorre exclusivamente nos pacientes com DG tipo III, e se manifesta por angulação importante da coluna na transição tóraco-lombar. A giba se desenvolve na infância tardia ou na adolescência, e pode interferir na estatura, e, mais importante, causar deformidade torácica, causando distúrbios ventilatórios restritivos crônicos<sup>21</sup>.

Crianças com DG podem apresentar atraso de crescimento e de puberdade, podendo apresentar baixa estatura na vida adulta pelo fechamento precoce da placa de crescimento ósseo, secundário ao constante remodelamento ósseo que estes pacientes apresentam. Quando estes pacientes são tratados previamente ao fechamento da placa de crescimento ósseo, a estatura final alcança o alvo familiar<sup>21</sup>.

Pacientes com DG apresentam mais, e mais precocemente, osteopenia e osteoporose do que indivíduos sem DG. Isto ocorre pelo constante remodelamento ósseo com ação excessiva dos osteoclastos, que culmina com perda precoce de massa óssea ao longo da vida<sup>21</sup>.

## **1.5.2 Comorbidades Associadas**

### **1.5.1.1 Doenças Onco-Hematológicas**

A DG é associada a risco aumentado para alguns tipos de câncer, com um risco relativo de 1,7 comparado à população em geral. Este risco se eleva quando são levadas em conta apenas malignidades hematológicas, chegando a um risco relativo de até 12,7. Ainda, se levado em consideração apenas o risco de mieloma múltiplo, este risco chega a ser 51,1 vezes maior do que na população em geral<sup>47,48</sup>. A hipótese levantada é de que as células mesenquimais do estroma da medula óssea, além de promover remodelamento ósseo, induzem proliferação e ativação de plasmócitos, ocasionando picos policlonais e aumentando o risco de desenvolver gamopatias monoclonais<sup>21,49</sup>.

### **1.5.1.2 Doença de Parkinson**

A Doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa comum, que costuma afetar indivíduos a partir dos 70 anos de idade com distúrbio do

movimento extrapiramidal, com bradicinesia, rigidez, tremor e instabilidade postural. A DP iniciou a ser relacionada à DG a partir do momento em que foram realizados estudos histopatológicos *pós-mortem* em indivíduos com DG, em que foram identificados depósitos de corpúsculos de Levy positivos para alfa-sinucleína no córtex e no cerebelo<sup>50</sup>. Além disto, a DP é mais frequente nos familiares previamente saudáveis dos pacientes com DG<sup>51</sup>. Mais recentemente, variantes patogênicas no gene *GBA1* foram associadas a um *odds ratio* de até 5,43 em um estudo de caso-controle, sendo considerado o principal fator de risco para desenvolvimento de DP e de outras sinucleinopatias. Além disso, pacientes com DP e com variantes patogênicas em *GBA1* apresentam a doença em idade mais precoce, com acometimento simétrico e com aumento de risco para distúrbios neuropsiquiátricos<sup>49</sup>.

### 1.5.2 Correlação Genótipo-Fenótipo

Quatrocentas e noventa e cinco variantes já foram descritas no gene *GBA1*<sup>38</sup>. A variante mais prevalente é a N370S, que tem uma frequência elevada em indivíduos Judeus Ashkenazi (1 em cada 15 indivíduos são heterozigotos para esta variante) e é considerada a segunda variante mais prevalente na Europa em populações não judias. Através de estudos de haplótipos<sup>52</sup>, foi sugerido que esta variante teria surgido entre os séculos 11 e 13 e que então teria se espalhado no mundo ocidental. Esta variante está associada a fenótipos mais brandos da DG, garantindo que o indivíduo que possui pelo menos um alelo N370S vá apresentar a forma não neuronopata da DG (tipo I)<sup>52</sup>. A segunda variante mais prevalente entre os paciente com DG é a L444P (a mais comum no Japão, por exemplo) que, em contrapartida a N370S, está, na maioria dos casos, associada a fenótipos mais graves da doença e, quando está em homozigose, está associada à forma neuronopata da DG<sup>42</sup>. Outra associação genótipo-fenótipo bastante estabelecida é a da variante 84GG ou c.84dupG, que gera um códon de parada e, quando em homozigose, é incompatível com a vida<sup>53</sup>. Existe ainda associação clara entre a DG tipo III com hidrocefalia, opacidade corneana, válvula aórtica característica e calcificações de aorta ascendente com a variante D409H em homozigose<sup>23</sup>.

### 1.6 Tratamento

### 1.6.1 Terapia de Reposição Enzimática

Desde 1992 a TRE vem sendo considerada o tratamento padrão para pacientes com DG tipo I ou tipo III. A primeira enzima aprovada para estes pacientes foi a alglucerase, produzida pela empresa Sanofi (Gentilly, França), e era extraída e purificada a partir de placenta humana, em que era acoplada a um terminal manose<sup>54</sup>. O risco de transmissão de doenças infecciosas e a dificuldade em manter a demanda necessária da enzima (para cada paciente, eram necessárias cerca de 12 toneladas de placentas por ano) geraram a necessidade de produzir enzimas recombinantes *in vitro*<sup>55</sup>. A primeira enzima recombinante a ser aprovada em agências reguladoras foi a imiglucerase, em 1994, fabricada também pela empresa Sanofi (Gentilly, França). Tal enzima é produzida *in vitro* a partir de células de ovário de hamster chinês e, posteriormente a sua composição, sofre diversas reações de deglicosilações para expor o seu resíduo manose. Este resíduo manose é responsável pelo sucesso no direcionamento da enzima ao seu alvo, os macrófagos, sendo também responsável por permitir a fagocitose desta macromolécula e, assim, possibilitar que a enzima atinja seu alvo terapêutico, os lisossomos<sup>56</sup>. Em 2010, a enzima alfavelaglicerase, que também é uma enzima recombinante, produzida *in vitro* a partir de células humanas pela empresa Shire Human Genetics Therapies (Cambridge, USA/MA) foi aprovada no FDA e, após, na EMA e na ANVISA. A enzima alfataliglicerase, a primeira enzima recombinante produzida a partir de células de cenoura, foi apresentada em 2009 pela empresa Protalix Biotherapeutics (Karmiel, Israel) e será discutida em maiores detalhes em separado nesta introdução<sup>57</sup>.

As diferenças básicas entre as três enzimas recombinantes atualmente disponíveis para o tratamento de pacientes com DG são a forma de produção, a sequência de aminoácidos e o padrão de glicosilação, Tabela 1<sup>25</sup>. A imiglucerase é produzida em células de ovário de hamster chinês; a sequência de aminoácidos da proteína difere em um aminoácido em relação à da proteína endógena humana (p.Arg495His). A taxa de formação de anticorpos anti enzima é de 15,6%<sup>58</sup>. A alfavelaglicerase é produzida em células humanas, por meio do processo de ativação gênica; a sequência de aminoácidos da proteína é idêntica à sequência

normal da proteína humana. A taxa de formação de anticorpos anti-enzima é de 0%-1%<sup>59</sup>. A alfatiglicerase é produzida em células de cenoura; a sequência de aminoácidos da proteína é semelhante à da glicocerebrosidase humana, diferindo da mesma por dois aminoácidos na porção N-terminal, por sete aminoácidos na porção C-terminal e por um aminoácido da posição 495 (p.Arg495His). A taxa de formação de anticorpos anti-enzima é de 6%<sup>60</sup>. O sistema de produção da alfatiglicerase, por envolver células vegetais, é, ao mesmo tempo, a de menor custo e a de mais segurança do que as enzimas recombinantes, pois é livre de qualquer componente de células de mamíferos, não existindo risco de transmissão de patógenos que infectam mamíferos para os pacientes, inclusive de vírus, como ocorreu com imiglucerase em 2010. Por outro lado, o fato da enzima ser produzida a partir de células vegetais levanta a questão se esta enzima causaria maior número de reações e de eventos adversos relacionados à TRE. Em ensaios clínicos, a alfatiglicerase apresentou um perfil de eventos adversos<sup>61</sup> semelhantes ao das enzimas de origem animal<sup>62 63</sup>, assim como demonstrou ser eficaz em garantir o sucesso dos alvos terapêuticos da DG<sup>61</sup>.

Tabela 1. Resumo das características bioquímicas e indicação das enzimas recombinantes disponíveis para TRE na DG.

<i>Característica</i>	<i>Imiglucerase</i>	<i>Alfavelaglicerase</i>	<i>Alfatiglicerase</i>
Apresentação	400 UI	400 UI	200 UI
Indicação	A partir de 2 anos de idade	A partir de 4 anos de idade	A partir de 4 anos de idade
Forma de Produção	Células de Ovário de Hamster Chinês	Células Humanas	Células de Cenoura
Sequência de Aminoácidos	Variante p.Arg495His	Idêntica à proteína <i>wild type</i>	2 AA N-terminal 7 AA C-terminal Variante p.Arg495His

Padrão de Glicosilação	40 – 60% dos resíduos manose expostos	100% dos resíduos manose expostos	100% dos resíduos manose expostos
------------------------	---------------------------------------	-----------------------------------	-----------------------------------

A TRE, independentemente da enzima de escolha, mostrou ser segura e eficaz, sendo capaz de melhorar os parâmetros hematológicos, ósseos e viscerais da DG. Sua posologia é a de infusões endovenosas quinzenais, com doses que variam de 15 a 60 UI/kg/infusão. Nos primeiros 3 meses, as infusões devem ser realizadas em centros de referência para o tratamento da DG e, após, pode ser considerado realizar infusões domiciliares<sup>25</sup>.

A escolha de qual enzima a ser utilizada depende basicamente de qual está disponível e regularizada no país do paciente. Até 2010, a enzima que era a mais amplamente utilizada na assistência a pacientes com DG em todo o mundo era a imiglucerase, tendo em vista o maior tempo de mercado desta enzima. Neste ano, ocorreu uma contaminação viral na produção mundial da imiglucerase e, por isso, as enzimas recém-apresentadas à comunidade científica (alfataliglicerase e alfavelaglicerase) passaram a ser utilizadas assistencialmente como modo emergencial, assim garantindo o seguimento do tratamento dos pacientes com DG<sup>64,65</sup>. Após este período, em 2014, a alfataliglicerase se tornou a enzima de escolha no tratamento de pacientes adultos com DG no Brasil. Dois anos após, a mesma enzima foi estabelecida como primeira linha de tratamento também para pacientes pediátricos com DG no Brasil<sup>25</sup>.

### 1.6.1.2 A Alfataliglicerase

A alfataliglicerase foi aprovada para tratamento dos pacientes adultos com DG em 2012, pela agência reguladora americana, e, em 2013, pela ANVISA; é importante ressaltar que a alfataliglicerase nunca foi aprovada pela EMA (agência reguladora europeia). A eficácia da alfataliglicerase, em relação a parâmetros hematológicos e viscerais, foi estudada em um ensaio clínico multicêntrico duplo-cego randomizado, com duração de 9 meses, que incluiu 29 pacientes adultos<sup>61</sup>. O primeiro estudo a incluir crianças foi o de Pastores *et al.*<sup>66</sup>, em que de 31 pacientes, cinco eram crianças, todos previamente tratados com imiglucerase e

com quadro clínico estável; os parâmetros analisados permaneceram estáveis. Os eventos adversos relacionados ao tratamento variaram de leves a moderados, acometendo um total de 10 adultos (32%). Três pacientes tiveram reação à infusão, sendo que, destes, um adulto suspendeu o tratamento devido à reação na primeira infusão. Em relação a doença óssea, em estudo preliminar com 8 pacientes, foi realizada análise de infiltração da medula óssea através da técnica de QCSI (do inglês, *quantitative chemical shift*), notando melhora da infiltração após 1 ano de tratamento<sup>67</sup>. Em 2018, Zimran, em conjunto com Maas, publicaram um estudo em que analisaram 26 pacientes, sendo 15 virgens de tratamento. Destes 15, todos obtiveram melhora da infiltração medular através da técnica QCSI após 2 anos de seguimento. Em relação aos previamente tratados com imiglucerase, dos 11 pacientes, apenas 1 não teve melhora no padrão de infiltração medular. Com estes resultados, os autores levantam a hipótese de que trocar a TRE de imiglucerase para alfataliglicerase traria benefícios em relação à infiltração da medula óssea<sup>68</sup>.

O último ensaio clínico que avaliou a eficácia e a segurança da alfataliglicerase foi o de Zimran et al, em 2019. Neste estudo, foram avaliados 17 pacientes durante 5 anos de seguimento, e resultados com melhora dos parâmetros viscerais, hematológicos e ósseos foram relatados. Em relação à segurança, 85% dos pacientes apresentaram alguma forma de evento adverso, sendo a maioria classificadas como leve ou moderada; no entanto, seguindo os critérios do médico do estudo, nenhum evento adverso foi considerado relacionado à TRE com alfataliglicerase<sup>69</sup>.

No que tange à população brasileira, o único estudo publicado é o de Cravo et al, em 2018, em que avaliou, retrospectivamente, a eficácia em 13 pacientes em uso de alfataliglicerase por 3,5 anos e a segurança em 35 pacientes que tiveram, pelo menos, 1 infusão com a enzima. Os resultados confirmam a eficácia da enzima nos parâmetros analisados (visceral e hematológico apenas, a doença óssea não foi avaliada); no que diz respeito à segurança da enzima, dos 35 pacientes expostos a alfataliglicerase, três (9%) pacientes necessitaram descontinuar o tratamento por reação à infusão e 27 (78%) dos pacientes

apresentaram algum grau de evento adverso. Infelizmente, neste estudo, os eventos adversos não foram classificados se relacionados à TRE ou não<sup>70</sup>.

### **1.6.1.3 A Terapia Enzimática em Gestantes e Puérperas**

A gestação de mulheres com diagnóstico de DG pode ser complicada tanto pela doença visceral, quando hematológica e óssea, assim como os sintomas da DG podem ser exacerbados durante a gestação. Previamente ao início da TRE para a DG, a taxa de abortamentos de mulheres com DG chegava a 25% e a gestação era complicada por hemorragia, trombocitopenia, febre puerperal e crises ósseas<sup>71</sup>. Inclusive, o diagnóstico da DG ocorre frequentemente durante a gestação<sup>72</sup>. Em 2009, Zimran et al publicaram estudo de questionário aplicado a médicos especialistas em DG ao redor do mundo, e avaliaram um total de 416 gestações em pacientes com DG, chegando à conclusão de que o tratamento com imiglucerase reduz risco de abortamento e risco de complicações agudas da DG durante a gestação, parto e puerpério, principalmente em relação a sangramento periparto. Além disso, não foram relatados efeitos adversos ou teratogênicos durante o tratamento com imiglucerase. Ainda, Zimran et al, em 2009, recomendaram que a TRE com imiglucerase deveria ser mantida durante a gestação no caso de mulheres já em tratamento prévio à concepção, e que a dose da enzima deveria ser calculada em relação ao peso pré-gestação<sup>72</sup>. Granovsky-Grisaru et al, em 2011, orientaram que, nas pacientes sintomáticas com DG, o ideal seria planejar a gestação para realizar TRE com imiglucerase previamente à concepção para estar com os parâmetros de gravidade da DG estáveis e em níveis adequados para a gestação, devendo a gestante manter a TRE durante a gestação e período periparto. Além disso, foi verificado que suspender a TRE com imiglucerase em mulheres previamente tratadas com a enzima ao diagnóstico da gestação estava associado a maiores riscos do que a manutenção deste tratamento durante a gestação. Neste estudo, também não foram relatados efeitos adversos ou teratogênicos relacionados à imiglucerase<sup>73</sup>. Em 2014, Elstein et al avaliaram 25 gestações de pacientes expostas a alfavelaglicerase, chegando à conclusão de que esta enzima é eficaz e segura para ser utilizada pelas pacientes com DG enquanto gestantes, não

correlacionando qualquer efeito teratogênico aos produtos destas gestações<sup>71</sup>. Lau et al, em 2018, reportaram 453 gestações de mulheres com DG, sendo que 117 (25%) estavam realizando TRE com imiglucerase ou alfavelaglicerase. A taxa de crianças saudáveis como produto concepcional foi semelhante entre as gestantes em TRE e em virgens de tratamento; a taxa de aborto foi maior no grupo de mulheres em TRE do que nas virgens de tratamento (6,9% vs 3,6%, respectivamente,  $p=0,1$ ), no entanto, tal evidência não foi estatisticamente significativa<sup>74</sup>. Nenhuma gestação em uso de alfataliglicerase ou TRS foi reportada na literatura.

Em relação especificamente ao período de aleitamento materno, Sekijima et al, em 2010, publicaram relato de caso em que a paciente com DG tipo 1 manteve tratamento com imiglucerase durante a gestação, o parto e o puerpério. Durante o período de aleitamento materno, realizaram estudo em que quantificaram a atividade da glicocerebrosidase no leite materno antes e depois da infusão enzimática, durante as 24h subsequentes à infusão. O resultado foi que a imiglucerase é excretada em pequenas quantidades no leite materno, principalmente na primeira mamada após a infusão; após, os valores reduzem e se assemelham ao valor pré-infusão<sup>75</sup>. Dornelles et al, em 2014, publicaram estudo comparando a excreção de glicocerebrosidase no leite de uma paciente em TRE com imiglucerase ao de uma puérpera saudável. A conclusão foi de que, de fato, a imiglucerase é excretada no leite humano em quantidades muito inferiores do que a enzima “*wild type*”, quando comparado os valores entre a paciente com DG em tratamento e a puérpera saudável. Ainda, neste último estudo foi recomendado que a decisão sobre o aleitamento materno não deve envolver o fato de estar-se realizando TRE com imiglucerase, mas sim, nas condições clínicas da mãe e do bebê, devendo-se estar atento para garantir adequada ingesta de cálcio e de níveis normais de vitamina D durante este período, além de monitoramento da densidade mineral óssea materna<sup>76</sup>. Não foram relatados efeitos adversos em crianças amamentadas por mães em uso de imiglucerase ou alfavelaglicerase<sup>72,73</sup>.



### 1.6.2 Terapia de Redução de Substrato

Em resposta à inconveniência da administração parenteral da TRE, houve iniciativas para desenvolvimento de tratamentos alternativos, incluindo o uso oral de agentes inibidores da formação ou de redução do substrato (TRS). A primeira droga a ser aprovada pela FDA, EMA e ANVISA como TRS foi o miglustate, produzido pela empresa Actelion Pharmaceuticals (Allschwil/Suíça)<sup>77</sup>. Este medicamento obteve resultados clínicos e laboratoriais modestos<sup>78</sup>. Hoje, o miglustate é aprovado na Europa e nos Estados Unidos da América apenas para pacientes que tem contraindicação expressa ao uso de TRE e que apresentam DG leve ou moderada, já estável em relação aos alvos terapêuticos<sup>21</sup>. Além disto, é importante ressaltar os eventos adversos relacionados a esta enzima, que são principalmente gastrointestinais, como diarreia e perda de peso, e neurológicos, com neuropatia periférica quando utilizado a longo prazo<sup>78-80</sup>. O outro fármaco mais recentemente aprovado pelas agências reguladoras para ser utilizado como TRS, inclusive como primeira linha de tratamento para DG, é o eliglustate, produzido pela empresa Sanofi (Gentilly, França) em 2014, que além de atuar como TRS, é também um análogo da ceramida. O eliglustate tem mostrado eficácia e segurança semelhantes à TRE, e uma boa eficácia em termos do acometimento ósseo da DG nos ensaios clínicos realizados até hoje<sup>21,81,82</sup>.

### 1.6.3 O Manejo Clínico na DG tipo 2

Infelizmente, até o presente momento, não existe terapia modificadora de fenótipo ou curativa para a DG tipo 2 e, por isso, é realizado manejo clínico que, na maioria das vezes, é paliativo para estes pacientes. Em 2015, Weiss et al publicaram um *guideline* para auxiliar o manejo clínico destes pacientes, chamando atenção para a necessidade em envolver a família, a equipe médica e a equipe multiprofissional, principalmente os profissionais que auxiliam as famílias na rede de suporte, desde o início do manejo destes pacientes, para, juntos, definirem o objetivo real do tratamento e para todos cooperarem em conjunto para o manejo deste grave diagnóstico<sup>43</sup>.

#### 1.6.4 Terapias Futuras

Outras terapias que sejam capazes de cruzar a barreira hematoencefálica estão constantemente sendo buscadas no intuito de ser possível, também, tratar os pacientes com acometimento neurológico. Chaperonas são moléculas pequenas que podem ser consideradas como forma de tratamento para doenças causadas por proteínas mal dobradas. Estas moléculas seriam capazes de ligar-se ao seu alvo, no caso da DG, à glicocerebrosidase mal dobrada ainda no retículo endoplasmático, para evitar sua degradação e garantir que a proteína, mesmo que mal dobrada, atinja os lisossomos. Como diversas variantes patogênicas no *GBA1* tratam-se de mutações de troca de sentido, esta estratégia poderia trazer grandes benefícios<sup>83</sup>. O ambroxol, agente utilizado amplamente para controle da tosse, teve sua eficácia como chaperona para a enzima glicocerebrosidase comprovada em estudos *in vitro* e em modelos animais<sup>84-87</sup>. Em ensaio clínico piloto com 5 pacientes com DG tipo 3, o ambroxol mostrou ser seguro e eficaz: aumentou a atividade enzimática da glicocerebrosidase em leucócitos, penetrou a barreira hematoencefálica e reduziu os níveis de glicosilesfingosina no líquido. Manifestações neurológicas como mioclonia, convulsões e reflexos pupilares melhoraram e, inclusive, dois pacientes que antes não caminhavam voltaram a deambular<sup>88</sup>. Ensaio clínico com maior número de pacientes e com maior duração é necessário para que a droga seja aprovada nas agências reguladoras como terapia para DG.

A história da terapia gênica na DG iniciou em 1990, quando Fink et al publicaram a prova de que altos títulos de aplicação de vetor de retrovírus com *GBA1* humano poderiam normalizar a atividade enzimática da glicocerebrosidase *in vitro*<sup>89</sup>. Após, em 1998 o mesmo grupo realizou um ensaio clínico para avaliar eficácia e segurança, em que visualizaram que a taxa de células corrigidas com o *GBA1* através do vetor viral era extremamente baixa, não sendo capaz de corrigir a atividade enzimática nos pacientes avaliados<sup>90</sup>. Mais recentemente, Du et al, em 2019, publicaram ensaio clínico em camundongos *knockout* para *Gba1* com terapia gênica através de vetor com adenovírus 9 expressando *Gba1*: resultados de aumento da atividade enzimática, melhora neuropatológica e aumento de expectativa de vida trouxeram boas perspectivas para a terapia gênica na DG<sup>91</sup>.

## 1.7 Seguimento Clínico

Existem alguns padrões de seguimento clínico dos pacientes com DG ao redor do mundo. Em sua maioria, estes indivíduos são acompanhados por hematologistas, metabologistas, geneticistas, pediatras, gastroenterologistas ou reumatologistas. O tratamento de suporte também é oferecido por médicos ortopedistas, neurologistas e por outras especialidades médicas. O importante de se salientar é que o seguimento clínico destes pacientes costuma ser multidisciplinar devido à ampla gama de manifestações clínicas que estes pacientes apresentam<sup>21</sup>. Até o presente momento, não existe um consenso com *guideline* mundial para o seguimento da DG; no entanto, desde 2004, ano em que Pastores et al publicaram os alvos terapêuticos para a DG<sup>92</sup>, os diversos centros de referência no tratamento para DG espalhados pelo mundo utilizam este modelo e o adequam para a realidade local. Em 2004, os alvos terapêuticos da DG eram direcionados (1) à anemia, (2) à trombocitopenia, (3) à hepatomegalia, (4) à esplenomegalia, (5) à doença óssea, (6) ao crescimento dos pacientes pediátricos, (7) ao envolvimento pulmonar e (8) à qualidade de vida. À época, em relação a doença óssea, os parâmetros de melhora dos pacientes eram relacionados apenas a fraturas, dor, complicações crônicas e à densidade mineral óssea, não envolvendo a infiltração da medula óssea. Estes alvos terapêuticos foram revistos ao longo dos anos por diferentes grupos de colaboração internacional, e diversos ensaios clínicos de novos fármacos para a DG utilizaram esta ferramenta como avaliação de eficácia terapêutica<sup>93,94</sup>. Em sua última revisão, Biegstraaten e colaboradores do *European Working Group on Gaucher Disease*, em 2018<sup>95</sup>, incluíram, além dos 8 alvos terapêuticos referidos por Pastores et al, em 2004, também a avaliação da fadiga e da participação social, e ainda dividem todos os alvos terapêuticos em critérios a serem atingidos a curto, Tabela 2, e a longo prazos, Tabela 3.

Tabela 2. Alvos terapêuticos a curto prazo da DG tipo 1. Adaptado de Biegstraaten et al 2018<sup>95</sup>.

<b>Alvos Terapêuticos a Curto Prazo para DG tipo 1</b>	
<b>Categoria</b>	<b>Alvos Terapêuticos</b>

Anemia	Eliminar necessidade de transfusão sanguínea Eleva níveis de hemoglobina em 12 a 24 meses para > 11g/dL em mulheres e crianças e > 12 g/dL em homens
Tendência a Sangramento	Eleva contagem plaquetária em 1 ano de tratamento o suficiente para prevenir sangramentos cirúrgicos e espontâneos Se esplenectomia: normalizar contagem plaquetária em 1 ano de tratamento Baço intacto: alcançar > 100.000/mm <sup>3</sup> plaquetas em 3 anos
Mobilidade	Diminuir óssea que não seja relacionada a lesões irreversíveis em 1 a 2 anos de tratamento Reduzir envolvimento da medula óssea, medido com escore utilizado localmente (BMB ou Düsseldorf), em pacientes sem doença grave irreversível ao início do tratamento Eleva a densidade mineral óssea em 2 anos para adultos com escore T < -2,5 no início do tratamento Atingir pico de massa óssea ideal em crianças Normalizar crescimento conforme curva própria em 2 anos de tratamento
Complicações Viscerais	Evitar esplenectomia Aliviar sintomas de esplenomegalia (distensão abdominal, infartos esplênicos, saciedade precoce) Eliminar o hiperesplenismo Reduzir volumes esplênicos a menor do que 2 a 8 vezes o normal em 1-2 anos, a depender do volume inicial Reduzir volumes hepáticos a menor do que 1 a 1,5 vezes o normal em 1-2 anos, a depender do volume inicial
Bem-estar Geral	Melhorar escores de qualidade de vida medidos com questionário adequado em 2-3 anos de tratamento Reduzir fadiga (não relacionada à anemia) Melhorar ou retornar à capacidade física, exercendo tarefas de vida diárias e cumprindo funções laborais

Tabela 3. Alvos terapêuticos a longo prazo da DG tipo 1. Adaptado de Biegstraaten et al 2018<sup>95</sup>.

<b>Alvos Terapêuticos a Longo Prazo da DG tipo 1</b>	
<b>Categoria</b>	<b>Alvo Terapêutico</b>
Anemia	Manter níveis de hemoglobina atingidos após 12 a 24 meses de tratamento
Tendência a Sangramento	Manter plaquetas > 100.000/mm <sup>3</sup> Reduzir tendência a sangramentos, seja por baixa contagem plaquetária, defeitos plaquetários ou anormalidades de coagulação
Mobilidade	Prevenir complicações ósseas: necroses avasculares, crises ósseas, infartos ósseos e fraturas patológicas Prevenir osteopenia e osteoporose Prevenir uso crônico de analgésicos Manter mobilidade normal ou melhorar a mobilidade Aumentar atividades físicas
Complicações Viscerais	Manter volume esplênico < que 2 a 8 vezes o normal após 1-2 anos de tratamento Manter volume hepático próximo do normal após 1-2 anos de tratamento Prevenir fibrose e cirrose hepáticas e hipertensão portal

Complicações Pulmonares	Prevenir ou melhorar a função pulmonar, como a hipertensão pulmonar e a síndrome hepatopulmonar
Bem-Estar Geral	Manter boa qualidade de vida medida por escores de qualidade de vida validados Manter participação normal nos estudos ou no trabalho Minimizar danos psicossociais a longo prazo Atingir puberdade normalmente Normalizar a expectativa de vida
Gestação e Parto	Prevenir complicações da DG durante a gestação e parto

Em relação à doença óssea, Biegstraaten et al traz de inovador que, além dos pontos clássicos definidos por Pastores et al em 2004, é indispensável a avaliação da infiltração da medula óssea nestes pacientes. A curto prazo, os pacientes deveriam diminuir dor óssea em 1 a 2 anos, aumentar a densidade mineral óssea em 2 anos, adquirir massa óssea ideal enquanto criança, normalizar a curva de crescimento e reduzir a infiltração medular através do escore utilizado localmente (escore de *Bone Marrow Burden*<sup>96</sup> ou escore de Düsseldorf Gaucher<sup>97</sup>). A longo prazo, os pacientes deveriam ter as complicações ósseas (osteonecrose, crises ósseas, fraturas patológicas) evitadas, a osteopenia e a osteoporose evitada, o uso crônico de analgésicos para dor óssea prevenido e a sua deambulação mantida<sup>95</sup>. É importante ressaltar que, apesar de a avaliação da infiltração de medula óssea ter sido incluída nos critérios de alvos terapêuticos, ela não está bem determinada, uma vez que não está definido o quanto a infiltração deve reduzir, nem em quanto tempo.

Outra maneira de realizar o seguimento clínico destes pacientes, que complementa o seguimento dos alvos terapêuticos, são os escores de gravidade da DG, que devem ser aplicados a cada consulta médica. Para pacientes com DG tipo 1, existem três escores disponíveis para serem utilizados assistencialmente: (1) o SSI (*Severity Score Index*), publicado por Zimran et al, em 1992, varia de 0 a 48, pode ser categorizado em acometimento brando (0 a 9), moderado (10-19) ou grave (>20), e leva em consideração a presença de citopenias, visceromegalias, esplenectomia, alteração da função hepática, alteração no SNC, acometimento de outros órgãos, alterações radiológicas, dor óssea e fraturas<sup>98</sup>; (2) o escore DS3 (*Disease Severity Scoring System*), publicado por Weinreb et al, em 2010, varia de 0 a 19 pontos, é categorizado em doença leve (0 - 3), moderada (3 - 6),

acentuada (6 – 9) ou doença grave (>9), e leva em consideração a gradação de parâmetros de acometimento ósseo (lesões líticas, necrose, ou fraturas, dor óssea ou articular, crise óssea, infiltração da medula óssea e densitometria óssea), hematológico (trombocitopenia, sangramentos, anemia) e visceral (esplenomegalia, hepatomegalia e doença pulmonar)<sup>99</sup>; (3) o escore pediátrico da DG foi publicado em 2013 por Kallish e Kaplan e leva em consideração, além dos pontos do escore DS3, a curva de crescimento do paciente pediátrico<sup>100</sup>. Para a DG tipo 3, foi publicado em 2007 por Davies et al o escore de gravidade para avaliar o acometimento neurológico de pacientes neuronopatas. Este escore varia de 0 a 33 pontos (sendo 33 o mais grave), e inclui avaliação da movimentação ocular, da epilepsia, do desenvolvimento e da capacidade cognitiva e do padrão neurológico (marcha, sinais cerebelares, piramidais e extrapiramidais), além de graduar a fala, função oral e cifose<sup>101</sup>.

## **1.8 O Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas do Ministério da Saúde do Brasil**

No Brasil, idealmente todos os centros de tratamento para DG devem seguir o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas do Ministério da Saúde (PCDT). Este PCDT tem como objetivo padronizar a indicação de tratamento e de seguimento terapêutico de todos os pacientes com DG no Brasil<sup>25</sup>.

### **1.8.1 Indicação de Tratamento e Doses Recomendadas**

Segundo o Protocolo, está indicado iniciar tratamento com TRE para os pacientes com diagnóstico clínico e bioquímico e/ou molecular que possuam pelo menos mais um dos critérios relacionados: (1) anemia, (2) plaquetopenia, (3) sangramento espontâneo, (3) hepatomegalia, (4) esplenomegalia, (5) sinais radiológicos de acometimento esquelético reversível (osteopenia, osteoporose, infiltração de medula óssea, deformidade em frasco de Erlenmeyer), (6) sintomas incapacitantes, principalmente dores, (7) crescimento inapropriado, (8) acometimento pulmonar ou cardíaco da DG, (9) mieloma múltiplo, (10) esplenectomia, (11) DG tipo 3 ou (12) acometimento hepático (aumento de, no

mínimo, duas vezes na dosagem de AST e ALT ou prolongamento do tempo da protrombina (menor de 70% em relação ao controle)<sup>25</sup>.

No PCDT, a dose recomendada a se iniciar o tratamento de um adulto sem doença grave é a menor dose possível, de 15 UI/Kg/infusão, quinzenalmente. Ajustes de dose são recomendados a depender da resposta clínica e laboratorial do paciente. Para crianças menores de 12 anos e para adolescentes de até 19 anos que não tenham completado o crescimento ósseo, a dose inicial recomendada é a de 30UI/Kg/Infusão quinzenal. A dose de 60UI/Kg/infusão quinzenal fica recomendada apenas para casos graves da doença, para qualquer faixa-etária, e os pacientes em uso desta dosagem devem ser revisitados semestralmente em centros de referência no intuito de avaliar a necessidade da manutenção desta dose.

### 1.8.2 Monitorização do Tratamento

O PCDT elaborou um quadro de seguimento, ou de monitorização mínima, para pacientes em tratamento, em que se baseia principalmente na anamnese e no exame físico, mas também em exames complementares semestrais, anuais ou conforme a clínica do paciente, Quadro 1.

Quadro 1. Monitorização mínima recomendada pelo PCDT do Ministério da Saúde Brasileiro<sup>25</sup>.

<b>AVALIAÇÃO</b>	<b>ANTES DO INÍCIO DO TRATAMENTO</b>	<b>MONITORIZAÇÃO</b>	<b>PERIODICIDADE DA MONITORIZAÇÃO</b>
Anamnese	Sim	Sim	Trimestral
Exame físico (inclui medida de fígado e baço com fita métrica)	Sim	Sim	Trimestral
Atividade da glicocerebrosidase	Sim	Não	-
Hemograma e Plaquetas	Sim	Sim	Semestral
Ferritina, AST, ALT, GGT, tempo de protrombina	Sim	Sim	Anual
USG ou RNM de abdômen	Sim	Sim	Somente se piora da hepatoesplenomegalia ao exame físico

Densitometria Óssea	Sim	Sim	Somente se suspeita ou monitorização de osteoporose
RX de coluna, quadril e ossos longos	Sim	Sim	Somente se piora da dor óssea
RX de mãos para idade óssea	Sim, em crianças ou adolescentes com atraso do crescimento	Sim, em crianças ou adolescentes com atraso do crescimento	Conforme apresentação clínica
Vit. B12	Sim, se anemia ou manifestações clínicas sugestivas de deficiência	Sim, se anemia ou manifestações clínicas sugestivas de deficiência	Conforme apresentação clínica
Eletroforese de proteínas	Sim	Sim	A cada 3-5 anos em pacientes adultos
RNM de coluna e fêmur	Sim	Sim	A cada 5 anos, conforme disponibilidade local

### 1.8.3 Avaliação da Resposta Terapêutica

A avaliação da resposta ao tratamento proposto pelo PCDT foi baseada nos alvos terapêuticos de Pastores et al em 2004<sup>92</sup> e adaptada à realidade brasileira, Quadro 2. Note que nas recomendações do PCDT brasileiro não está recomendada avaliação de infiltração de medula óssea como forma de alvo terapêutico.

Quadro 2. Alvos terapêuticos na Doença de Gaucher. Adaptado de Picon et al 2014<sup>25</sup>.

Parâmetro	Alvo
Anemia	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Normalizar os níveis de hemoglobina após 12-24 meses de tratamento</li> <li>• Eliminar dependência de transfusões sanguíneas</li> <li>• Reduzir fadiga, dispneia e angina</li> </ul>
Trombocitopenia	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumentar o número de plaquetas em níveis suficientes para prevenir sangramento espontâneo ou associado a procedimentos após 1 ano de tratamento</li> <li>• Normalizar a contagem de plaquetas em pacientes esplenectomizados</li> <li>• Normalizar os níveis de plaquetas em pacientes não esplenectomizados após 2 anos de tratamento, se os níveis pré-tratamento estavam acima de 60.000/mm<sup>3</sup>; nos demais casos, dobrar os valores iniciais</li> </ul>



Hepatomegalia	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reduzir o volume hepático em 20-30% no primeiro ano e em 30-45% até o quinto ano em tratamento</li> </ul>
Esplenomegalia	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reduzir o volume esplênico em 30%-50% no primeiro ano e em 50%-60% até o quinto ano de tratamento</li> <li>• Aliviar a distensão abdominal e a saciedade precoce</li> <li>• Prevenir a ocorrência de infartos esplênicos</li> <li>• Eliminar hiperesplenismo</li> </ul>
Acometimento esquelético	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diminuir a dor óssea (após 2 anos de tratamento)</li> <li>• Prevenir a ocorrência de crises ósseas, osteonecrose e colapso articular subcondral</li> <li>• Aumentar a densidade mineral óssea (após 5 anos de tratamento)</li> </ul>
Acometimento pulmonar	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reverter a síndrome hepatorenal e a dependência de oxigênio</li> <li>• Diminuir hipertensão pulmonar.</li> <li>• Melhorar a funcionalidade e a qualidade de vida</li> <li>• Evitar a deterioração rápida da doença pulmonar e a morte súbita</li> <li>• Evitar a doença pulmonar</li> </ul>
Crescimento	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Normalizar o crescimento (após 3 anos de tratamento)</li> <li>• Promover o início normal da puberdade</li> </ul>
Qualidade de Vida	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Melhorar a funcionalidade e a qualidade de vida aferida por questionários validados</li> </ul>

### 1.9 Ferramentas Utilizadas na Avaliação da Infiltração da Medula Óssea

Como visto na presente introdução, um dos achados mais significativos da fisiopatogenia e, por consequência, do fenótipo dos pacientes com DG é a infiltração de células de Gaucher na medula óssea. Desta maneira, é de fundamental importância que se estabeleça um método adequado de avaliação e de seguimento a longo prazo destes pacientes em tratamento.

O primeiro estudo a levantar a possibilidade de se realizar um método quantitativo de avaliação da infiltração da medula óssea na DG, foi publicado em 1985 por Wismer et al<sup>102</sup>. Este estudo avaliou imagens da medula óssea de voluntários saudáveis, pacientes com doenças metabólicas (DG), inflamatórias, traumáticas e neoplásicas a partir da técnica de QCSI (do inglês, *quantitative chemical shift*), descrita no ano anterior por Thomas Dixon<sup>103</sup>. Esta técnica, à época inovadora, trouxe de benefícios a possibilidade de gerar imagens baseadas

exclusivamente na intensidade do sinal da água ou da gordura, ou ainda da diferença entre as duas. No estudo de Wismer et al, em relação à medula amarela, que fisiologicamente é rica em gordura, nos pacientes com DG, ocorre substituição dos adipócitos por células de Gaucher, ocasionando uma redução da fração de gordura nestes locais, sendo o sinal mais intenso considerado o normal e o sinal menos intenso o patológico, tanto em T1 quanto em T2<sup>102</sup>. O grupo americano de Massachusetts liderado por Daniel Rosenthal, publicam 3 artigos de 1986 a 1992 utilizando a técnica de Dixon QCSI, e confirmaram que (1) as lesões na DG podem ser focais ou difusas, sendo evidenciadas por sinais de hipointensidades tanto no T1 quanto no T2 na medula axial e periférica; (2) as epífises dos ossos longos são afetadas apenas em casos graves da DG; (3) áreas de sinais de hiperintensidade no T2 representam lesões agudas recentes; (4) o grau de infiltração da medula óssea medido através da técnica QCSI se correlaciona com a gravidade da DG e com o volume esplênico do paciente com DG<sup>104-106</sup>.

Em 2002, Maas et al publicam um artigo em que justificam que, de fato, a avaliação da medula óssea deve ser feita a partir de técnicas de ressonância magnética, tendo em vista sua excelente capacidade de contraste de tecido conjuntivo e sua alta sensibilidade em detectar lesões focais ou difusas. No intuito de utilizar um método quantitativo para seguimento clínico e para avaliar resposta terapêutica da infiltração na medula óssea na DG, Maas utilizou a técnica de Dixon QCSI e quantificou a fração de gordura de 30 colunas lombares de pacientes com DG e demonstrou que (1) a fração de gordura na coluna lombar é inversamente proporcional a gravidade da doença óssea (tanto axial quanto periférica), sendo considerado um bom biomarcador do acometimento ósseo da DG; e que (2) o risco de complicações ósseas (osteonecrose, por exemplo) aumenta em 85% para cada redução de 10% na fração de gordura da coluna lombar<sup>107</sup>.

### **1.9.1 O escore *Bone Marrow Burden* de Maas**

A avaliação quantitativa da infiltração da medula óssea através fração de gordura medida através das sequências de Dixon QCSI é o método mais sensível

para determinar gravidade e prognóstico de complicações ósseas na DG, no entanto, ele não está disponível assistencialmente na maioria dos locais do mundo. Por outro lado, a técnica usual de sequências de ressonância magnética são ideias para avaliar lesão e acometimento de infiltração medular, no entanto, é um método qualitativo, não quantitativo<sup>108</sup>. No intuito de criar uma técnica que fosse capaz de medir a infiltração da medula óssea e que estivesse disponível nos diversos centros mundiais, Maas et al, em 2003, publicaram o *Bone Marrow Burden score* (BMB) após avaliarem ressonâncias de coluna e fêmur de 30 pacientes com DG e compará-las com a fração de gordura pela técnica de Dixon QCSI. Maas et al foram capazes de criar um escore que, apesar de não ser tão sensível quanto o de Dixon QCSI (75% vs 92%), se correlacionasse fortemente com a fração de gordura pela técnica de Dixon QCSI ( $p = -0,78$ ,  $P < 0,001$ )<sup>96</sup>.

O escore BMB avalia a infiltração da medula óssea tanto em coluna lombar quanto em fêmur em sequências de ressonância magnética T1 e T2. O escore leva em consideração tanto a intensidade do sinal quanto a distribuição do sinal para cada região analisada: coluna, Quadro 3, e fêmur, Quadro 4. É esperado que a infiltração com células de Gaucher apareça sob forma de hipointensidades, tanto em T1 quanto em T2, e que as lesões agudas (osteonecroses) apareçam como sinais hiperintensos na sequência T2. O escore varia de 0 a 16, o que corresponde a soma dos subtotais da coluna (total = 8) e do fêmur (total = 8), sendo que quanto maior o escore, mais grave é a infiltração medular<sup>96</sup>.

Quadro 3. Escore BMB – Coluna Lombar. Adaptado de Maas et al 2003<sup>96</sup>.

<b>Intensidade do Sinal à RM</b>		
<b>Sequência</b>	<b>Intensidade do Sinal*</b>	<b>Escore BMB</b>
T2	Hiperintenso	2
T2	Levemente Hiperintenso	1
T2	Isointenso	0
T2	Levemente Hipointenso	1
T2	Hipointenso	2
T1	Levemente Hiperintenso	0
T1	Isointenso	1
T1	Levemente Hipointenso	2
T1	Hipointenso	3

* Em relação à intensidade do sinal de disco intervertebral saudável	
<b>Padrão de Infiltração</b>	
<b>Padrão</b>	<b>Escore BMB</b>
Focal	1
Difuso	2
Ausência da gordura na região da veia basivertebral	1

Quadro 4. Escore BMB – Fêmur. Adaptado de Maas et al 2003<sup>96</sup>.

<b>Intensidade do Sinal à RM</b>		
<b>Sequência</b>	<b>Intensidade do Sinal*</b>	<b>Escore BMB</b>
T2	Hiperintenso	2
T2	Levemente Hiperintenso	1
T2	Isointenso	0
T2	Levemente Hipointenso	1
T2	Hipointenso	2
T2	Tipo Misto	3
T1	Isointenso ou Levemente Hiperintenso	0
T1	Levemente Hipointenso	1
T1	Hipointenso	2
* Em relação à intensidade do sinal da gordura subcutânea		
<b>Padrão de Infiltração</b>		
<b>Padrão</b>	<b>Escore BMB</b>	
Diáfise	1	
Epífise Proximal/Apófise	2	
Epífise Distal	3	

As vantagens do escore BMB em relação à técnica de Dixon QCSI são que (1) o escore é capaz de ser realizado em qualquer máquina de ressonância magnética do mundo, enquanto a técnica de Dixon QCSI está disponível apenas na Holanda; (2) qualquer radiologista bem treinado é capaz de pontuar o escore; e (3) o escore BMB leva em conta tanto a coluna quanto o fêmur, sendo os dois sítios de extrema importância na DG, uma vez que a coluna é o primeiro local a sofrer com a infiltração e o fêmur é o principal sítio de eventos agudos, enquanto que a técnica de Dixon QCSI avalia apenas a fração de gordura da coluna lombar. As desvantagens do BMB em relação à técnica de Dixon QCSI é que ela é (1)

menos sensível, é (2) semiquantitativa, enquanto que a de Dixon é quantitativa e é (3) examinador-dependente.

Quatro anos após a publicação do escore BMB, Robertson et al publicaram a experiência do grupo com o escore em uma avaliação longitudinal de sua coorte. O estudo retrospectivo avaliou 57 pacientes com DG através de ressonância magnética e comparou imagens pré e pós-tratamento com TRE, chegando a conclusão de que os pacientes reduziam pelo menos 2 pontos no escore após a TRE, Figura 6, sendo considerado um bom marcador terapêutico para a TRE. Robertson et al também trazem uma classificação do escore BMB de acordo com a gravidade da infiltração medular: escores de 0 a 4 foram considerados leves, de 5 a 8, moderados e de 9 a 16, graves<sup>109</sup>.

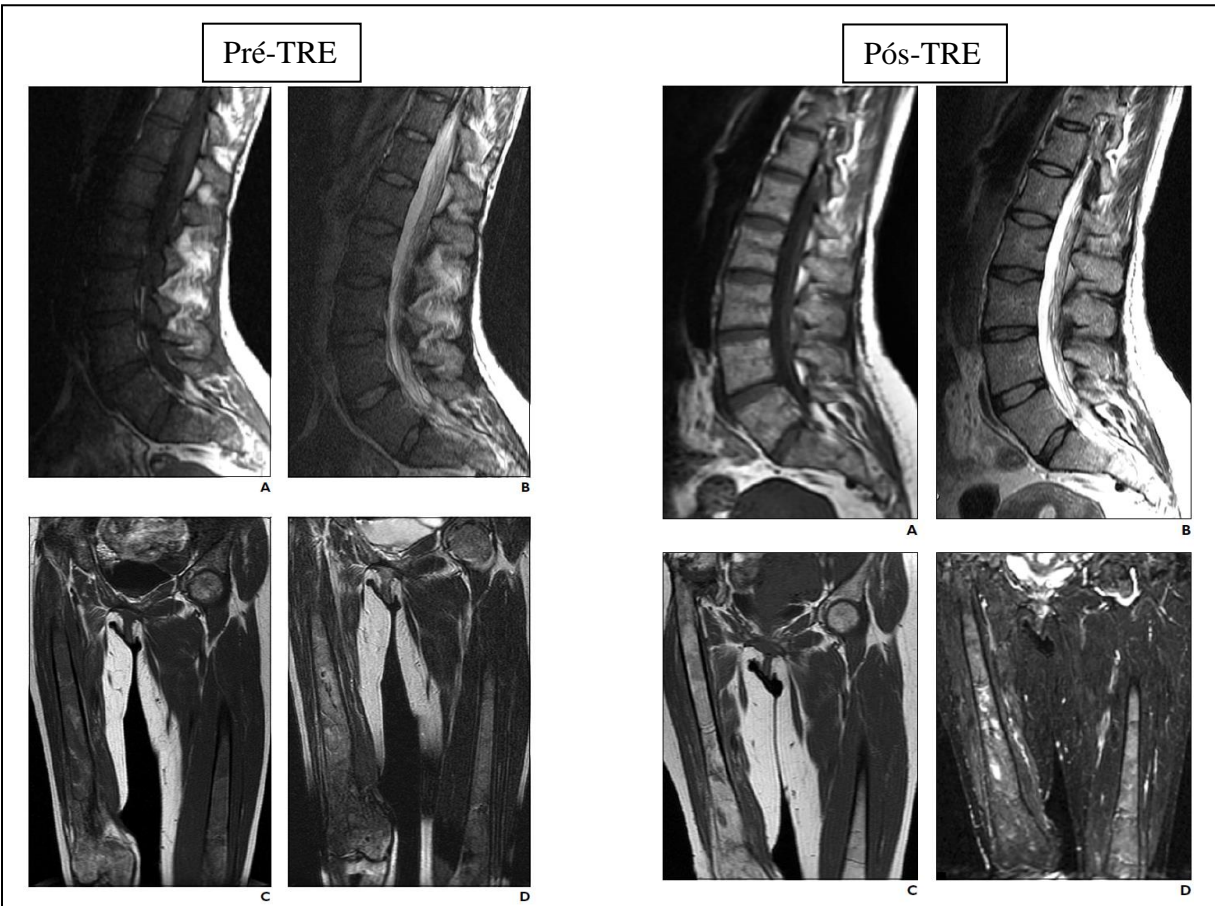


Figura 6. Imagens da mesma paciente antes da TRE e 20 meses após a TRE, de coluna lombar sagital T1 (A) e T2 (B) e de fêmures coronal T1 (C) e T2 (D). Na avaliação pré-TRE a paciente apresentava hipointensidades grau 4 na coluna com distribuição 3; e hipointensidade máxima de grau 5 em fêmures com distribuição 3, atingindo inclusive as epífises, garantindo um escore total pré-tratamento = 15/16. Vinte meses após TRE, a paciente apresentava hipointensidades grau 1 com distribuição 3 na coluna e hipointensidades grau 5 com distribuição grau 1, totalizando um escore 10/16. Adaptado de Robertson et al, 2007<sup>109</sup>.

### 1.9.2 O escore de Düsseldorf

O escore de Düsseldorf foi elaborado por Poll et al, em 2005, e leva em consideração o padrão de acometimento, ou de infiltração, do fêmur, classificando os pacientes em 2 categorias: Padrão A, homogêneo, e Padrão B, não homogêneo. O Padrão B de acometimento foi relacionado a maiores chances de desenvolver osteonecrose<sup>97</sup>. Comparando-se os escores BMB e Düsseldorf, o primeiro leva vantagem nos seguintes aspectos: (1) ele analisa não só o

esquelético apendicular, mas também o axial, o que é de extrema importância na DG, visto que o primeiro sítio a ser afetado pela infiltração de células de Gaucher na medula óssea é a coluna lombar; (2) o escore de Düsseldorf fornece apenas 2 categorias de gravidade da infiltração, necessitando o paciente piorar muito para que ocorra uma troca de uma categoria para a outra, enquanto que no escore BMB existem 3 categorias e o paciente pode receber diferentes escores de 0 a 16, podendo-se observar a melhora e a piora de maneira mais sensível.

### **1.9.3 Avaliações da Infiltração Medular a Longo Prazo**

O escore BMB vem sendo utilizado mundialmente na avaliação da medula óssea dos pacientes com DG. Em 2006, Maaik de Fost et al utilizaram o escore BMB para avaliar ressonâncias de fêmur e reportaram que os pacientes que utilizavam doses maiores de TRE apresentavam quedas mais bruscas no BMB pré e pós tratamento<sup>110</sup>. Dois anos após, De Mayo et al avaliaram 47 pacientes em estudo transversal e compararam o BMB com variáveis como genótipo, esplenectomizados vs não esplenectomizados, volume hepático, idade e tempo cumulativo em TRE. De Mayo et al concluíram que pacientes homocigotos para N370S tiveram escore menor do que heterocigotos, sendo que os heterocigotos compostos N370S/L444P tiveram os escores mais altos, e que pacientes esplenectomizados também apresentavam escores mais altos do BMB<sup>111</sup>.

Até 2014, não havia estudos utilizando o BMB para avaliar longitudinalmente, em longo prazo, o efeito da TRE no BMB, quando Elstein et al publicaram o impacto da alfa-galactosidase no BMB após 7 anos de TRE. A conclusão do estudo foi que os pacientes reduziram o escore BMB nos primeiros 5 anos e, depois, sustentaram tal mudança por mais 2 anos de seguimento<sup>94</sup>. Fedida et al, em 2015, publicaram um estudo retrospectivo longitudinal em que avaliou-se 9 pacientes virgens de tratamento e 31 pacientes que já vinham realizando TRE há muitos anos. Seu estudo calculou uma taxa de redução média de BMB por ano para toda a população estudada (-0,15 pontos/ano,  $p < 0,001$ ) e, depois, calculou a mesma taxa para apenas os primeiros 5 anos de TRE (-0,35 pontos/ano,  $p = 0,003$ ). Além disso, Fedida et al comprovaram que o BMB não

tende a sofrer modificações após 5 anos de TRE, e sugeriram aumentar o intervalo entre as ressonâncias após 5 anos de tratamento em pacientes sem mudanças clínicas significativas<sup>112</sup>.



### 2.1 Objetivos Gerais

Caracterizar a coorte de pacientes com Doença de Gaucher do Rio Grande do Sul em relação à infiltração da medula óssea e ao uso da alfataliglicerase.

### 2.2 Objetivos Específicos

- a) Caracterizar, por meio do cálculo de escore validado (o BMB), o grau de infiltração da medula óssea dos pacientes;
  
- b) Avaliar, por meio do cálculo de escore validado (o BMB), a eficácia do tratamento específico da doença de Gaucher (terapia de reposição enzimática ou terapia de redução de síntese de substrato) em relação ao desfecho infiltração da medula óssea;
  
- c) Caracterizar genótipos associados à maior comprometimento ósseo;
  
- d) Avaliar a segurança e a efetividade da alfataliglicerase no tratamento de pacientes com doença de Gaucher.

***Bone Marrow Burden score is not useful as a follow-up parameter in stable patients with Gaucher disease after 5 years of treatment***

Livia d'Avila Paskulin<sup>1,2,\*</sup>, Débora Bertoldo<sup>3</sup>, Filippo Pinto e Vairo<sup>4,5</sup>, Leonardo Vedolin<sup>6</sup>, Ida Vanessa Doederlein Schwartz<sup>1,2,7</sup>

1. Postgraduate Programme in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.
2. Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.
3. DAPI Clinic, Curitiba, PR, Brazil.
4. Center for Individualized Medicine, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA.
5. Department of Clinical Genomics, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA.
6. Radiology Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.
7. Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

**\*Corresponding author:** [ldpaskulin@hcpa.edu.br](mailto:ldpaskulin@hcpa.edu.br)

**Journal to be submitted:** European Radiology

**Situation:** in preparation

## **ABSTRACT:**

Gaucher disease (GD) is one of the most prevalent lysosomal disorders, with an estimated incidence of 1 in 40,000 live births worldwide. Skeletal involvement is one of the main features that affects morbidity and long-term quality of life in patients with type 1 GD. The present study set out to characterize bone-marrow infiltration in patients with type 1 GD followed at the Gaucher Disease Referral Centre of Porto Alegre, Brazil, using the Bone Marrow Burden (BMB) score, and assess whether BMB correlates with any clinical or laboratory parameters. We also evaluated if BMB score is a suitable parameter for long-term follow-up of patients with type 1 GD. All included patients underwent magnetic resonance imaging for BMB score calculation at baseline, 1 year, and every other year thereafter or as clinically indicated (for example, in case of acute bone pain) from 2012 to 2018. BMB score tended to decrease only during the first 5 years of treatment, at a rate of  $-1.08$  points per year; after the 5-year mark, BMB tended to remain stable. We believe that, once the 5-year point of treatment has passed, MRI for BMB calculation should only be performed in non-adherent patients or in those who develop symptoms of acute skeletal disease.

**Key Words:** Gaucher disease, bone marrow burden, MRI, enzyme replacement therapy

## INTRODUCTION:

Gaucher disease (GD) is one of the most prevalent lysosomal disorders, with an estimated incidence of 1 in 40,000 live births worldwide<sup>1</sup>. This disorder is caused by deficient activity of the enzyme lysosomal beta glucocerebrosidase, which culminates in accumulation of glucosylceramides within macrophage lysosomes in the spleen, bone marrow, and liver<sup>2</sup>. Phenotypically, GD can be classified into three different groups: type 1, or non-neuronopathic, is characterized by milder symptoms, with hepatosplenomegaly, cytopenias, and skeletal involvement; type 2, or acute neuronopathic, is characterized by severe visceral, haematological, and neurological symptoms, and is inexorably fatal in the first years of life despite current treatment; and type 3, or chronic neuronopathic, is characterized by moderate symptoms, with hepatosplenomegaly, skeletal disease, and neurological impairment<sup>3</sup>.

Bone pathophysiology in GD is due to infiltration of engorged histiocytes (Gaucher cells) in bone marrow<sup>4</sup>, and skeletal disease is one of the main features that affects morbidity and long-term quality of life in patients with type 1 GD<sup>5</sup>. For this reason, a suitable and reliable scoring method to evaluate bone marrow infiltration in GD has been pursued by physicians worldwide<sup>6,7</sup>.

Since 2004, the efficacy of specific treatment for GD<sup>8</sup> has been evaluated by specific targets, which include parameters for visceral, blood, and skeletal disease<sup>9</sup>. Different groups have described the efficacy of ERT based on those therapeutic goals<sup>10,11</sup>. Recently, the European Working Group on Gaucher Disease (EWGGD) redefined those goals, including quality of life, fatigue, and social participation, and classified them into short and long-term goals. Regarding skeletal involvement, EWGGD describes therapeutic goals only as they relate to cortical bone disease. According to the Working Group, decreased bone-marrow infiltration, as measured through a locally used scoring system, is a short-term goal<sup>12</sup>. However, the exact time frame for this goal to be attained is not described, nor is the score threshold for a satisfactory response to treatment.

Although several scoring systems to analyse bone marrow infiltration have been published<sup>6,13-17</sup>, the most widely used is the Bone Marrow Burden (BMB)

score, described by Maas et al (2003)<sup>18</sup>, because it is easily reproducible, is a semi-quantitative method, and evaluates both the lumbar spine and the femur—in GD, this is particularly important, because infiltration of the spinal bone marrow precedes infiltration in the femur<sup>18</sup>. The score is based on the distribution of lesions and signal intensity<sup>18</sup>. In 2015, Fedida et al<sup>19</sup> evaluated the BMB method in GD patients with long-term follow-up, and reported that the score decreased significantly during the first 5 years of treatment and then remained stable.

The aim of our study is to characterize bone-marrow infiltration in patients with type 1 GD followed at a single referral centre in Brazil, using the BMB score, and assess whether this score correlates with any clinical or laboratory parameters. We also evaluated whether the BMB score is a suitable parameter for long-term follow-up of patients with type 1 GD.

## **METHODS:**

This is an observational, prospective, longitudinal study with a convenience sampling strategy. Data collection took place from January 2012 to December 2018. The study protocol was approved by the ethics committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), and all patients provided written informed consent. Patients who had a biochemical and genetic diagnosis of type 1 GD and were followed at the Gaucher Disease Referral Centre at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil, were eligible for inclusion in the study. The exclusion criteria were non-adherence to treatment (for ERT, adherence was defined as having received at least 12 infusions per year; for substrate reduction therapy [SRT], patients had to report regular use of the prescribed dose of miglustat<sup>20</sup>) or not having completed at least two MRI protocols.

Thirty-four patients were eligible for the study. Nine patients had to be excluded for not having at least two BMB measurements recorded during the study period. The final study sample comprised 25 subjects (15 male) with type 1 GD, with a mean age of 42 years (range, 23 to 68 years) (Figure 1). All included patients had undergone MRI for BMB score calculation at baseline, at 1 year, and every other year thereafter or as clinically indicated (e.g., because of acute bone

pain) from 2012 to 2018. All patients received standard clinical management as established in the Brazilian clinical practice guideline for GD<sup>20</sup>, which included bone density evaluation every other year, abdominal ultrasonography once a year, measurement of chitotriosidase activity, complete blood counts, and a medical visit every three months.

All MR images were performed on a 1.5T (Phillips Achieva 1.5T). Sagittal T1 and T2 weighted-images of the lumbar spine and coronal T1 and T2 weighted-images of the femur were obtained on all patients. BMB was scored by two trained and experienced radiologists following the protocol established by Maas et al 2003<sup>18</sup>.

The following parameters were assessed retrospectively through review of patients' medical records: (1) Bone densitometry by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA)<sup>21</sup>, with patients classified as having normal bone density, osteopenia, osteoporosis, or low bone density for age and gender, in accordance with the International Society of Bone Densitometry 2015 guidelines<sup>22</sup>; (2) abdominal ultrasound (as this was performed at different facilities, we could not compare volumes, but only ascertain whether the patient had hepatosplenomegaly or splenectomy); (3) chitotriosidase activity, using the assay described by Hollak et al (1994)<sup>23</sup>. No patient was homozygous or carried the 24dup allele of *CHIT1* which causes chitotriosidase deficiency; (4) *GBA1* genotype, assessed by next-generation sequencing prior to study inclusion. Patients were classified as having the N370S (p.Asn409Ser), L444P (p.Leu483Pro), or another variant on each allele of the *GBA1* gene. Medical records were also reviewed for blood counts, birth date, age at diagnosis, age at treatment onset, and type and dosage of treatment.

To evaluate BMB scores throughout the follow-up period, we used a linear mixed model analysis of repeated measures, with the restricted maximum likelihood estimation method and type 3 tests of fixed effects. First, we performed the test for the entire study population. Then, to assess whether the duration of treatment affected BMB score progression, patients were divided into two groups: (1) short-term treatment, which comprised patients with the first and last BMB performed prior to 5 years (60 months) of treatment; and (2) long-term treatment,

which comprised patients with the first and last BMB performed after 5 years (60 months) of treatment. P-values below 0.05 were considered statistically significant. Confidence intervals were established at 95%.

To ascertain whether any correlation existed between the first BMB score of each patient and their contemporary clinical and laboratory data (age, age at diagnosis, age at the start of treatment, hepatic and spleen status, DXA, chitotriosidase, haemoglobin, platelets, ERT dosage, duration of treatment), the Spearman test was used for continuous variables and the Mann–Whitney *U* test for categorical variables; correlation with genotype was assessed through the Kruskal–Wallis test.

Two patients (one each from the short-term and long-term groups) who were not considered adherent to treatment during the study period were excluded from all statistical analyses. However, these patients were included in the descriptive analysis of the study population (Figure 1).

## RESULTS:

Table 1 summarizes the demographic and clinical findings from the whole sample. Comparison of the short-term vs. long-term groups was only statistically significant for “age at diagnosis” ( $p=0.0$ ,  $n=25$ ), “age at the start of treatment” ( $p=0.0$ ,  $n=25$ ), and “time under treatment until first BMB” ( $p=0.0$ ,  $n=25$ ).

Of the 25 patients, 22 were already on treatment when the study began; 21 on ERT, with a mean treatment duration of 109.1 months (SD = 77.3 months, range = 2–204 months), either with imiglucerase or taliglucerase alfa, and one on SRT with miglustat for 19 months (Table 1).

Thirteen patients (52%) were compound heterozygous for N370S and another non-L444P variant; six (28%) were compound heterozygous for N370S/L444P; two (8%) were homozygous for N370S; and three (12%) were heterozygous for mutations other than N370S or L444P. Fifteen patients (60%) had splenomegaly and five (20%) had hepatomegaly; four patients (16%) had previously undergone splenectomy.

First BMB score correlated positively with chitotriosidase activity ( $r_s$  0.66,  $p < 0.001$ ,  $n = 25$ ) and negatively with platelet count ( $r_s$  -0.61,  $p < 0.005$ ,  $n = 25$ ) and ERT dosage ( $r_s$  -0.69,  $p < 0.001$ ,  $n = 25$ ). No statistically significant correlations were found between first BMB and the other clinical and laboratory variables.

Figure 2 shows the progression of BMB score over time for our cohort. There was no clear downward trend for the score in the study population as a whole (Table 2). When analysing the short- and long-term treatment groups separately, we were able to establish a trend of decreasing BMB in the short-term group and a trend of increasing BMB in the long-term group (Table 2). Only three patients, all from the short-term group, experienced improvement of BMB scores during the study period (Table 3).

Regarding type of treatment and progression of the BMB score, we found that patients on SRT (patients 2, 21, and 22) did not improve their BMB score during treatment. Two had a stable BMB score: patient 2 (32 months on miglustat 300 mg daily, total BMB score = 9), and patient 21 (38 months on miglustat 300 mg daily, total BMB score = 14). Patient 22 exhibited a 1-point reduction in lumbar-spine BMB score (from 14 to 13) after 12 months of miglustat 300 mg daily; however, centre staff decided to switch treatment to ERT since neither haematological nor visceral parameters improved during SRT therapy. After 19 months on ERT (imiglucerase 30 IU/kg biweekly), the total BMB score had decreased an additional 9 points (from 13 to 4).

Three patients had an increase in BMB score during ERT. Two were not adherent to treatment: patient 1, after 241 months of irregular ERT (imiglucerase, mean dosage 30 IU/kg biweekly), had a 1-point increase in the femoral score (total BMB score from 10 to 11); patient 3, after 50 months of irregular ERT (imiglucerase, mean dosage 30 IU/kg biweekly) had a 4-point increase in femoral score (total BMB score from 0 to 4). The third patient whose BMB score worsened during ERT, patient 24, was a 52-year-old splenectomised woman with a history of osteonecrosis on the right proximal femur and right proximal humerus. After 192 months on ERT (taliglucerase alfa, mean dosage 30 IU/kg biweekly), she reported acute bone pain in the left proximal femur. MRI showed osteonecrosis, increasing



her total BMB score by 3 points (from 3 to 6). Taliglucerase was then increased to 45 IU/kg biweekly.

The progression of BMB over time correlated positively with chitotriosidase levels (fixed effect = 635.34,  $p = 0.00$ ) and negatively with platelets and ERT dosage (fixed effect =  $-11,273$ ,  $p = 0.00$ ;  $-1.25$ ,  $p = 0.00$ , respectively). No correlation was established between change in BMB over time and any of the other parameters of interest.

## **DISCUSSION:**

The most accurate imaging method to measure the infiltration of Gaucher cells in the bone marrow reported so far is Dixon's quantitative chemical shift imaging (QCSI) of the lumbar spine<sup>24,25 6,18</sup>; however, this approach is not widely available, so its reproducibility worldwide is quite poor. To overcome this challenge, in 2003, Maas et al published an easily reproducible method that strongly correlates with QCSI, the BMB score<sup>18</sup>. This MRI-based semi-quantitative method also has superiority over QCSI since it evaluates both the femur and the lumbar spine, while QCSI only measures the fat fraction of the lumbar spine<sup>18</sup>.

Since 2003, BMB has been widely used as an imaging biomarker of bone involvement in Gaucher disease, as well as a tool for therapeutic goal management<sup>6,11,12,19,26</sup>. In 2014, Elstein et al<sup>11</sup> reported BMB reductions during the first 7 years of treatment; unfortunately, they included only 12 patients, did not have a very long-term follow-up (beyond 7 years), and did not calculate an estimated rate of decrease in BMB. In 2015, Fedida et al<sup>19</sup> evaluated 40 French patients, nine of whom were treatment-naïve at first BMB. The authors reported that BMB decreased only during the first 5 years of treatment, plateauing thereafter. Our data are consistent with this finding, and we were able to demonstrate a stronger statistical correlation of a decreasing trend of BMB during the first 5 years of treatment: our patients had a decrease of 0.09 points per month (1.08 points per year) in total BMB score during the first 5 years of treatment, with a 5.4-point reduction over this period as a whole—nearly three times greater than the reduction reported by Fedida et al in 2015. Moreover, the only patients whose

BMB decreased in the French cohort were those naïve to treatment; none of the treated patients who had already received at least 1 year of treatment at first BMB improved their score in subsequent measurements<sup>19</sup>. Our study corroborates this finding as well; all patients in our cohort whose BMB score decreased were those whose first MRI was performed at or before the first month of treatment.

In 2006, de Fost et al<sup>26</sup> stated that higher doses of ERT should have a higher impact on BMB reduction, although this did not reflect on acute clinical complications such as bone pain, bone infarctions, or pathological fractures. In our study, BMB score correlated negatively with enzyme dosage, agreeing with de Fost et al (2006), in that higher dosages of ERT correlated with a more significant decrease in BMB. Therefore, we may hypothesise that, if our patients had received higher doses of recombinant enzyme, more patients might have experienced a reduction in BMB. This is the first prospective study to correlate BMB score with ERT dosage; there were no correlations of BMB trend and enzyme dosage in Fedida et al<sup>19</sup> or Elstein et al<sup>11</sup>.

We were unable to conclude whether ERT was more efficient than SRT because of the small number of patients on miglustat. Nonetheless, we must highlight that none of the patients who were on SRT experienced any significant reduction in BMB during the first 24 months of treatment. This is consistent with the findings of Pastores et al (2005)<sup>27</sup>, who followed 10 patients on miglustat for 24 months and observed no changes in BMB score after treatment.

Chitotriosidase activity correlated positively with BMB throughout the study period. This is consistent with previous reports of chitotriosidase activity as a marker of GD severity and activity<sup>28,29</sup>. Platelet count correlated negatively with BMB score throughout the treatment period. Unfortunately, due to the small number of patients enrolled in the study, we could not establish correlations of BMB with haemoglobin level, organ volumes, bone density, or bone pain. We can, however, extrapolate the association between platelet count and BMB to the other clinical and biochemical parameters of interest, since all biomarkers of GD (in bone, blood, and viscera) tend to follow a similar trend (i.e., improvement during the first years of treatment, plateauing thereafter).

### **CONCLUSION:**

BMB score tends to decrease with ERT during the first 5 years of treatment. After this period, BMB tends to be stable in treatment-adherent patients. Based on our experience, we believe that MRI for BMB measurement should only be performed after 5 years of regular treatment in non-adherent patients or in patients who present with acute skeletal symptoms.

### **ACKNOWLEDGEMENTS:**

The authors thank the staff at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, particularly at the Medical Genetics Service. Financial support for this study was provided by CAPES, FIPE-HCPA, and by unrestricted grants from Sanofi-Genzyme.

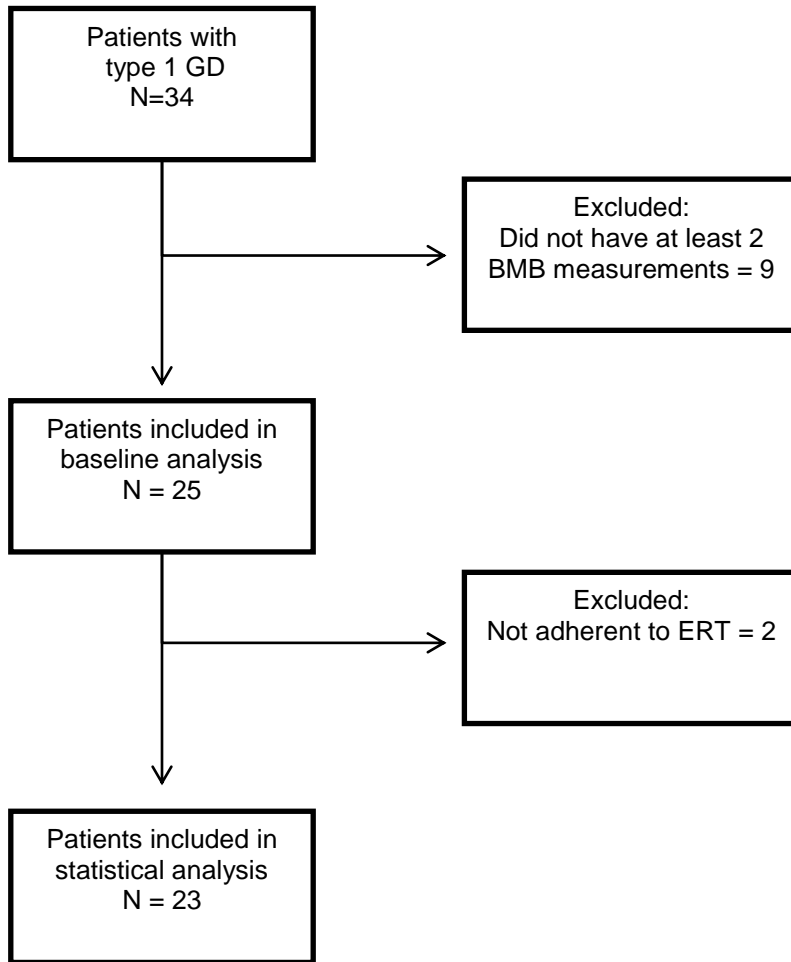
## REFERENCES:

1. Grabowski, G. A. Phenotype, diagnosis, and treatment of Gaucher's disease. *Lancet* 372, 1263–1271 (2008).
2. Stirnemann, J. Ô. *et al.* A review of Gaucher disease pathophysiology, clinical presentation and treatments. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 1–30 (2017).
3. Sidransky, E. Gaucher disease: complexity in a 'simple' disorder. *Mol. Genet. Metab.* 92, 14–15 (2007).
4. Stowens, D. W., Teitelbaum, S. L., Kahn, A. J. & Barranger, J. A. Skeletal complications of Gaucher disease. *Med.* 64, 310–322 (1985).
5. Masek, B. J., Sims, K. & Bove, C. Quality of life assessment in adults with type 1 Gaucher disease. *Qual. Life Res.* 8, 263–268 (1999).
6. Dahl, S. vom *et al.* Evidence-based recommendations for monitoring bone disease and the response to enzyme replacement therapy in Gaucher patients. *Curr. Med. Res. Opin.* 22, 1045–1064 (2006).
7. Hughes, D. *et al.* Gaucher Disease in Bone: From Pathophysiology to Practice. *J. Bone Miner. Res.* 00, 1–18 (2019).
8. Revel-Vilk, S., Szer, J., Mehta, A. & Zimran, A. How we manage Gaucher Disease in the era of choices. *Br. J. Haematol.* 182, 467–480 (2018).
9. Pastores, G. M. *et al.* Therapeutic goals in the treatment of gaucher Disease. *Semin. Hematol.* 41, 4–14 (2004).
10. Zimran, A. *et al.* Phase1/2 and extension study of velaglycerase alfa replacement therapy in adults with type 1 Gaucher disease: 48-month experience. *Blood* 115, 4651–4656 (2010).
11. Elstein, D., Haims, A. H., Zahrieh, D., Cohn, G. M. & Zimran, A. Impact of velaglycerase alfa on bone marrow burden score in adult patients with type 1 Gaucher disease: 7-Year follow-up. *Blood Cells, Mol. Dis.* 53, 56–60 (2014).
12. Biegstraaten, M. *et al.* Management goals for type 1 Gaucher disease: An expert consensus document from the European working group on Gaucher disease. *Blood Cells, Mol. Dis.* 68, 203–208 (2018).
13. Rosenthal, D. I. *et al.* Evaluation of Gaucher disease using magnetic resonance imaging. *J. Bone Jt. Surg. - Ser. A* 68, 802–808 (1986).

14. Poll, L. W. *et al.* Magnetic resonance imaging of bone marrow changes in Gaucher disease during enzyme replacement therapy: First German long-term results. *Skeletal Radiol.* 30, 496–503 (2001).
15. Terk, M. R., Dardashti, S. & Liebman, H. A. Bone marrow response in treated patients with Gaucher disease: Evaluation by T1-weighted magnetic resonance images and correlation with reduction in liver and spleen volume. *Skeletal Radiol.* 29, 563–571 (2000).
16. Miller, S. P. F., Zirzow, G. C., Doppelt, S. H., Brady, R. O. & Barton, N. W. Analysis of the lipids of normal and Gaucher bone marrow. *J. Lab. Clin. Med.* 127, 353–358 (1996).
17. Vlieger, E. J. P., Maas, M., Akkerman, E. M., Hollak, C. E. M. & Den Heeten, G. J. Vertebra disc ratio as a parameter for bone marrow involvement and its application in Gaucher disease. *J. Comput. Assist. Tomogr.* 26, 843–848 (2002).
18. Maas, M. *et al.* Quantification of Bone Involvement in Gaucher Disease: MR Imaging Bone Marrow Burden Score as an Alternative to Dixon Quantitative Chemical Shift MR Imaging - Initial Experience. *Radiology* 229, 554–561 (2003).
19. Fedida, B. *et al.* Bone marrow involvement in Gaucher disease at MRI : what long-term evolution can we expect under enzyme replacement therapy? *Eur. Radiol.* 25, 2969–2975 (2015).
20. Picon, P. D., Gadelha, M. I. P. & Alexandre, R. F. Doença de Gaucher. *Protoc. clínicos e diretrizes Ter. Secr. Atenção à Saúde - Brasília Ministério da Saúde* 2, 159–194 (2014).
21. SM, A., T, B. & AB, S. Usefulness of bone mineral density measurement in menopausal woman: A study of 217 post menopausal women. *Bangladesh Med. Res. Counc. Bull.* 30, 25–30 (2004).
22. International Society of Bone Densitometry: 2015 ISCD Official Positions – Adult. Available at: <https://www.iscd.org/official-positions/2015-iscd-official-positions-adult/>.
23. van Dussen, L., Akkerman, E. M., Hollak, C. E. M., Nederveen, A. J. & Maas,

- M. Evaluation of an imaging biomarker, Dixon quantitative chemical shift imaging, in Gaucher disease: lessons learned. *J. Inherit. Metab. Dis.* 37, 1003–1011 (2014).
24. Dixon, T. W. Dixon simple proton spectroscopic imaging. *Radiology* 153, 189–194 (1984).
  25. Maas, M., Dijkstra, P. F. & Akkerman, E. M. Uniform Fat Suppression in Hands and Feet through the Use of Two-Point Dixon Chemical Shift MR Imaging. *Radiology* 210, 189–193 (1999).
  26. De Fost, M. *et al.* Superior effects of high-dose enzyme replacement therapy in type 1 Gaucher disease on bone marrow involvement and chitotriosidase levels: A 2-center retrospective analysis. *Blood* 108, 830–835 (2006).
  27. Pastores, G. M., Barnett, N. & Kolodny, E. An Open-Label, Noncomparative Study of Miglustat in Type 1 Gaucher Disease: Efficacy and Tolerability Over 24 Months of Treatment. *Clin. Ther.* 27, 1215–1227 (2005).
  28. van Dussen, L. *et al.* Value of plasma chitotriosidase to assess non-neuronopathic Gaucher disease severity and progression in the era of enzyme replacement therapy. *J. Inherit. Metab. Dis.* 37, 991–1001 (2014).
  29. Smid, B. E. *et al.* Biochemical response to substrate reduction therapy versus enzyme replacement therapy in Gaucher disease type 1 patients. *Orphanet J. Rare Dis.* 11, 1–12 (2016).

## Tables and Figures:



**Figure 1.** Flow diagram of patient enrolment.

**Table 1.** Demographic information, first and last BMB score, haemoglobin, and platelet count of each patient.

ID	Genotype	Age at baseline (years)	Age at diagnosis (years)	Age at start of treatment (years)	Splenectomy	No. MRIs done	First BMB score	Treatment duration at 1 <sup>st</sup> BMB (months)	Last BMB score	Treatment duration at last BMB	Hb at 1 <sup>st</sup> BMB (g/dL)	Hb at last BMB (g/dL)	Platelets at 1 <sup>st</sup> BMB (x10 <sup>3</sup> /μL)	Platelets at last BMB (x10 <sup>3</sup> /μL)	Treatment	Mean dosage (IU/kg/inf for ERT and mg/day for SRT)
1	N370S/ IVS9+1G>A	28	10	11	No	4	10	204	11	257	14.9	15.4	96	140	Imi	60
2	N370S/ L444R	68	59	60	Yes	2	9	19	9	32	12.7	12.4	251	224	Mig	300
3	N370S/ RecNciI	24	7	8	No	3	0	7	4	50	13.1	35.0	327	215	Imi	20
4	N370S/ L444P	58	50	50	No	3	11	0	10	24	14.7	16.0	93	136	Imi	30
5	N370S/ RecNciI	64	57	57	No	3	12	1	4	44	14.2	15.6	86	134	Imi	15
6	N370S/ RecNciI	46	22	29	No	2	8	132	8	144	15.2	14.5	27	52	Tali	15
7	N370S/ L444P+A456P	29	7	7	No	2	11	180	11	204	14.5	13.5	171	146	Imi	15
8	N370S/ RecNciI	32	14	15	No	2	2	132	2	156	14.3	15.7	191	190	Tali	30
9	N370S/ L444P	27	15	16	No	2	3	48	3	60	13.1	12.8	148	163	Imi	30
10	N370S/ L444P	43	26	27	Yes	2	6	84	6	108	13.8	13.6	314	322	Imi	20
11	N370S/ RecNciI	64	49	52	Yes	2	3	60	3	72	15.3	13.9	220	227	Imi	15
12	N370S/ L444P	46	37	39	No	2	5	2	5	14	14.1	14.1	161	212	Imi	15
13	N370S/ RecNciI	54	44	46	No	3	8	24	8	60	15.0	14.9	99	114	Imi	20
14	N370S/ L444P	34	11	11	No	2	9	204	9	216	12.5	13.1	137	176	Imi	15
15	N370S/ L461P + IVS10+1G>T	30	4	5	No	3	9	204	9	240	12.1	12.6	63	80	Imi	45
16	N370S/ G202R	23	8	8	No	3	3	120	3	144	13.4	16.0	166	155	Imi	20
17	*	25	2	3	No	2	13	192	13	216	14.0	14.3	94	129	Imi	20
18	N370S/ R120W	28	10	10	No	3	8	132	8	156	15.3	14.6	111	119	Imi	20
19	N370S/ L444P	39	27	31	No	3	12	12	12	48	15.0	14.9	77	112	Tali	30
20	N370S/ L444P	41	29	30	No	2	6	48	6	72	13.1	12.7	139	153	Tali	15
21	E349K/ S366N	53	45	50	No	4	14	0	14	38	12.0	12.1	147	222	Mig	300
22	E349K/ S366N	50	42	43	No	3	14	0	3	31	14.6	15.6	113	297	Imi	30**
23	N370S/ N370S	65	54	55	No	3	6	22	6	65	13.0	14.7	140	125	Tali	15
24	N370S/ RecNciI	52	34	34	Yes	4	3	120	6	192	14.1	13.9	303	304	Tali	30
25	N370S/ L444R	29	5	5	No	2	9	216	9	228	13.1	13.9	125	151	Imi	20
<b>Mean ± SD</b>	-	42.1± 14.6	26.72± 18.9	28.1± 19.4	No	2.6 ± 0.7	7.7 ± 3.9	109.1 ± 77.3	6.84± 3.4	114.8 ± 79.7	13.8 ± 1.0	15.0 ± 4.3	151.9 ± 78.3	171.9 ± 67.7	-	21.8 ± 11.1
<b>Short-term ± SD</b>	-	50.2 ± 14.3	39.6 ± 16	41.3± 15.9	No	2.69 ± 0.6	7.9 ± 4.5	18.7 ± 20.9	3.5 ± 3.6	24.4 ± 18.5	7.2 ± 1.1	8.2 ± 5.9	80.0 ± 72.6	93.4 ± 56.9	-	9.4 ± 7.1
<b>Long-term ± SD</b>	-	33.2 ± 8.9	12.8 ± 9.7	13.8 ± 10.4	No	2.6 ± 0.8	7.6 ± 3.4	160 ± 44.4	3.4 ± 3.2	90.4 ± 45.9	6.7 ± 1.0	6.8 ± 1.0	71.9 ± 87.3	78.6 ± 79.4	-	12.4 ± 13.8

\*: variants not found after sequencing and CNV analysis

\*\*: previously treated with miglustat 300 mg daily for 12 months

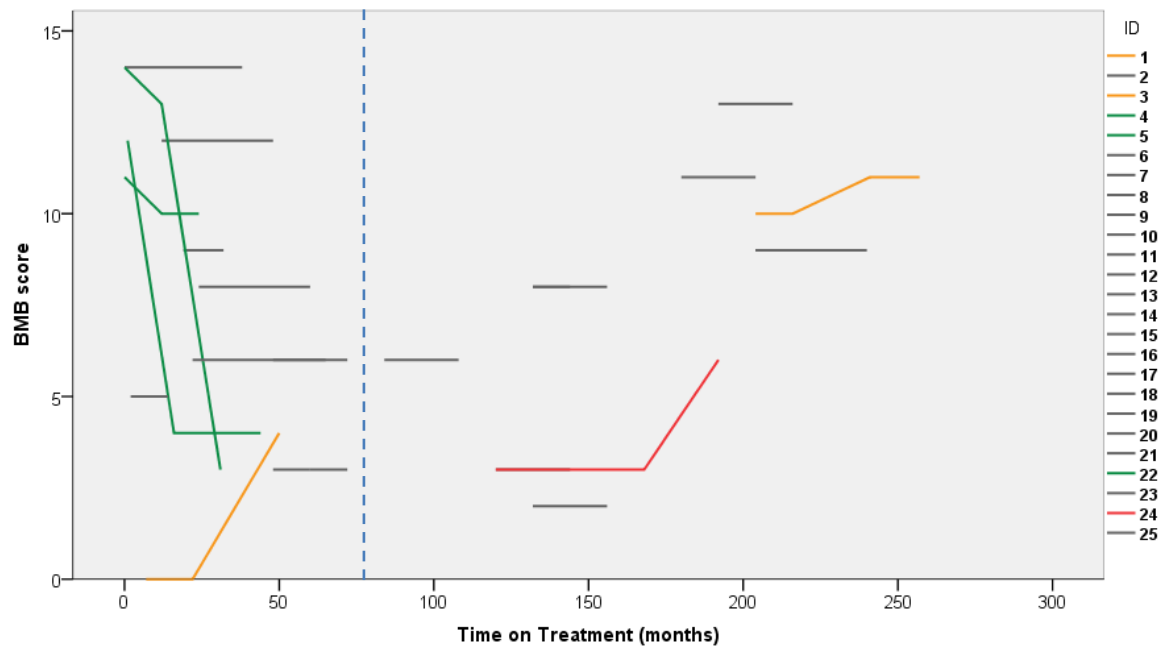
Imi: ERT with imiglucerase; Tali: ERT with taliglucerase; Mig: SRT with miglustat



**Table 2.** Linear mixed model of the trend of BMB score over time on enzyme replacement therapy.

Parameter	Number of patients	Number of MRIs	Estimate		SE		p-value	
			Intercept	Fixed effect	Intercept	Fixed effect	Intercept	Fixed effect
All patients	23	59	7.58	-0.009	1.12	0.01	0.000	0.385
Short-term	12	27	10.66	-0.090	1.18	0.02	0.000	0.004
Long-term	11	32	3.42	0.023	1.16	0.01	0.006	0.001

MRI, magnetic resonance imaging; SE, standard error; Intercept = central tendency of BMB score at baseline; Fixed effect = reduction (or increase) in BMB score, points per month



**Figure 2.** BMB score progression over time. Each line represents a different patient. The dashed blue line divides the short and long-term groups. Note that patients 1 and 3 (in orange) were not included in the statistical analysis due to non-adherence to treatment. Patients 4, 5, and 22 (in green) experienced reductions in BMB during the study. Patient 24 (in red) is the only adherent patient whose BMB increased during the study.

**Table 3.** Clinical characterisation of the patients whose BMB score improved

<b>Patient ID number</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>22</b>
<b>Age at diagnosis (years)</b>	50	57	42
<b>1<sup>st</sup> BMB</b>			
Total BMB score	11	12	14
Time on treatment (months)	0	1	0
Type of treatment (dosage)	—	ERT (15IU/kg)	—
Severity Score Index (SSI)	4	7	5
Platelets (x10 <sup>3</sup> /μL)	93	86	113
Haemoglobin (g/dL)	14.7	14.2	14.6
Chitotriosidase activity (nmol/h/mL)	18,545	6,996	17,688
BMD (normal, osteopenia, osteoporosis)	Normal	Normal	Normal
<b>2<sup>nd</sup> BMB</b>			
Total BMB score	10	4	13
Time on treatment (months)	12	16	12
Type of treatment (dosage)	Imi (15IU/kg)	Imi (15IU/kg)	Mig (300mg/day)
Severity Score Index (SSI)	4	6	4
Platelets (x10 <sup>3</sup> /μL)	152	149	172
Haemoglobin (g/dL)	15.8	15.1	14
Chitotriosidase activity (nmol/h/mL)	5,212	1,004	8,591
BMD (normal, osteopenia, osteoporosis)	Normal	Osteopenia	Normal
<b>3<sup>rd</sup> BMB</b>			
Total BMB score	10	4	3
Time on treatment (months)	24	44	31
Type of treatment (dosage)	Imi (15IU/kg)	Imi (20IU/kg)	Imi (15IU/kg)
Severity Score Index (SSI)	2	4	4
Platelets (x10 <sup>3</sup> /μL)	136	134	297
Haemoglobin (g/dL)	16	15.6	15.6
Chitotriosidase activity (nmol/h/mL)	3,602	794	2,339
BMD (normal, osteopenia, osteoporosis)	Normal	Osteopenia	Normal

Imi: ERT with imiglucerase

Mig: SRT with miglustat

### ***A rare GBA1 genotype associated with severe bone involvement in Gaucher disease type 1***

Livia d'Avila Paskulin<sup>1,2,\*</sup>, Rodrigo Tzovenos Starosta<sup>1</sup>, Vitória Schütt Zizemer<sup>3</sup>, Suélen Basgalupp<sup>4</sup>, Débora Bertoldo<sup>5</sup>, Filippo Pinto e Vairo<sup>6,7</sup>, Marina Siebert<sup>8,9</sup>, Kristiane Michelin-Tirelli<sup>2</sup>, Ida Vanessa Doederlein Schwartz<sup>1,2, 3,9</sup>

1. Postgraduate Programme in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.
2. Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.
3. Postgraduate Programme in Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.
4. Hospital Moinhos de Vento, Porto Alegre, RS, Brazil.
5. DAPI Clinic, Curitiba, PR, Brazil.
6. Center for Individualized Medicine, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA.
7. Department of Clinical Genomics, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA.
8. Molecular and Protein Analyses Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.
9. BRAIN Laboratory, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

**\*Corresponding Author:** [ldpaskulin@hcpa.edu.br](mailto:ldpaskulin@hcpa.edu.br)

**Journal to be submitted:** Molecular Genetics and Metabolism Reports

**Situation:** in preparation

## ABSTRACT

**Introduction:** Gaucher disease (GD) type 1 is a lysosomal disease characterised by hepatosplenomegaly, anaemia, thrombocytopenia, bone changes, and bone marrow infiltration. It is caused by biallelic pathogenic variants in the *GBA1* gene, which codes for glucocerebrosidase, an enzyme involved in the catabolic pathway of complex lipids. **Aims:** To describe a sibling pair with GD type 1 and a genotype never before reported in the literature. **Case Report:** Patient 1 is a 47-year-old female, diagnosed at 42 years of age, with chronic lumbar pain, mild splenomegaly, slight thrombocytopenia, normal haemoglobin, severe bone marrow burden (BMB) score, high chitotriosidase activity, and low glucocerebrosidase. Patient 2, the sister of patient 1, is a 50-year-old female who was diagnosed after familial screening. At 45 years of age, she had osteonecrosis of the left femur and underwent total hysterectomy for uncontrollable bleeding. At first evaluation, she had bone pain with a high BMB score, mild splenomegaly, normal haemoglobin, normal platelet count, elevated chitotriosidase activity, and low glucocerebrosidase activity. Both patients were found to be compound heterozygotes for p.Glu388Lys and p.Ser366Asn variants in *GBA1*. **Conclusions:** This is the first report of GD with this combination of *GBA1* variants, which causes a phenotype remarkable for severe bone involvement with absent or mild haematological manifestations.

**Keywords:** Gaucher disease, *GBA1*, bone disease, genotype, phenotype

## INTRODUCTION

Gaucher disease (GD) is one of the most common lysosomal disorders, with an overall frequency of 1 in 40,000 live births worldwide<sup>1</sup>; it is caused by deficient activity of lysosomal glucocerebrosidase (acid beta-glucosidase), the enzyme encoded by the *GBA1* gene, which leads to a build-up of glucocerebroside in macrophages (thereby known as “Gaucher cells”). This, in turn, causes macrophage malfunction and shifts their activation profile<sup>2</sup>, ultimately leading to a systemic inflammatory response<sup>3</sup> and symptoms such as hepatosplenomegaly, thrombocytopenia, osteonecrosis, and, in some patients, neurological deficits. GD is categorised into three types according to the extent of neurological involvement: GD type 1 is characterised by no overt neurological symptoms; GD type 2 (acute neuronopathic), by an acute and fatal neurological compromise at early age; and GD type 3 (chronic neuronopathic), by neurological compromise with onset in late childhood or adulthood. The first specific treatment for GD was enzyme replacement therapy (ERT), with biweekly infusions of imiglucerase, velaglucerase alfa, or taliglucerase alfa. ERT offers significant improvement of all clinical parameters, except established neurological impairment. Substrate reduction therapy (SRT) with daily miglustat, an orally available drug, is also associated with improvement, although not to the extent seen with ERT. Eliglustat, a newer SRT agent, is now being used as first-line therapy for GD<sup>4,5</sup>. GD presents with a broad range of phenotypes, partly explained by the many different *GBA1* genotypes. This article describes two sisters with a heretofore unreported GD genotype associated with severe bone involvement and absent or mild haematological manifestations.

## CASE REPORT

Patient 1 is a 47-year-old female diagnosed with GD type 1 at age 42. She was born to a non-consanguineous couple and has 4 siblings, of whom 3 were healthy and screened negative for GD (normal glucocerebrosidase activity). One sister, described below as patient 2, was symptomatic (Figure 1). There was no family history of parkinsonism or other neurologic symptoms.

Patient 1 was referred to the GD Centre at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brazil, because of hyperferritinaemia (ferritin = 588 ng/mL) resistant to phlebotomy, chronic low back pain (visual analogue scale = 8), and recurrent episodes of epistaxis. Laboratory testing at admission showed a haemoglobin level of 13 g/dL, leucocyte count of 2,320 cells/mm<sup>3</sup>, platelet count of 143,000/mm<sup>3</sup>, and extremely high chitotriosidase activity (9,609 nmol/h/mL; reference range = 8.8–132 nmol/h/mL). Abdominal ultrasonography revealed normal liver and spleen volumes. Bone metabolism markers (parathyroid hormone, alkaline phosphatase, calcium, phosphate, vitamin D) and bone mineral density (BMD) z scores were normal; however, her bone marrow burden (BMB) score was 14, consistent with severe disease (Figure 2)<sup>6</sup>. Glucocerebrosidase activity was 5 nmol/h/mg protein in leucocytes (reference range = 10–45 nmol/h/mg protein) and 132 nmol/h/mg protein in fibroblasts (reference range = 257–688 nmol/h/mg protein), confirming the diagnosis of GD type 1. At diagnosis, her Disease Severity Scoring System<sup>7</sup> (DS3) was 2.7 of 19, and the Severity Score Index<sup>8</sup> (SSI) was 5 of 48. SRT was begun with miglustat 300 mg/day, and a low-carbohydrate diet was prescribed. Shortly thereafter, due to diarrhoea and an unintended weight loss of 6 kg (10% of total body weight), patient 1 was found to also have lactose intolerance (lactase non-persistence CC-genotype) and strongyloidiasis, treated with a lactose-free diet and albendazole respectively. Due to persistence of gastrointestinal symptoms and only slight clinical improvement on SRT (see Table 1), after 1 year, miglustat was switched to taliglucerase alfa 30 IU/kg/biweekly. Two months later, patient 1 developed an allergic reaction to a taliglucerase infusion and was thus switched to imiglucerase 30 IU/kg/biweekly. At the time of writing, this regimen continued uneventfully, with symptomatic improvement (Table 1).

Patient 2 is a 50-year-old female diagnosed with GD type 1 at age 45. Four years before her first appointment for genetic evaluation, patient 2 underwent prosthetic replacement of the left femoral-acetabular joint for osteonecrosis. One year later, she required an emergent total hysterectomy due to uncontrollable bleeding during uterine polyp removal surgery. Laboratory tests at admission to our

Centre revealed a haemoglobin of 11.5 g/dL, leucocyte count of 8,710 cells/mm<sup>3</sup>, platelets at 195,000/mm<sup>3</sup>, ferritin 880 ng/mL, and chitotriosidase activity of 2,970 nmol/h/mL. Abdominal ultrasonography revealed mild hepatosplenomegaly and hepatic steatosis. She had normal bone metabolism markers, normal BMD z scores, and a BMB score of 14 (Figure 3). Glucocerebrosidase activity of 2.8 nmol/h/mg protein in leucocytes and 60 nmol/h/mg protein in fibroblasts confirmed the diagnosis of GD. The severity scores were DS3 = 0 and SSI = 0. Because of needle phobia, she was started on SRT with miglustat 300 mg/day, as well as a low-carbohydrate diet.

After 3 years of unsatisfactory response to miglustat therapy (Table 1), patient 2 was switched to taliglucerase alfa 15 IU/kg/biweekly. After 2 years of ERT, her haematological parameters and chitotriosidase activity improved; however, ferritin remained stable and bone marrow infiltration remained severe.

Upon genotyping with next-generation sequencing, both patients were found to be heterozygotes for the c.1162G>A (p.Glu388Lys) (E349K) and c.1214G>A (p.Ser405Asn) (S366N) pathogenic variants of *GBA1*. Patients 1 and 2 were also heterozygous for *HFE1* pathogenic variant c.187C>G (p.His63Asp).

Parental DNA samples were not available for analysis. Both patients were also tested for the chitotriosidase null variant; neither had it, not even in heterozygosity.

## DISCUSSION

### Genotype

The patients described herein were compound heterozygotes for two uncommon *GBA1* pathogenic variants, E349K and S366N. The former has been previously described by Grabowski and colleagues in 2006<sup>9</sup>; however, no clinical phenotype description was provided, nor was it reported if the mutation was in homozygosity or compound heterozygosity with a different variant. S366N was described in compound heterozygosity with R48W (p.Arg87Trp) by Demina and Beutler in 1998<sup>10</sup> in an African-American woman with GD type I whose sister had



anaemia, mild thrombocytopenia, mild neutropenia, and moderate hepatosplenomegaly; unfortunately, no additional details on the patient's phenotype were provided. The E349K residue is on a coil motif at the eighth exon, in a region of neutral hydrophathy. This variant is predicted to cause an 88% reduction in normal enzyme activity<sup>11</sup>. The S366N variant lays on an alpha-helix at the 3' end of the eighth exon, also in a region of neutral hydrophathy, and impairs a phosphorylation site. Our patients exhibited enzyme activities higher than expected for patients with classical GD, contributing to the characterisation of these two variants.

Both E349K and S366N are considered likely pathogenic when applying the ACMG classification criteria<sup>12</sup>: they are absent from GnomAD (PM2), were previously detected in trans with a pathogenic variant (PM3), are missense variants in a gene that has a low rate of benign missense variation and in which missense variants are a common mechanism of GD (PP2), have 6 pathogenic predictions each (from DANN, GERP, FATHMM, LRT, MutationTaster and FATHMM-MKL for the E349K variant; from DANN, GERP, FATHMM, LRT, FATHMM-MKL and SIFT for the S366N variant) (PP3), the patients' phenotypes and family history were highly specific for GD (PP4), and UniProt classifies both variants as 'disease' (PP5).

## Phenotype

Much is being studied about secondary modifier genes in Mendelian disorders, including GD<sup>13-15</sup>; however, there is still little known about the strength of the genotype-phenotype correlation in GD. In the cases presented herein, both patients harboured the same *GBA1* variants, and although their phenotypes were quite similar overall, there were some notable differences: while the bone phenotype of patient 2 may be considered somewhat more severe, the chitotriosidase activity of patient 1 – a biomarker of GD activity – was more than three times higher at admission than that of patient 2. Liver and metabolic profiles, on the other hand, were quite similar. This may be explained by the action of an

unidentified modifier gene harboured by only one of the patients, or it may be due to environmental factors.

Osteonecrosis is a common manifestation of GD, experienced by up to one-third of patients<sup>16,17</sup>. The most common site affected is the femoral head<sup>18</sup>, as was the case in patient 2. In a study of potential risk factors for osteonecrosis conducted by the International Collaborative Gaucher Group (ICGG)<sup>16</sup>, the only factors identified were anaemia and splenectomy. As both patients in our report had the same *GBA1* genotype and neither had undergone splenectomy, we cannot but wonder whether patient 2 being anaemic at admission was related to her history of osteonecrosis, while her sister, who was not anaemic, did not experience this manifestation.

Another common hallmark of GD is bone marrow infiltration, which can be assessed with the MRI-based BMB score, a semi-quantitative method that relies on signal intensity as a measure of fat substitution by Gaucher cells in the bone marrow<sup>6</sup>. Both patients had the same severe BMB score, which may imply a more severe bone phenotype caused by the unusual combination of the E349K/S366N *GBA1* variants.

At admission, neither patient was profoundly thrombocytopenic nor anaemic. There was no overt hepatosplenomegaly, although patient 2 had mild hepatosplenomegaly and mild hepatic steatosis. Overall, both patients could be described as having predominantly severe bone disease and few, mild visceral and haematological manifestations. Whether this is due to environmental factors or indeed to the patients' rare genotype is still unclear; more reports of patients with the same *GBA1* genotype are needed before any conclusion may be drawn with confidence. Both sisters had an unsatisfactory response to substrate reduction therapy with miglustat, whereas response to enzyme replacement therapy was satisfactory regarding improvement of haematological and visceral parameters; both patients reached the targets recommended in the Brazilian Guideline<sup>19</sup> and by the 2018 European Working Group on Gaucher Disease expert consensus<sup>20</sup>. Regarding bone disease, patient 1 had a satisfactory response, with improvement of bone pain (no longer requiring daily analgesics) and a reduction in BMB score

during the first 2 years of treatment<sup>6,21</sup>. On the other hand, patient 2 had no bone pain before starting treatment and remained asymptomatic. However, her BMB score was unchanged after 2 years of treatment.

In 2019, Mehta *et al* reported on the presenting signs and patient co-variables in GD<sup>22</sup> and highlighted that physicians can fail to recognise the early stages of GD, which can lead to significant diagnostic delays and sometimes irreversible but avoidable morbidity. In patients with the classic GD phenotype of massive splenomegaly, bone pain, and cytopaenias, the diagnosis is readily established. On the other hand, in patients with mild symptoms – or, as in the patients described herein, involvement confined to bone – diagnosis is less intuitive, requiring heightened suspicion on the part of the clinician.

## CONCLUSIONS

This is the first GD family described with the E349K/S366N *GBA1* genotype, which was associated with severe bone disease and mild visceral and haematological manifestations. Additional genotype-phenotype studies are needed to fully establish a causal relationship between this rare genotype and the patients' unique phenotype.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the staff at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), particularly the Medical Genetics Service, for their assistance. Dr. Jorge Luiz dos Santos (Laboratory of Experimental Gastroenterology and Hepatology, HCPA) performed molecular analysis of lactase-phlorizin hydrolase in patient 1. Financial support for this study was provided by CNPq, CAPES, and FIPE-HCPA.

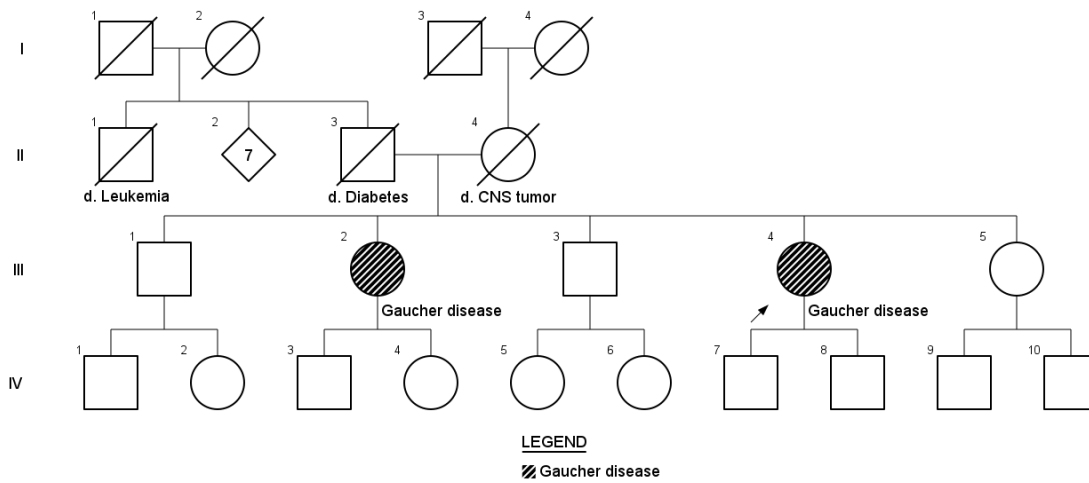
**COMPETING INTEREST STATEMENT:** The authors declare no conflict of interest.

## REFERENCES

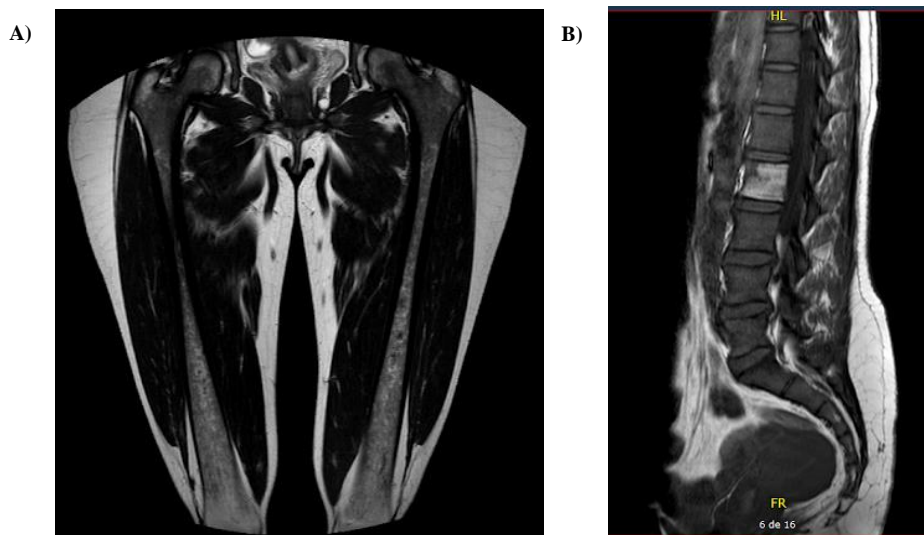
1. Grabowski, G. A. Phenotype, diagnosis, and treatment of Gaucher's disease. *Lancet* 372, 1263–1271 (2008).
2. Boven, L. A. *et al.* Gaucher cells demonstrate a distinct macrophage phenotype and resemble alternatively activated macrophages. *Am. J. Clin. Pathol.* 122, 359–369 (2004).
3. Koppe, T. *et al.* The prognostic value of the serum ferritin in a southern Brazilian cohort of patients with Gaucher disease. *Genet. Mol. Biol.* 39, 30–34 (2016).
4. Revel-Vilk, S., Szer, J., Mehta, A. & Zimran, A. How we manage Gaucher Disease in the era of choices. *Br. J. Haematol.* 182, 467–480 (2018).
5. Poole, R. M. Eliglustat: First global approval. *Drugs* 74, 1829–1836 (2014).
6. Maas, M. *et al.* Quantification of Bone Involvement in Gaucher Disease: MR Imaging Bone Marrow Burden Score as an Alternative to Dixon Quantitative Chemical Shift MR Imaging—Initial Experience. *Radiology* 229, 554–561 (2003).
7. Weinreb, N. J. *et al.* A validated disease severity scoring system for adults with type 1 Gaucher disease. *Genet. Med.* 12, 44–51 (2010).
8. Zimran, A. *et al.* Gaucher disease. Clinical, laboratory, radiologic, and genetic features of 53 patients. *Med.* 71, 337–353 (1992).
9. Liou, B. *et al.* Analyses of variant acid  $\beta$ -glucosidases: Effects of Gaucher disease mutations. *J. Biol. Chem.* 281, 4242–4253 (2006).
10. A, D. & Beutler, E. Six New Gaucher Disease Mutations. *Acta Haematol.* 99, 80–82 (1998).
11. Berman, H. M. *et al.* The protein data bank. *Nucleic Acids Res.* 58, 235–242 (2000).
12. Richards, S. *et al.* Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology Sue. *Genet. Med.* 17, 405–424 (2015).
13. Klein, A. D. *et al.* Identification of Modifier Genes in a Mouse Model of

- Gaucher Disease. *Cell Rep.* 16, 2546–2553 (2016).
14. Greenwood, A., Elstein, D., Zimran, A. & Altarescu, G. Effect of vitamin D receptor (VDR) genotypes on the risk for osteoporosis in type 1 Gaucher disease. *Clin. Rheumatol.* 29, 1037–1041 (2010).
  15. Vairo, F. *et al.* KIR genes and HLA class I ligands in Gaucher disease. *Gene* 516, 53–57 (2013).
  16. Khan, A., Hangartner, T., Weinreb, N. J., Taylor, J. S. & Mistry, P. K. Risk factors for fractures and avascular osteonecrosis in type 1 Gaucher disease: A study from the International Collaborative Gaucher Group (ICGG) Gaucher Registry. *J. Bone Miner. Res.* 27, 1839–1848 (2012).
  17. Charrow, J. *et al.* The Gaucher Registry: Demographics and Disease Characteristics of 1698 Patients With Gaucher Disease. *Arch Intern Med.* 160, 2835–2843 (2000).
  18. Itzchaki, M. *et al.* Orthopedic considerations in Gaucher disease since the advent of enzyme replacement therapy. *Acta Orthop. Scand.* 75, 641–653 (2004).
  19. Picon, P. D., Gadelha, M. I. P. & Alexandre, R. F. Doença de Gaucher. *Protoc. clínicos e diretrizes Ter. Secr. Atenção à Saúde - Brasília Ministério da Saúde* 2, 159–194 (2014).
  20. Biegstraaten, M. *et al.* Management goals for type 1 Gaucher disease: An expert consensus document from the European working group on Gaucher disease. *Blood Cells, Mol. Dis.* 68, 203–208 (2018).
  21. Fedida, B. *et al.* Bone marrow involvement in Gaucher disease at MRI : what long-term evolution can we expect under enzyme replacement therapy? *Eur. Radiol.* 25, 2969–2975 (2015).
  22. Mehta, A. *et al.* Presenting signs and patient co-variables in Gaucher disease: outcome of the Gaucher Earlier Diagnosis Consensus (GED-C) Delphi initiative. *Intern. Med. J.* 49, 578–591 (2019).

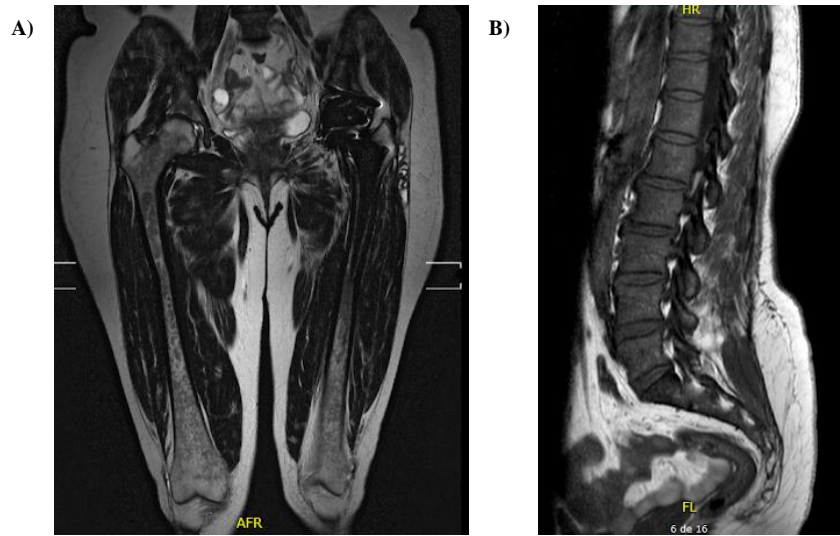
## FIGURES AND TABLES:



**Figure 1.** Family history. Patient 1 = III4; patient 2 = III2. Individuals III1, III3 and III5 screened negative for Gaucher disease (normal glucocerebrosidase activity).



**Figure 2.** Magnetic resonance imaging of patient 1. A) Coronal T2-weighted MRI of both femurs shows definite signal hypointensity at the distal epiphysis. B) Sagittal T1-weighted MRI of the lumbar spine shows diffuse hypointensity.



**Figure 3.** MRI of patient 2. A) Coronal T2-weighted MRI of both femurs shows definite signal hypointensity at the distal epiphysis. B) Sagittal T1-weighted MRI of the lumbar spine shows diffuse hypointensity.

**Table 1.** Haematological parameters, chitotriosidase activity, and bone marrow burden score throughout the treatment period in patients 1 and 2.

	<b>Patient 1</b>	<b>Patient 2</b>
<b>GBA1 genotype</b>	E349K/S366N	E349K/S366N
<b>Glucocerebrosidase activity</b>		
Leucocyte (NRV 10-45 nmol/h/mg protein)	5	2.8
Fibroblast (NRV 257-668 nmol/h/mg protein)	132	60
<b>Baseline</b>		
Age at diagnosis (years)	42	45
Bone marrow burden score	NA	NA
Haemoglobin (g/dL)	14.6	11.6
Platelets (/ $\mu$ L)	143,000	192,000
Ferritin (ng/mL)	588	880
Chitotriosidase activity (nmol/h/mL)	15,581	3,432
<b>At 1-year follow-up</b>		
Treatment	Miglustat 300 mg/day	Miglustat 300 mg/day
Bone marrow burden score	13	14
Haemoglobin (g/dL)	14	11.7
Platelets (/ $\mu$ L)	172,000	207,000
Ferritin (ng/mL)	536	1,160
Chitotriosidase activity (nmol/h/mL)	8,591	1,667
<b>At 2-year follow-up</b>		
Treatment	Imiglucerase 30 IU/kg/inf	Miglustat 300 mg/day
Bone marrow burden score	NA	14
Haemoglobin (g/dL)	14.5	11.8
Platelets (/ $\mu$ L)	224,000	184,000
Ferritin (ng/mL)	937	1,117
Chitotriosidase activity (nmol/h/mL)	5821	1,984
<b>At 3-year follow-up</b>		
Treatment	Imiglucerase 30 IU/kg/inf	Taliglucerase 15 IU/kg/inf
Bone marrow burden score	3	14
Haemoglobin (g/dL)	14.5	12.4
Platelets (/ $\mu$ L)	259,000	202,000



Ferritin (ng/mL)	608	1,025
Chitotriosidase activity (nmol/h/mL)	1,472	1,689
<b>At 4-year follow-up</b>		
Treatment	Imiglucerase 30 IU/kg/inf	Taliglucerase 15 IU/kg/inf
Bone marrow burden score	NA	14
Haemoglobin (g/dL)	15.3	13.2
Platelets (/ $\mu$ L)	287,000	234,000
Ferritin (ng/mL)	689	1,053
Chitotriosidase activity (nmol/h/mL)	881	1,133

NA, not available.

***Efficacy and safety of taliglucerase alfa for the treatment of Gaucher disease: a 6-year experience***

Livia d'Avila Paskulin<sup>1,2,\*</sup>, Filippo Pinto e Vairo<sup>3,4</sup>, Bárbara C. Krug<sup>5</sup>, Paulo Picon<sup>5,6</sup>,  
Ida Vanessa Doederlein Schwartz<sup>1,2,7</sup>

1. Postgraduate Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.
2. Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.
3. Center for Individualized Medicine, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA.
4. Department of Clinical Genomics, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA.
5. COMEX, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.
6. Department of Internal Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.
7. BRAIN Laboratory, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

\* **Corresponding Author:** [ldpaskulin@hcpa.edu.br](mailto:ldpaskulin@hcpa.edu.br)

**Journal to be submitted:** Blood Cells, Molecules and Diseases

**Situation:** in preparation

## ABSTRACT

Gaucher disease (GD) is one of the most common lysosomal disorders, occurring in approximately 1 in 40,000 live births worldwide. Since 2014, enzyme replacement therapy (ERT) with taliglucerase alfa has been the first-line treatment of choice for adult patients with GD in Brazil. The aim of this study was to evaluate the long-term efficacy and safety of taliglucerase alfa in a cohort of Brazilian patients treated at a referral center for inborn errors of metabolism. All patients who received at least one infusion of the enzyme at the study center were considered eligible to participate. Patients were followed for adverse effects throughout the study period. Platelets, hemoglobin, chitotriosidase activity, bone marrow burden (BMB) score, bone mineral density, and the Severity Score Index (SSI) were analyzed. For patients who were switched to taliglucerase alfa from imiglucerase, the same variables were compared before and after the switch. At 6-year follow-up, all parameters of interest had remained stable or improved. Although the overall rate of adverse effects was higher than in other studies, no serious adverse effects were considered related to treatment. Based on our findings, ERT with taliglucerase alfa is an effective and safe approach for treatment of patients with GD.

**Keywords:** Gaucher disease, *GBA1*, taliglucerase alfa, enzyme replacement therapy

## INTRODUCTION:

Gaucher disease (GD) is one of the most common lysosomal disorders, with an overall frequency of 1 in 40,000 live births worldwide<sup>1</sup>; it is caused by deficient activity of lysosomal glucocerebrosidase, an enzyme encoded by the *GBA1* gene. Accumulation of glucocerebrosides within macrophages causes malfunction and shifts their activation profile to a proinflammatory state<sup>2</sup>, leading to symptoms such as hepatosplenomegaly, thrombocytopenia, osteonecrosis, and, in some patients, neurological impairment. GD is categorized into three types, according to the presence and extent of neurological involvement: type 1 GD is characterized by no overt neurological symptoms; type 2 GD (acute neuronopathic), by acute neurological compromise which is fatal at an early age; and type 3 GD (chronic neuronopathic), by neurological compromise with onset in late childhood or adulthood.

GD was the first metabolic disorder to be treated successfully with enzyme replacement therapy (ERT), with alglucerase, a mannose-terminated form of glucocerebrosidase extracted from human placental tissue, first approved in 1991<sup>3</sup>. In 1995, the first recombinant glucocerebrosidase analogue was developed: imiglucerase, expressed in Chinese hamster ovary cells<sup>4,5</sup>. Twenty-five years later, velaglucerase—a recombinant enzyme derived from human cells—obtained regulatory approval<sup>6</sup>.

In 2010, after a worldwide shortage of imiglucerase due to viral contamination in the production facilities<sup>7,8</sup>, taliglucerase alfa, a plant-derived recombinant enzyme which had yet to be approved at the time<sup>9,10</sup>, entered emergency use to ensure continuity of care for patients previously treated with imiglucerase. Taliglucerase alfa was approved in 2012, and, since 2014, has become the first-line treatment of choice for adult patients with GD in Brazil<sup>11</sup>.

The basic difference between the previous two mammalian-derived recombinant enzymes and taliglucerase alfa is that the latter does not require deglycosylation to expose the mannose residues *in vitro*<sup>12</sup>, which both simplifies and reduces the cost of production. On the other hand, as it is plant-derived, it can cause more adverse reactions than mammalian-derived enzymes. In clinical

trials<sup>10</sup>, taliglucerase alfa appeared to have similar safety and efficacy profiles compared to imiglucerase<sup>13</sup> and velaglucerase<sup>14</sup>. Cravo et al<sup>15</sup> published a description of a Brazilian experience with taliglucerase alfa in which patients remained stable after switching from imiglucerase, although 85% of the patients experienced at least one adverse effect during 3.5 years of follow-up.

Within this context, the present study was conducted to evaluate the long-term efficacy and safety of taliglucerase alfa in a cohort of Brazilian patients with GD.

## **METHODS:**

This is a retrospective cohort study with a convenience sampling strategy. Data were collected from January 2012 to January 2018 (Figure 1). The study protocol was approved by the ethics committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, and all patients provided written informed consent.

### **Patients**

Patients with a biochemical and genetic diagnosis of GD (types 1 or 3) who had received at least one infusion of taliglucerase alfa at the Gaucher Disease Referral Center of Porto Alegre, Brazil, were eligible to participate in the study. Patients could be naïve to treatment or have been previously treated with imiglucerase. All patients had their *GBA1* genotype assessed by next-generation sequencing.

Since 2012, taliglucerase alfa has been prescribed to 18 patients at the Center. However, only patients who had been on regular treatment with taliglucerase alfa for more than 6 months (n=8) were included in the efficacy analysis.

### **Safety**

All patients who had at least one infusion of the enzyme were considered eligible to participate in the study. Patients were followed for adverse effects

throughout the study period (Figure 1). Adverse reactions were described and categorized as mild, moderate, or severe according to the physician's impression<sup>16</sup>.

## **Efficacy**

Severity Score Index (SSI)<sup>17</sup>, hemoglobin, platelets, chitotriosidase activity, and bone parameters were assessed during the study period. For patients who had switched to taliglucerase alfa, the same variables were compared before and after the switch (Figure 1).

SSI, hemoglobin, platelets, and chitotriosidase were assessed every 3 months. Bone disease was evaluated in two different compartments: cortical and medullary. Cortical disease was assessed through dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) measurement of bone mineral density (BMD), classified as normal, osteopenia, osteoporosis, or reduced bone densitometry for age and gender, in accordance with the International Society of Bone Densitometry 2015 guidelines<sup>18</sup>. Medullary involvement was assessed through the Bone Marrow Burden score as described by Maas in 2003, where values between 0 and 4 are mild, 5 and 8 are moderate, and 9 and 16 denote severe involvement<sup>19</sup>. Bone parameters were assessed during the first year of treatment with taliglucerase alfa, and subsequently every other year or as clinically indicated (Figure 1).

## **Statistical Methods**

Descriptive statistics were used. Sample size (n), mean, standard deviation, standard error, and range were used for continuous variables. Number and percentage of patients were used for categorical variables.

## **RESULTS:**

Of the 18 patients included, 10 were male. The mean age at inclusion was 39 years (range, 14-62 years). Seventeen patients had type 1 GD, and one had type 3 GD. Data regarding age, gender, *GBA1* genotype, time on imiglucerase or

miglustat treatment before ERT with taliglucerase alfa, and whether the patient was included in the efficacy analysis are described in Table 1.

## **Safety**

Nine patients (50%) had at least one mild adverse reaction during treatment with taliglucerase alfa (Figure 2). Table 2 discriminates the adverse events experienced by each patient, together with type of intervention needed, need for hospitalization, severity, and relation to ERT. Two patients had severe adverse reactions: a 55-year-old man previously treated with imiglucerase and previously diagnosed with multiple myeloma (MM), who died of complications of MM after 21 months on ERT with taliglucerase alfa; and a 62-year-old man naïve to treatment with severe hepatic failure, anasarca, and jaundice, who, after the first minutes of infusion, developed hypotension later diagnosed as due to sepsis, progressing to cardiogenic shock and death after 2 days. Both reactions were classified as unrelated to taliglucerase alfa. A 14-year-old boy with type 3 GD developed a moderate adverse reaction of anaphylaxis despite premedication with ranitidine, loratadine, and hydrocortisone; the infusion was discontinued and hydrocortisone and promethazine were administered intravenously, with resolution of symptoms. This patient was described by Vairo *et al* in 2013<sup>20</sup> because he had previously developed a severe IgE-mediated adverse reaction to imiglucerase after 9 years of treatment. He is currently receiving ERT with velaglucerase and has not experienced further reactions.

One patient was found to be pregnant after her first infusions of taliglucerase alfa. At the time, there were no recommendations regarding treatment with this enzyme during pregnancy. After discussion with the patient and her family, ERT was maintained. She was referred to a specialized hospital for prenatal care and did not experience any complication during pregnancy. She gave birth to a healthy baby boy through vaginal delivery at 39 weeks of pregnancy.

## **Efficacy**

Nine patients completed at least 6 months of treatment with taliglucerase alfa and were included in the efficacy analysis. Hemoglobin, platelets, SSI, and chitotriosidase activity before and after switch to or initiation of taliglucerase alfa are displayed in Figure 3 and in Table 3. BMD results are shown in Table 4, and BMB scores, in Table 5.

## **DISCUSSION:**

Taliglucerase alfa was effective in our cohort. Naïve-to-treatment patients experienced improvement in clinical and laboratory parameters, while previously treated patients remained stable after 6 years of ERT. Only one individual (patient G) had a clinically significant decrease in hemoglobin during the 6<sup>th</sup> month of treatment; however, this occurred one day after delivery. Therefore, it can be interpreted as an immediate post-partum finding unrelated to inefficiency of taliglucerase alfa, as noticed by the catch-up of hemoglobin levels on her subsequent blood counts.

Patient A had osteoporosis with a T-score of -3, which did not improve despite 137 months of ERT with imiglucerase. After switching to taliglucerase alfa, the patient remained stable, with slight improvement of T-score. Patient F was naïve to treatment and experienced improvement of BMD T-score from osteopenia to normal after 50 months of taliglucerase alfa treatment. The other patients had normal BMD and remained stable. This is consistent with much of the literature on GD, which states that BMD is usually the slowest treatment target to be achieved<sup>21</sup>. Bone marrow infiltration remained stable for most patients, as expected, because patients who had at least two consecutive BMB measurements had already been on ERT for over 5 years<sup>22,23</sup>. Only patient B, a 52-year-old splenectomized woman with history of osteonecrosis of the right proximal and distal femur and right proximal humerus, had an increase in BMB score during ERT with taliglucerase alfa. She presented with acute bone pain on the left proximal femur after 192 months on ERT (132 months on imiglucerase and 60 months on taliglucerase;



mean dosage 30 IU/kg biweekly). MRI detected osteonecrosis of the left proximal femur, increasing her total BMB score from 3 to 6. ERT dosage was then increased to 45 IU/kg every other week.

Only 50% of the patients had adverse effects, a rate lower than that reported by Zimran *et al* in 2019 and by Cravo *et al* in 2018. Zimran *et al* evaluated 17 patients prospectively over 5 years and found that 85% had at least one mild adverse effect<sup>24</sup>, although they stated that none were related to taliglucerase-alfa treatment according to the physicians' impressions<sup>24</sup>. Cravo *et al* analyzed 35 Brazilian patients retrospectively for 3.4 years and found that 78% experienced adverse effects. Unfortunately, this study did not establish whether adverse effects were related to ERT<sup>15</sup>. Pastores *et al* (2014) followed 31 patients for 9 months and reported that 32% of the adults (n=8) had at least one adverse effect considered related to ERT with taliglucerase alfa<sup>25</sup>. In our cohort, the only two severe adverse effects were considered unrelated to ERT; the treatment-related events were mild (n=4) or moderate (n=3).

### **CONCLUSION:**

Based on our findings, ERT with taliglucerase alfa is an effective and safe approach for treatment of patients with GD. Platelets, hemoglobin, chitotriosidase activity, BMB score, BMD, and SSI remained stable or improved after 6 years of treatment. Although the overall rate of adverse effects was higher than in other studies, no serious adverse effects were considered treatment-related.

### **ACKNOWLEDGMENTS:**

The authors thank the Hospital de Clínicas de Porto Alegre staff, particularly at the Medical Genetics Service. Financial support for this study was provided by CAPES.

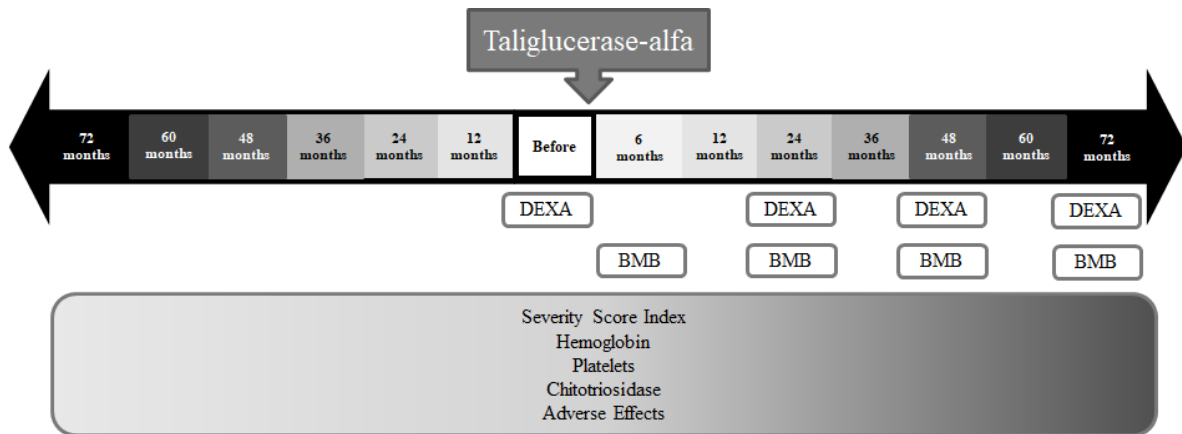
## REFERENCES:

1. Grabowski, G. A. Phenotype, diagnosis, and treatment of Gaucher's disease. *Lancet* 372, 1263–1271 (2008).
2. Boven, L. A. *et al.* Gaucher cells demonstrate a distinct macrophage phenotype and resemble alternatively activated macrophages. *Am. J. Clin. Pathol.* 122, 359–369 (2004).
3. Barton, N. W. *et al.* Replacement Therapy for Inherited Enzyme Deficiency - Macrophage-targeted glucocerebrosidase for Gaucher disease. *N. Engl. J. Med.* 324, 1464–1470 (1991).
4. Zimran, A. *et al.* Replacement therapy with imiglucerase for type 1 Gaucher's disease. *Lancet* 345, 1479–1480 (1995).
5. Grabowski, G. A. *et al.* Enzyme therapy in type 1 Gaucher disease: Comparative efficacy of mannose- terminated glucocerebrosidase from natural and recombinant sources. *Ann. Intern. Med.* 122, 33–39 (1995).
6. Zimran, A. *et al.* Phase 1/2 and extension study of velaglucerase alfa replacement therapy in adults with type 1 Gaucher disease: 48-month experience. *Blood* 115, 4651–4656 (2010).
7. Cox, T. M. Recommendations for treating patients with Gaucher disease with emerging enzyme products. *Blood Cells, Mol. Dis.* 44, 84–85 (2010).
8. Hollak, C. E. M. *et al.* Force Majeure: Therapeutic measures in response to restricted supply of imiglucerase (Cerezyme) for patients with Gaucher disease. *Blood Cells, Mol. Dis.* 44, 41–47 (2010).
9. Aviezer, D. *et al.* A plant-derived recombinant human glucocerebrosidase enzyme - A preclinical and phase I investigation. *PLoS One* 4, 4792 (2009).
10. A., Z. *et al.* Pivotal trial with plant cell-expressed recombinant glucocerebrosidase, taliglucerase alfa, a novel enzyme replacement therapy for Gaucher disease. *Blood* 118, 5767–5773 (2011).
11. Picon, P. D., Gadelha, M. I. P. & Alexandre, R. F. Doença de Gaucher. *Protoc. clínicos e diretrizes Ter. Secr. Atenção à Saúde - Brasília Ministério da Saúde* 2, 159–194 (2014).
12. Shaaltiel, Y. *et al.* Production of glucocerebrosidase with terminal mannose

- glycans for enzyme replacement therapy of Gaucher's disease using a plant cell system. *Plant Biotechnol. J.* 5, 579–590 (2007).
13. Starzyk, K., Richards, S., Yee, J., Smith, S. E. & Kingma, W. The long-term international safety experience of imiglucerase therapy for Gaucher disease. *Mol. Genet. Metab.* 90, 157–163 (2007).
  14. Zimran, A. *et al.* Seven-year safety and efficacy with velaglucerase alfa for treatment-naïve adult patients with type 1 Gaucher disease. *Am. J. Hematol.* 90, 577–583 (2015).
  15. Cravo, R. *et al.* Taliglucerase alfa in Gaucher disease: Description of a Brazilian experience. *Blood Cells, Mol. Dis.* 68, 160–162 (2018).
  16. What is a Serious Adverse Event? Available at: <http://www.fda.gov/Safety/Medwatch/Howtoreport/Ucm053087.Htm>.
  17. Zimran, A. *et al.* Gaucher disease. Clinical, laboratory, radiologic, and genetic features of 53 patients. *Med.* 71, 337–353 (1992).
  18. International Society of Bone Densitometry: 2015 ISCD Official Positions – Adult. Available at: <https://www.iscd.org/official-positions/2015-iscd-official-positions-adult/>.
  19. Maas, M. *et al.* Quantification of Bone Involvement in Gaucher Disease: MR Imaging Bone Marrow Burden Score as an Alternative to Dixon Quantitative Chemical Shift MR Imaging—Initial Experience. *Radiology* 229, 554–561 (2003).
  20. Vairo, F. *et al.* Enzyme Replacement Therapy in a Patient with Gaucher Disease Type III: A Paradigmatic Case Showing Severe Adverse Reactions Started a Long Time After the Beginning of Treatment. *JIMD Rep.* 11, 1–6 (2013).
  21. Biegstraaten, M. *et al.* Management goals for type 1 Gaucher disease: An expert consensus document from the European working group on Gaucher disease. *Blood Cells, Mol. Dis.* 68, 203–208 (2018).
  22. Fedida, B. *et al.* Bone marrow involvement in Gaucher disease at MRI : what long-term evolution can we expect under enzyme replacement therapy? *Eur. Radiol.* 25, 2969–2975 (2015).

23. Elstein, D., Haims, A. H., Zahrieh, D., Cohn, G. M. & Zimran, A. Impact of velaglucerase alfa on bone marrow burden score in adult patients with type 1 Gaucher disease: 7-Year follow-up. *Blood Cells, Mol. Dis.* 53, 56–60 (2014).
24. Zimran, A. *et al.* Long-term efficacy and safety results of taliglucerase alfa through 5years in adult treatment-naïve patients with Gaucher disease. *Blood Cells, Mol. Dis.* 78, 14–21 (2019).
25. Pastores, G. M. *et al.* A Phase 3, multicenter, open-label, switchover trial to assess the safety and efficacy of taliglucerase alfa, a plant cell-expressed recombinant human glucocerebrosidase, in adult and pediatric patients with Gaucher disease previously treated with imigluc. *Blood Cells, Mol. Dis.* 53, 253–260 (2014).

## FIGURES AND TABLES



**Figure 1.** Schematic diagram of study protocol. DEXA was performed before ERT with taliglucerase alfa and every other year thereafter; MRI for BMB score was performed during the first year of treatment and every other year thereafter; Severity Score Index, hemoglobin, platelets, and chitotriosidase were assessed every 3 months; Adverse events were evaluated throughout the study period. BMD = bone mineral density; BMB = Bone Marrow Burden score.

**Table 1.** Patients' demographic and clinical characteristics.

Patient	Age (years)	Gender	GD Type	GBA1 Genotype	Time on Imiglucerase (months)	Imiglucerase dose pre-switch	Time on Miglustat (months)	Miglustat dose pre-switch	Taliglucerase dose post-switch	Time on Taliglucerase post-switch	Current Dose	Efficacy Analysis	Safety Analysis
A	56	F	1	N370S/RecNcil	138	15	0	-	30	72	30	+	+
B	45	F	1	N370S/ L444P	114	15	0	-	30	70	30	+	+
C	41	M	1	N370S/ RecNcil	152	15	0	-	15	40	15	+	+
D	25	M	1	N370S/RecNcil	123	45	0	-	30	71	30	+	+
E	32	M	1	N370S/L444P	4	15	0	-	15	72	30	+	+
F	58	M	1	N370S/N370S	24	15	0	-	15	72	15	+	+
G	<b>21</b>	<b>F</b>	<b>1</b>	<b>N370S/L444P</b>	<b>0</b>	<b>-</b>	<b>0</b>	<b>-</b>	<b>15</b>	<b>24</b>	<b>20</b>	<b>+</b>	<b>++</b>
H	<b>51</b>	<b>F</b>	<b>1</b>	<b>E349K/S366N</b>	<b>0</b>	<b>-</b>	<b>41</b>	<b>300</b>	<b>30</b>	<b>7</b>	<b>30</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
I	27	M	1	N370S/L444P+A456P	238	15	0	-	15	5	15	+	+
J	55	M	1	N370S/N370S	35	30	0	-	30	21	-	-	+
K	<b>62</b>	<b>M</b>	<b>1</b>	<b>N370S/RecNcil</b>	<b>0</b>	<b>-</b>	<b>0</b>	<b>-</b>	<b>60</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>+</b>
L	55	M	1	N370S/RecNcil	34	15	0	-	15	-	-	-	+
M	44	M	1	N370S/L444P	6	15	0	-	15	-	-	-	+
N	32	F	1	N370S/L444P	16	15	0	-	15	-	-	-	+
O	28	F	1	N370S/RecNcil	17	15	0	-	15	-	-	-	+
P	14	M	3	L444P/L444P	108 **	60	0	-	60	-	-	-	+
Q	<b>44</b>	<b>F</b>	<b>1</b>	<b>E349K/S366N</b>	<b>0</b>	<b>-</b>	<b>10</b>	<b>300</b>	<b>30</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>+</b>
R	29	F	1	N370S/L444P	21	30	0	-	30	-	-	-	+
<b>Mean</b>	39.94				52.2	22.5	25.5	300	25.8	45.4	23.9		

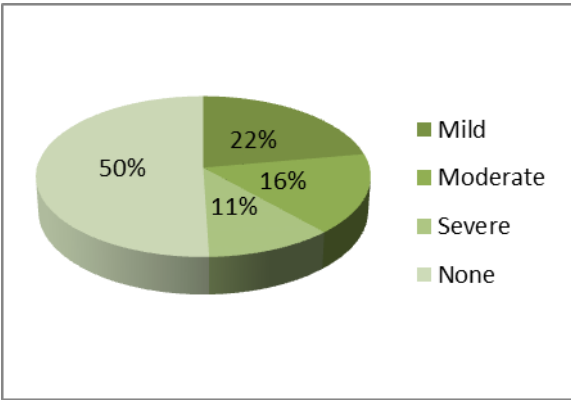
+: patient included in the analysis

- : patient excluded from the analysis

\* Pregnant during ERT with taliglucerase

\*\* 34 months with no specific treatment due to severe adverse reaction to imiglucerase

Patients highlighted in bold are naïve to ERT.



**Figure 2.** Prevalence and severity of adverse events throughout the study period.

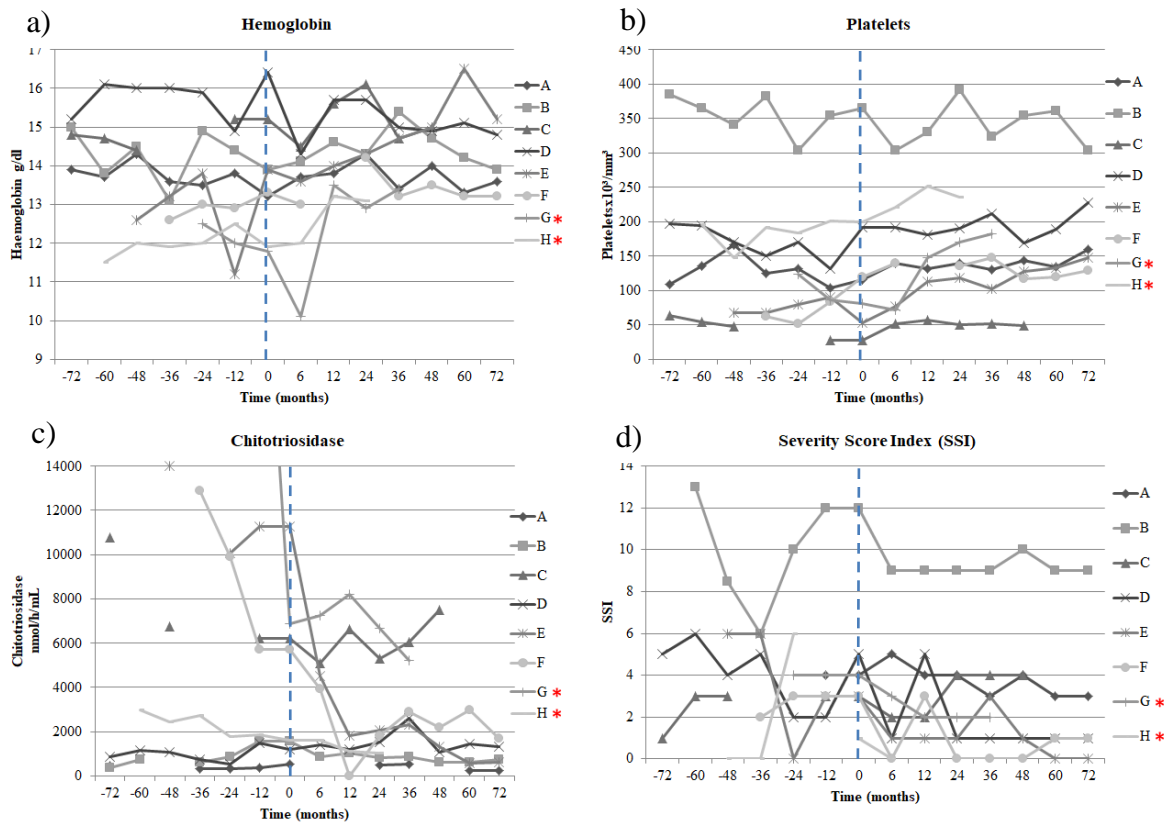
N=18.

**Table 2.** Adverse events, severity, and relation to treatment

Patient	Adverse event	Fatal	IV medication	Oral medication	ERT discontinued	Hospitalization required	Severity	ERT-related
<b>G</b>	Nausea, abdominal pain	No	No	<b>Yes</b>	No	No	Mild	<b>Yes</b>
<b>J</b>	Progression of multiple myeloma	<b>Yes</b>	No	No	No	<b>Yes</b>	<b>Severe</b>	No
<b>K</b>	Cardiogenic shock secondary to sepsis	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>	<b>Severe</b>	No
<b>M</b>	Hyperemia, edema (infusion site reaction)	No	<b>Yes</b>	No	No	No	Mild	<b>Yes</b>
<b>N</b>	Nausea, vomiting, abdominal pain	No	No	<b>Yes</b>	No	No	Mild	<b>Yes</b>
<b>O</b>	Nausea, vomiting, abdominal pain	No	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>	No	Moderate	<b>Yes</b>
<b>P</b>	Anaphylaxis, headache, nausea, vomiting, abdominal pain	No	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>	No	Moderate	<b>Yes</b>
<b>Q</b>	Hyperemia, edema, pruritus, respiratory distress	No	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>	No	Moderate	<b>Yes</b>
<b>R</b>	Nausea, vomiting, abdominal pain	No	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>	No	No	Mild	<b>Yes</b>

ERT, enzyme replacement therapy.





**Figure 3.** Disease parameters before and during ERT with taliglucerase alfa: 3.a) Hemoglobin; 3.b) Platelets; 3.c) Chitotriosidase activity; and 3.d) Severity Score Index. Each line is a different patient. Dashed blue line (Time = 0 months) marks the initiation of ERT with taliglucerase alfa. Patients G and H (highlighted with \*) were naïve to treatment.

**Table 3.** Mean values of each parameter of interest at each time point of analysis. *0 months* represents the initiation of taliglucerase-alfa treatment. The last two columns are the mean values for each period (before and after taliglucerase alfa) for the overall sample.

	-72 months	-60 months	-48 months	-36 months	-24 months	-12 months	0 months	6 months	12 months	24 months	36 months	48 months	60 months	72 months	Pre- Tali	Post- Tali
<b>Hemoglobin (g/dL)</b>	14.7	14.0	14.0	13.4	13.7	13.4	13.7	13.2	14.3	14.4	14.3	14.5	14.5	14.1	13.8	14.2
<b>Platelets (<math>\times 10^3/\text{mm}^3</math>)</b>	188.5	188.6	156.3	163.2	148.9	134.5	144.1	149.5	173.1	178.8	164.1	160.2	187.2	193.4	160.6	172.3
<b>Chitotriosidase (nmol/h/mL)</b>	3108.0	1630.7	6065.8	3463.6	3911.7	7040.8	4373.6	3521.4	3330.2	2462.8	2926.0	2545.6	1171.0	920.8	4227.7	2411.1
<b>Severity Score Index</b>	3.0	6.0	4.0	5.0	4.0	3.0	3.5	1.5	3.0	2.0	3.0	2.5	1.0	1.0	4.1	2.0

**Table 4.** DEXA bone mineral density prior to switch (BMD1) and after the switch to taliglucerase alfa, measured every +/- 2 years (BMD2, 3 and 4).

PATIENT (T or Z score)	DEXA Bone Mineral Density (L1-L4)							
	BMD1		BMD2		BMD3		BMD4	
	Time on imiglucerase	Score	Time on taliglucerase	Score	Time on taliglucerase	Score	Time on taliglucerase	Score
<b>A (T)</b>	137	-3	21	-3.3	43	-2.6	56	-2.8
<b>B (T)</b>	104	0.1	28	0.9	49	0.7	NE	NE
<b>C (Z)</b>	152	-0.6	2	-0.6	24	-1.4	NE	NE
<b>D (Z)</b>	114	-1.4	41	-0.4	68	-0.5	NE	NE
<b>E (Z)</b>	0	-1.57	6	0.2	28	0.3	NE	NE
<b>F (T)</b>	16	-2.3	16	-1.6	50	-1.4	NE	NE
<b>G (Z)</b>	0	-0.5	22	-0.4	NE	NE	NE	NE

NE = not evaluated

**Table 5.** Bone Marrow Burden (BMB) score measured during first year of ERT with taliglucerase alfa and every 2 years thereafter.

PATIENT	BONE MARROW BURDEN					
	BMB1		BMB2		BMB3	
	Time on taliglucerase	Score	Time on taliglucerase	Score	Time on taliglucerase	Score
<b>A</b>	9	3	33	3	59	3
<b>B</b>	7	3	45	3	67	6*
<b>C</b>	3	8	NE	NE	NE	NE
<b>D</b>	8	2	23	2	NE	NE
<b>E</b>	10	12	23	12	34	12
<b>F</b>	9	6	21	6	52	6

NE = not evaluated

\* Femur osteonecrosis

Mild = 0-4

Moderate = 5-8

Severe = 9-16



Contents lists available at ScienceDirect

## Molecular Genetics and Metabolism Reports

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ymgmr](http://www.elsevier.com/locate/ymgmr)



### Correspondence

### Breastfeeding in patients with Gaucher disease: Is taliglucerase alfa safe?



Dear Editor

In 2014 [1], we shared our experience on breastfeeding and enzyme replacement therapy (ERT) with imiglucerase in Gaucher disease (GD). Our results were in accordance with *Sekijima et al.* [2], and showed that activity of  $\beta$ -glucocerebrosidase in human breast milk from a patient with type 1 GD on ERT with imiglucerase (patient 1) is much lower than the levels of natural  $\beta$ -glucocerebrosidase in breast milk from a healthy woman. There is no report in the literature regarding the use of taliglucerase alfa (a recombinant  $\beta$ -glucocerebrosidase produced in carrots cells) in breastfeeding patients with GD. Herein, we report on our experience with this recombinant enzyme during breastfeeding.

A 20-year-old female (patient 2) was diagnosed with GD after a liver biopsy performed due to hepatosplenomegaly (*GBA1* genotype: N370S/L444P). Taliglucerase alfa 15 U/kg biweekly was initiated, following the Brazilian Ministry of Health recommendations [3]. She was diagnosed as being 6-week pregnant after the seventh infusion. Since there were no recommendations regarding the treatment with taliglucerase alfa during pregnancy, ERT was maintained. She was referred for prenatal care in a specialized hospital, where she followed all recommendations regarding diet and vitamin supplementations, and did not experience any complication during pregnancy. She gave birth through vaginal delivery to a full-term healthy baby boy at 39 weeks of pregnancy, and exclusively on-demand breastfeeding was initiated and maintained through 10 months. Patient received calcium supplementation (500 mg/day) and maintained her regular infusions with a dosage of 20 U/kg every other week.

One month after delivery, blood samples were collected before and 30 min after her scheduled infusion of taliglucerase alfa, and we did the same analysis in blood and breast milk we have done for patient 1: breast milk samples were collected before, immediately after and 30 min after the infusion.  $\beta$ -glucocerebrosidase activity was measured in leukocytes and in breast milk as described by *Peters et al.* [4] (Table 1).

**Table 1**  
 $\beta$ -glucocerebrosidase activity in leukocytes and breast milk from a patient with Gaucher disease before and after infusion of imiglucerase 30 U/kg (patient 1) and taliglucerase alfa 20 U/kg (patient 2).

Variable	$\beta$ -glucocerebrosidase activity	
	Patient 1 (Dornelles et al. [1])	Patient 2 (Current Study)
Leukocytes (nmol/h/mg prot) <sup>a</sup>		
Before infusion	0.62	1.3
After infusion <sup>b</sup>	7.5	3.5
Breast milk (nmol/h/mL) <sup>c</sup>		
Before infusion	2	3.9
After infusion	3	7.1
30 min after infusion	4	7.2

<sup>a</sup> Normal Range Value = 10–45 nmol/h/mg prot. Samples were collected immediately after infusion, which has an approximate duration of 2 h.

<sup>b</sup> In patient 1, collected right after infusion; in patient 2, collected 30 min after infusion.

<sup>c</sup>  $\beta$ -glucocerebrosidase activity measured in a control milk sample was 42 nmol/h/mL.

According to our data, activity of  $\beta$ -glucocerebrosidase in human breast milk from patient 2 is also much lower than the levels of natural  $\beta$ -glucocerebrosidase in breast milk from a healthy woman, suggesting that the levels of recombinant enzymes excreted in human breast milk is very low. For this reason, we believe that taliglucerase alfa should not be contraindicated to women with GD during breastfeeding. Actually, we advocate that ERT should be indicated to these women, together with calcium supplementation, since it is a period in which the need for calcium and the bone remodeling increases [5].

<https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2018.11.004>

Received 13 November 2018; Accepted 14 November 2018

Available online 16 January 2019

2214-4269/© 2018 The Author. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Conflicts of interest**

The authors indicate that they have no conflicts of interest regarding the content of this article.

**Acknowledgments**

This study was supported by the CAPES Post Graduate Research Program, and by the Hospital de Clínicas de Porto Alegre Research and Event Incentive Fund (FIPE/HCPA).

**References**

- [1] A.D. Dornelles, C.B.O. Netto, F. Vairo, J.F. Mari, K.M. Tirelli, I.V.D. Schwartz, Breastfeeding in Gaucher disease: is enzyme replacement therapy safe? *Clin. Ther.* 36 (2014) 990–991.
- [2] Y. Sekijima, T. Ohashi, S. Ohira, et al., Successful pregnancy and lactation outcome in a patient with Gaucher disease receiving enzyme replacement therapy, and the subsequent distribution and excretion of imiglucerase in human breast milk, *Clin. Ther.* 32 (2010) 2048–2052.
- [3] P.D. Picon, M.L.P. Gadelha, A. Beltrame, *Protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas*, v. 2. Secretaria de Atenção à Saúde – Brasília: Ministério da Saúde, (2014).

- [4] S.P. Peters, P. Coyle, R.H. Glew, Differentiation of beta-glucocerebrosidase from beta-glucosidase in human tissues using sodium taurocholate, *Arch. Biochem. Biophys.* 175 (1976) 569–571.
- [5] H.J. Kalkwarf, B.L. Specker, Bone mineral changes during pregnancy and lactation, *Endocrine* 17 (2002) 49–53.

Livia Paskulin<sup>a,b,\*</sup>, Alícia Dorneles Dornelles<sup>c</sup>, Amanda Quevedo<sup>a</sup>,  
Tatiele Nalin<sup>a</sup>, Kristiane Michellin Tirelli<sup>a</sup>, Filippo Vairo<sup>d,e</sup>,  
Ida Vanessa Doederlein Schwartz<sup>a,b,f</sup>

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

<sup>b</sup> Post-Graduation Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>c</sup> Post Graduation Program in Clinical Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>d</sup> Center for Individualized Medicine, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA

<sup>e</sup> Department of Clinical Genomics, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA

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

E-mail address: [ldpaskulin@hcpa.edu.br](mailto:ldpaskulin@hcpa.edu.br) (L. Paskulin).

\* Corresponding author at: Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

Neste tópico, serão discutidos em maiores detalhes alguns tópicos não abordados extensivamente nos artigos.

Monitorar a infiltração da medula óssea dos pacientes com DG através de protocolo com ressonância magnética mostrou ser benéfica e indicar resposta a tratamento apenas durante os primeiros 5 anos de tratamento regular com a TRE. Após este período, em pacientes aderentes ao tratamento e estáveis clinicamente o escore permaneceu totalmente estável. Por este motivo e principalmente tendo em vista que o Brasil é um país ainda em desenvolvimento e que em muitas das suas regiões a ressonância magnética não está disponível nem para casos de urgência médica ou para casos oncológicos, a indicação de realizar o exame após 5 anos de tratamento regular é discutível na prática assistencial, devendo ser rotina apenas a nível de pesquisa, visando não sobrecarregar um Sistema Único de Saúde que muitas vezes não consegue prover o básico para seus integrantes.

A alfataliglicerase, no Artigo 3, apresentou taxa de efeitos adversos relacionados a TRE maior do que a relatada em estudos prévios. A hipótese de que os nossos pacientes sejam mais imunorreativos ou que o fármaco possa sofrer algum tipo de mal preparo no Brasil pode existir; no entanto, acreditamos fortemente que esta diferença de taxas de efeitos adversos em nossa coorte deve-se ao fato de que este estudo não sofre viés ou conflitos de interesse em relação ao financiamento ligado a indústrias farmacêuticas como os anteriores. Acreditamos, portanto, que a real taxa de efeitos adversos em pacientes em uso de alfataliglicerase seja a deste presente estudo.

Ainda em relação à alfataliglicerase, ela mostrou ser adequada para uso como primeira linha de tratamento não apenas por ser eficaz e segura, mas também quando se compara os custos de produção destas enzimas: pelo fato de ser produzida em células de cenoura e de não necessitar passar por etapas de deglicosilação, o seu custo de produção pode chegar até a metade das outras enzimas. Esta diferença de preço, no entanto, não é tão evidente quando se compara o preço direto ao consumidor (no caso, o Estado brasileiro): custo de

400UI de imiglucerase = 1.620,34 reais; de alfataliglicerase = 1.525,12 reais. No entanto, levando-se em consideração que cada paciente pode custar para o Estado de 495 a 960 mil reais por ano, cada pequena diferença no custo individual pode representar uma oportunidade de realocamento de recursos financeiros para ser aplicado a outros setores da saúde do Brasil. Além disso, pelo fato da alfataliglicerase ser a primeira enzima recombinante para DG produzida no Brasil, pela Bio-Manguinhos (Rio de Janeiro/Brasil), houve ganho em termos de aquisição de tecnologia.

A decisão em manter a TRE com alfataliglicerase durante a gestação da paciente com DG tipo 1 relatada no Artigo 4 ocorreu de forma conjunta com a família da paciente, sendo expostos riscos e benefícios tanto para a manutenção do tratamento quanto para a suspensão dele. A gestação foi acompanhada no ambulatório de pré-natal de alto risco em hospital terciário e ocorreu sem intercorrências ou complicações agudas da DG; assim como o parto, que foi possível de ser normal uma vez que a paciente não apresentava doença óssea significativa nem esplenomegalia que contraindicassem a via baixa de parto. A paciente, no pós-parto imediato, apresentou queda de 5 pontos de hemoglobina (de 13,5 para 8,5 g/dL), mas não necessitou transfusão sanguínea, recuperando os níveis apenas com reposição de sulfato ferroso no puerpério conforme preconizado para todas as puérperas (em 2 meses, nova medida de Hb = 13,7g/dL). A criança nasceu com tamanho adequado para a idade gestacional, Apgar 9 tanto no 1º quanto no 5º minutos de vida, sem quaisquer defeitos congênitos à ectoscopia e recebeu alta com a mãe no segundo dia de vida, recebendo aleitamento materno exclusivo. A criança foi amamentada durante os 2 primeiros anos de vida enquanto sua mãe mantinha as infusões com alfataliglicerase quinzenais. Atualmente, o filho da paciente apresenta 3 anos e está com desenvolvimento neuropsicomotor adequado para a idade. Este relato, além de orientar manter o aleitamento durante a TRE com alfataliglicerase, traz uma contribuição tanto da eficácia quanto da segurança da enzima durante a gestação e o puerpério, sustentando que deve-se manter a TRE com alfataliglicerase durante estes períodos da vida da mulher.

**a) Caracterizar, por meio do cálculo de escore validado (o BMB), o grau de infiltração da medula óssea dos pacientes;**

Todos os pacientes com DG avaliados neste estudo apresentaram algum grau de infiltração na medula óssea, que mostrou correlação negativa com o número de plaquetas e positiva com a atividade da quitotriosidase.

**b) Avaliar, por meio do cálculo de escore validado (o BMB), a eficácia do tratamento específico da Doença de Gaucher (terapia de reposição enzimática ou terapia de redução de síntese de substrato) em relação ao desfecho infiltração da medula óssea;**

O escore BMB tende a reduzir nos primeiros 5 anos de tratamento com TRE e, após, a permanecer estabilizado. Em contrapartida, a TRS não foi eficaz em reduzir a infiltração da medula óssea nos pacientes com DG, sendo necessária a troca de TRS para TRE durante o período do estudo.

**c) Caracterizar genótipos associados à maior comprometimento ósseo.**

O genótipo E349K/ S366N parece estar relacionado à infiltração grave na medula óssea e, conseqüentemente, acometimento ósseo grave, e, em contrapartida, à doença hematológica e visceral leves na DG.

**d) Avaliar a segurança e a efetividade da alfataliglicerase no tratamento de pacientes com doença de Gaucher.**

A alfataliglicerase é eficaz ao se avaliar parâmetros de resposta ao tratamento hematológicos, viscerais e ósseos, apresentando padrão semelhante às respostas das outras duas enzimas presentes no mercado. Apesar de terem ocorrido mais efeitos adversos relacionados à alfataliglicerase em nossa coorte, a



enzima se mostrou segura, inclusive durante a gestação e amamentação, para ser utilizada como primeira linha de tratamento no Brasil.

Este trabalho abordou duas questões centrais na DG: o tipo de tratamento e a avaliação da alfatiglicerase, com sua repercussão de eficácia e segurança, e a avaliação do exame de ressonância magnética para cálculo do escore BMB como forma de seguimento clínico destes pacientes.

Finalmente, este estudo traz como contribuição para os pacientes com DG, para os profissionais da saúde diretamente vinculados ao tratamento destes pacientes e à comunidade científica: (1) o seguimento da infiltração da medula óssea com protocolo de ressonâncias magnéticas para escore BMB deve ser realizado bianualmente em pacientes com DG até o 5º ano de tratamento com TRE; após, a ressonância magnética deve ser realizada apenas em casos de não aderência ao tratamento ou no caso de instabilidade clínica e sintomas agudos da doença; (2) o genótipo do gene *GBA1* E349K/ S366N pode estar relacionado a acometimentos visceral e hematológico brandos e a manifestações ósseas graves na DG; (3) a alfatiglicerase é eficaz e segura para ser utilizada na população brasileira, apesar de apresentar, em nossa coorte, taxa de efeitos adversos brandos superiores aos vistos em outras amostras de outros estudos; e (4) a TRE com alfatiglicerase não deve ser descontinuada durante o período de gestação e de amamentação.

Nosso grupo de pesquisa tem como perspectiva realizar a avaliação do microbioma nas amostras de leite coletados durante este estudo, sendo que em resultados preliminares, foram aventadas alterações no microbioma do leite de pacientes com DG pela pesquisa da Dra. Karina Colonetti, integrante deste mesmo grupo de pesquisa. Além disso, planejamos realizar discussão da nossa coorte de gestações e da nossa experiência como centro de referência no seguimento e tratamento destas pacientes.

## Capítulo X – Referências Bibliográficas

---

1. Gaucher PCE. De l'épithélioma primitif de la rate, hypertrophie idiopathique de la rate sans leucémie. *MD Thesis* (1882).
2. Mandlebaum, B. Y. F. S. Pathology of Primary Splenomegaly. *J. Exp. Med.* XVI, 797–821 (1912).
3. Rosenberg, A. & Chargaff, E. A reinvestigation of the cerebroside deposited in Gaucher's disease. *J. Biol. Chem.* 233, 1323–1326 (1958).
4. Franco, S. Neurological syndrome in children affected by Gaucher ' s disease; acute malignant form . *Harefuah (Tel Aviv)* 52, 46–52 (1945).
5. Moore M Jr. Skeletal manifestations of Gaucher's disease. *Memphis Med. J* 21, 132–136 (1946).
6. Fienberg, R. & Quigley, GE. Osseous Gaucher's disease with macrocytic normochromic anemia; report of a case. *N. Engl. J. Med.* 234, 527–530 (1946).
7. Moore, Jr. & Coley, BL. Bone lesions in Gaucher's disease. *J. Tennessee State Med. Assoc.* 40, 101–106 (1947).
8. Arkin, AM. & Schein, AJ. Aseptic necrosis in Gaucher's disease. *J. Bone Joint Surg. Am.* 30, 631–641 (1948).
9. Block, M. & Jacobson, L. O. The histogenesis and diagnosis of the osseous type of Gaucher's disease. *Acta Haematol.* 1, 165–177 (1948).
10. Gerken, H., E. G. & Wiedemann, H. Inheritance in Gaucher's Disease. *Br Med J.* 2, 1594 (1964).
11. Brady, O., Kanfer, J. & Shapiro, D. The Metabolism of Glucocerebrosides. *J. Biol. Chem.* 240, 39–43 (1965).
12. Brady, R. O., Kanfer, J. N. & Shapiro, D. Metabolism of glucocerebrosides II. Evidence of an enzymatic deficiency in Gaucher's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 18, 221–225 (1965).
13. Ockerman, P. Identity of fl-glucosidase, fl-xylosidase and one of the fi-galactosidase activities in human liver when assayed with 4-methylumbelli ferul-fl-d-glycosides studies in cases of Gaucher's disease. *Biochim.*

- Biophys. Acta* 165, 59–62 (1968).
14. Beutler, E. & Kuhl, W. Detection of the defect of Gaucher's disease and its carriers state in peripheral-blood leucocytes. *Lancet* 21, 612–613 (1970).
  15. Beutler, E., Kuhl, W., Trinidad, F., Teplitz, R. & Nadler, H. Beta-glucosidase activity in fibroblasts from homozygotes and heterozygotes for Gaucher's disease. *Am. J. Hum. Genet.* 23, 62–6 (1971).
  16. Snapper I. Medical Clinics on Bone Diseases. *Interscience* 174 (1943).
  17. Groth, C. G. *et al.* Splenic Transplantation in a Case of Gaucher'S Disease. *Lancet* 297, 1260–1264 (1971).
  18. Enzyme Transplants. *Lancet* 1235–1236 (1972).
  19. Brady, R. O., Pentchev, P. G., Gal, A. E., Hibbert, S. R. & Dekaban, A. S. Replacement Therapy for Inherited Enzyme Deficiency: Use of Purified Glucocerebrosidase in Gaucher's Disease. *N. Engl. J. Med.* 291, 989–993 (1974).
  20. Lachmann, R. H. Treating Lysosomal Storage Disorders: What Have We Learnt? *J. Inherit. Metab. Dis.* 1–8 (2019). doi:10.1002/jimd.12131
  21. Hughes, D. *et al.* Gaucher Disease in Bone: From Pathophysiology to Practice. *J. Bone Miner. Res.* 00, 1–18 (2019).
  22. Meikle, P., Hopwood, J., Clague, A. & Carey, W. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA* 281, 249 – 54 (1999).
  23. Grabowski, G. A. Phenotype, diagnosis, and treatment of Gaucher's disease. *Lancet* 372, 1263–1271 (2008).
  24. Sobreira, E., Pires, R. F., Cizmarik, M. & Grabowski, G. A. 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 (2007).
  25. Picon, P. D., Gadelha, M. I. P. & Alexandre, R. F. Doença de Gaucher. *Protoc. clínicos e diretrizes Ter. Secr. Atenção à Saúde - Brasília Ministério da Saúde* 2, 159–194 (2014).
  26. Wheeler, S. & Sillence, D. J. Mechanisms of Gaucher disease pathogenesis. *Ann. Transl. Med.* 3, 1–3 (2015).
  27. Voet, D., Voet, J. & Pratt, V. *Fundamentals of biochemistry upgrade.* (2002).
  28. Allen, M. J., Khokher, a M., Rushton, N. & Cox, T. M. Pro-inflammatory

- cytokis and the pathogenesis of Gaucher's disease: increased release of interleukin-6 and interleukin-10. *Q J Med* 90, 19–25 (1997).
29. Gal, A. E., Pentchev, P. G., Barranger, J. A., Dambrosia, J. M. & Brady, R. O. The distribution of glucocerebroside in the liver of patients with Gaucher's disease. *Anal. Biochem.* 95, 127–132 (1979).
  30. Ron, I. & Horowitz, M. ER retention and degradation as the molecular basis underlying Gaucher disease heterogeneity. *Hum. Mol. Genet.* 14, 2387–2398 (2005).
  31. Pelled, D. *et al.* Enhanced calcium release in the acute neuronopathic form of Gaucher disease. *Neurobiol. Dis.* 18, 83–88 (2005).
  32. Deganuto, M. *et al.* Altered intracellular redox status in Gaucher disease fibroblasts and impairment of adaptive response against oxidative stress. *J. Cell. Physiol.* 212, 223–235 (2007).
  33. Mizukami, H. *et al.* Systemic inflammation in glucocerebrosidase-deficient mice with minimal glucosylceramide storage. *J. Clin. Invest.* 109, 1215–1221 (2002).
  34. Vairo, F. *et al.* KIR genes and HLA class I ligands in Gaucher disease. *Gene* 516, 53–57 (2013).
  35. Mikosch, P. & Hughes, D. An overview on bone manifestations in Gaucher disease. *Wiener Medizinische Wochenschrift* 160, 609–624 (2010).
  36. Ginns, E. I. *et al.* Gene mapping and leader polypeptide sequence of human glucocerebrosidase: Implications for Gaucher disease. *Proc. natl. Acad. Sci.* 82, 7101–7105 (1985).
  37. Horowitz, M. *et al.* The human glucocerebrosidase gene and pseudogene: Structure and evolution. *Genomics* 4, 87–96 (1989).
  38. Human Gene Mutation Database. Available at: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=GBA>. Date of Access: August 2<sup>nd</sup>, 2019.
  39. Basgalupp, S. P. *et al.* Use of a multiplex ligation-dependent probe amplification method for the detection of deletions/duplications in the GBA1 gene in Gaucher disease patients. *Blood Cells, Mol. Dis.* 68, 17–20 (2018).
  40. Sidransky, E. Gaucher disease: complexity in a 'simple' disorder. *Mol.*

- Genet. Metab.* 92, 14–15 (2007).
41. Saudubray, J., Baumgartner, M. & Walter, J. *Inborn metabolic diseases. Archives de Pédiatrie* 4, (2016).
  42. Sidransky, E. Gaucher disease: Complexity in a 'simple' disorder. *Mol. Genet. Metab.* 83, 6–15 (2004).
  43. Weiss, K. *et al.* The Clinical Management of Type 2 Gaucher Disease Karin. *Mol Genet Metab.* 114, 110–122 (2015).
  44. Deegan, P. B. *et al.* Osseous manifestations of adult gaucher disease in the era of enzyme replacement therapy. *Medicine (Baltimore)*. 90, 52–60 (2011).
  45. Giraldo P, V, S. *et al.* Quality of life related to type 1 Gaucher disease: Spanish experience. *Qual Life Res.* 14, 453–62 (2005).
  46. Hughes, D. *et al.* Gaucher Disease in Bone: From Pathophysiology to Practice. *J. Bone Miner. Res.* 34, 996–1013 (2019).
  47. Campeau, P. M. *et al.* Characterization of Gaucher disease bone marrow mesenchymal stromal cells reveals an altered inflammatory secretome. *Blood* 114, 3181–3190 (2009).
  48. Limgala, R. P. *et al.* Time of Initiating Enzyme Replacement Therapy Affects Immune Abnormalities and Disease Severity in Patients with Gaucher Disease. *PLoS One* 11, 1–16 (2016).
  49. Cox, T. M., Rosenbloom, B. E. & Barker, R. A. Gaucher disease and comorbidities: B-cell malignancy and parkinsonism. *Am. J. Hematol.* 90, S25–S28 (2015).
  50. Sidransky, E. & Lopez, G. The link between the GBA gene and parkinsonism. *Lancet Neurol* 11, 986–998 (2014).
  51. Goker-Alpan, O. *et al.* Parkinsonism among Gaucher disease carriers. *J. Med. Genet.* 41, 937–940 (2004).
  52. Colombo, R. Age Estimate of the N370S Mutation Causing Gaucher Disease in Ashkenazi Jews and European Populations: A Reappraisal of Haplotype Data. *Am. J. Hum. Genet.* 66, 692–697 (2000).
  53. Koprivica, V. *et al.* Analysis and Classification of 304 Mutant Alleles in Patients with Type 1 and Type 3 Gaucher Disease. *Am. J. Hum. Genet.* 66, 1777–1786 (2000).

54. Barton, N. W. *et al.* Replacement Therapy for Inherited Enzyme Deficiency - Macrophage-targeted glucocerebrosidase for Gaucher disease. *N. Engl. J. Med.* 324, 1464–1470 (1991).
55. Grabowski, G. A. *et al.* Enzyme therapy in type 1 Gaucher disease: Comparative efficacy of mannose- terminated glucocerebrosidase from natural and recombinant sources. *Ann. Intern. Med.* 122, 33–39 (1995).
56. Zimran, A. *et al.* Replacement therapy with imiglucerase for type 1 Gaucher's disease. *Lancet* 345, 1479–1480 (1995).
57. Aviezer, D. *et al.* A plant-derived recombinant human glucocerebrosidase enzyme - A preclinical and phase I investigation. *PLoS One* 4, 4792 (2009).
58. Genzyme Corporation. Cerazyme: Imiglucerase (bula de medicamento).
59. Shire Human Genetics Therapies Inc. VPRIV: alfavelaglicerase (bula de medicamento).
60. Biotherapeutics, P. UPLYSO: alfataliglicerase (bula de medicamento).
61. Zimran, A. *et al.* Pivotal trial with plant cell-expressed recombinant glucocerebrosidase, taliglucerase alfa, a novel enzyme replacement therapy for Gaucher disease. *Blood* 118, 5767–5773 (2011).
62. Starzyk, K., Richards, S., Yee, J., Smith, S. E. & Kingma, W. The long-term international safety experience of imiglucerase therapy for Gaucher disease. *Mol. Genet. Metab.* 90, 157–163 (2007).
63. Zimran, A. *et al.* Seven-year safety and efficacy with velaglucerase alfa for treatment-naïve adult patients with type 1 Gaucher disease. *Am. J. Hematol.* 90, 577–583 (2015).
64. Cox, T. M. Recommendations for treating patients with Gaucher disease with emerging enzyme products. *Blood Cells, Mol. Dis.* 44, 84–85 (2010).
65. Hollak, C. E. M. *et al.* Force Majeure: Therapeutic measures in response to restricted supply of imiglucerase (Cerezyme) for patients with Gaucher disease. *Blood Cells, Mol. Dis.* 44, 41–47 (2010).
66. Pastores, G. M. *et al.* A Phase 3, multicenter, open-label, switchover trial to assess the safety and efficacy of taliglucerase alfa, a plant cell-expressed recombinant human glucocerebrosidase, in adult and pediatric patients with Gaucher disease previously treated with imigluc. *Blood Cells, Mol. Dis.* 53,

- 253–260 (2014).
67. van Dussen, L. *et al.* Taliglucerase alfa leads to favorable bone marrow responses in patients with type I Gaucher disease. *Blood Cells, Mol. Dis.* 50, 206–211 (2013).
  68. Zimran, A. *et al.* Improvement in bone marrow infiltration in patients with type I Gaucher disease treated with taliglucerase alfa. *J. Inherit. Metab. Dis.* 41, 1259–1265 (2018).
  69. Zimran, A. *et al.* Long-term efficacy and safety results of taliglucerase alfa through 5years in adult treatment-naïve patients with Gaucher disease. *Blood Cells, Mol. Dis.* 78, 14–21 (2019).
  70. Cravo, R. *et al.* Taliglucerase alfa in Gaucher disease: Description of a Brazilian experience. *Blood Cells, Mol. Dis.* 68, 160–162 (2018).
  71. Elstein, D. *et al.* Outcome of pregnancies in women receiving velaglucerase alfa for gaucher disease. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 40, 968–975 (2014).
  72. Zimran, A. *et al.* The female Gaucher patient: The impact of enzyme replacement therapy around key reproductive events (menstruation, pregnancy and menopause). *Blood Cells, Mol. Dis.* 43, 264–288 (2009).
  73. Granovsky-Grisaru, S. *et al.* The management of pregnancy in Gaucher disease. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 156, 3–8 (2011).
  74. Lau, H. *et al.* Reported outcomes of 453 pregnancies in patients with Gaucher disease: An analysis from the Gaucher outcome survey. *Blood Cells, Mol. Dis.* 68, 226–231 (2018).
  75. Sekijima, Y., Ohashi, T., Ohira, S., Kosho, T. & Fukushima, Y. Successful pregnancy and lactation outcome in a patient with Gaucher disease receiving enzyme replacement therapy, and the subsequent distribution and excretion of imiglucerase in human breast milk. *Clin. Ther.* 32, 2048–2052 (2010).
  76. Dornelles, A. D. *et al.* Breastfeeding in gaucher disease: Is enzyme replacement therapy safe? *Clin. Ther.* 36, 990–991 (2014).
  77. Pastores, G. M. & Barnett, N. L. Substrate reduction therapy: miglustat as a remedy for symptomatic patients with Gaucher disease type 1. *Expert Opin. Investig. Drugs* 12, 273–281 (2003).



78. Cox, T. *et al.* Novel oral treatment of Gaucher's disease with N-butyldeoxynojirimycin (OGT 918) to decrease substrate biosynthesis. *Lancet* 355, 1481–1485 (2000).
79. Amiri, M. & Naim, H. Y. Miglustat-induced intestinal carbohydrate malabsorption is due to the inhibition of alpha-glucosidases, but not beta-galactosidases. *J Inherit Metab Dis* 35, 949–954 (2012).
80. Hollak, C. E. M., Hughes, D., Schaik, I. N. van, Schwierin, B. & Bembi, B. Miglustat (Zavesca) in type 1 Gaucher disease: 5-year results of a post-authorisation safety surveillance programme. *Pharmacoepidemiol. Drug Saf.* 18, 770–777 (2009).
81. Revel-Vilk, S., Szer, J., Mehta, A. & Zimran, A. How we manage Gaucher Disease in the era of choices. *Br. J. Haematol.* 182, 467–480 (2018).
82. Poole, R. M. Eliglustat: First global approval. *Drugs* 74, 1829–1836 (2014).
83. Mistry, P. K. *et al.* Gaucher Disease: Progress and Ongoing Challenges HHS Public Access. *Mol Genet Metab* 120, 8–21 (2017).
84. Maegawa, G. H. B. *et al.* Identification and characterization of ambroxol as an enzyme enhancement agent for Gaucher disease. *J. Biol. Chem.* 284, 23502–23516 (2009).
85. Luan, Z. *et al.* The chaperone activity and toxicity of ambroxol on Gaucher cells and normal mice. *Brain Dev.* 35, 317–322 (2013).
86. Babajani, G., Tropak, M., Mahuran, D. & Kermode, A. Pharmacological chaperones facilitate the post-ER transport of recombinant N370S mutant beta-glucocerebrosidase in plant cells: evidence that N370S is a folding mutant. *Mol. Genet. Metab.* 106, 323–329 (2012).
87. Bendikov-Bar, I., Maor, G., Filocamo, M. & Horowitz, M. Ambroxol as a pharmacological chaperone for mutant glucocerebrosidase. *Blood Cells. Mol. Dis.* 50, 141–145 (2013).
88. Narita, A. *et al.* Ambroxol chaperone therapy for neuronopathic Gaucher disease: A pilot study. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 3, 200–215 (2016).
89. Fink, J., Correll, P., Perry, L., Brady, R. & Karlsson, S. Correction of glucocerebrosidase deficiency after retroviral-mediated gene transfer into hematopoietic progenitor cells from patients with Gaucher disease. *Proc.*

- Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 2334–2338 (1990).
90. Dunbar, C. *et al.* Retroviral transfer of the glucocerebrosidase gene into CD34+ cells from patients with Gaucher disease: in vivo detection of transduced cells without myeloablation. *Hum Gene Ther* 9, 2629–2640 (1998).
  91. Du, S. *et al.* Delivery of Glucosylceramidase Beta Gene Using AAV9 Vector Therapy as a Treatment Strategy in Mouse Models of Gaucher Disease. *Hum. Gene Ther.* 30, 155–167 (2019).
  92. Pastores, G. M. *et al.* Therapeutic goals in the treatment of gaucher Disease. *Semin. Hematol.* 41, 4–14 (2004).
  93. Zimran, A. *et al.* Phase1/2 and extension study of velaglucerase alfa replacement therapy in adults with type 1 Gaucher disease: 48-month experience. *Blood* 115, 4651–4656 (2010).
  94. Elstein, D., Haims, A. H., Zahrieh, D., Cohn, G. M. & Zimran, A. Impact of velaglucerase alfa on bone marrow burden score in adult patients with type 1 Gaucher disease: 7-Year follow-up. *Blood Cells, Mol. Dis.* 53, 56–60 (2014).
  95. Biegstraaten, M. *et al.* Management goals for type 1 Gaucher disease: An expert consensus document from the European working group on Gaucher disease. *Blood Cells, Mol. Dis.* 68, 203–208 (2018).
  96. Maas, M. *et al.* Quantification of Bone Involvement in Gaucher Disease: MR Imaging Bone Marrow Burden Score as an Alternative to Dixon Quantitative Chemical Shift MR Imaging—Initial Experience. *Radiology* 229, 554–561 (2003).
  97. Poll, L. W., Willers, R., Häussinger, D., Mödder, U. & Vom Dahl, S. MRI bone marrow findings in 63 patients with type I gaucher disease. *RoFo Fortschritte auf dem Gebiet der Rontgenstrahlen und der Bildgeb. Verfahren* 182, 979–985 (2010).
  98. Zimran, A. *et al.* Gaucher disease. Clinical, laboratory, radiologic, and genetic features of 53 patients. *Med.* 71, 337–353 (1992).
  99. Weinreb, N. J. *et al.* A validated disease severity scoring system for adults with type 1 Gaucher disease. *Genet. Med.* 12, 44–51 (2010).

100. Kallish, S. & Kaplan, P. A disease severity scoring system for children with type 1 Gaucher disease. *Eur. J. Pediatr.* 172, 39–43 (2013).
101. Davies, E. H., Surtees, R., DeVile, C., Schoon, I. & Vellodi, A. A severity scoring tool to assess the neurological features of neuronopathic Gaucher disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* 30, 768–782 (2007).
102. Wismer, G. L., Rosen, B. R., Buxton, R., Stark, D. D. & Brady, T. J. Chemical shift imaging of bone marrow: Preliminary experience. *Am. J. Roentgenol.* 145, 1031–1037 (1985).
103. Dixon, T. W. Dixon simple proton spectroscopic imaging. *Radiology* 153, 189–194 (1984).
104. Rosenthal, D. I. *et al.* Evaluation of Gaucher disease using magnetic resonance imaging. *J. Bone Jt. Surg. - Ser. A* 68, 802–808 (1986).
105. Rosenthal, I. *et al.* Quantitative Imaging of Gaucher. *Radiology* 185, 841–845 (1992).
106. Johnson, L. A. *et al.* Quantitative chemical shift imaging of vertebral bone marrow in patients with Gaucher disease. *Radiology* 182, 451–455 (1992).
107. Maas, M. *et al.* Quantification of skeletal involvement in adults with type I Gaucher's disease: Fat fraction measured by Dixon quantitative chemical shift imaging as a valid parameter. *Am. J. Roentgenol.* 179, 961–965 (2002).
108. Maas, M., Poll, L. & Terk, M. R. Imaging and quantifying skeletal involvement in Gaucher disease. *Br. J. Radiol.* 75, 13–24 (2002).
109. Robertson, P. L., Maas, M. & Goldblatt, J. Semiquantitative assessment of skeletal response to enzyme replacement therapy for Gaucher's disease using the bone marrow burden score. *Am. J. Roentgenol.* 188, 1521–1528 (2007).
110. De Fost, M. *et al.* Superior effects of high-dose enzyme replacement therapy in type 1 Gaucher disease on bone marrow involvement and chitotriosidase levels: A 2-center retrospective analysis. *Blood* 108, 830–835 (2006).
111. De Mayo, R. F., Haims, A. H., McRae, M. C., Yang, R. & Mistry, P. K. Correlation of MRI-based bone marrow burden score with genotype and spleen status in Gaucher's disease. *Am. J. Roentgenol.* 191, 115–123 (2008).

112. Fedida, B. *et al.* Bone marrow involvement in Gaucher disease at MRI : what long-term evolution can we expect under enzyme replacement therapy? *Eur. Radiol.* 25, 2969–2975 (2015).

### 11.1 CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO (GPPG 110617)



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

**COMISSÃO CIENTÍFICA E COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

A Comissão Científica e o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CEP/HCPA), que é reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB00000921) analisaram o projeto:

**Projeto:** 110617

**Data da Versão do Projeto:** 28/12/2011

**Data da Versão do TCLE:** 30/12/2011

**Pesquisadores:**

CRISTINA BRINCKMANN OLIVEIRA NETTO

ALICIA DORNELES DORNELLES

TATIELE NALIN

FILIPPO PINTO VAIRO

IDA VANESSA DOEDERLEIN SCHWARTZ

**Título:** Comprometimento ósseo na Doença de Gaucher: avaliação por meio de ressonância magnética de pacientes do Centro de Referência do Rio Grande do Sul

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos, bem como o respectivo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as diretrizes e normas nacionais e internacionais de pesquisa clínica, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

- Os membros da Comissão Científica e do Comitê de Ética em Pesquisa não participaram do processo de avaliação dos projetos nos quais constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente ao CEP/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEP/HCPA.
- Somente poderá ser utilizado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido no qual conste o carimbo de aprovação do CEP/HCPA.

Porto Alegre, 06 de janeiro de 2012.

  
Prof. Nadine Clausell  
Coordenadora GPPG e CEP/HCPA

## 11.2 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO PROJETO (GPPG 110617)

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: Comprometimento ósseo na Doença de Gaucher: avaliação por meio de ressonância magnética de pacientes do Centro de Referência do Rio Grande do Sul

Pesquisador Responsável: Ida Vanessa D. Schwartz, Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre-RS. Tel: 51-33598011.

Paciente: \_\_\_\_\_

Prezado paciente ou responsável,

Gostaríamos de convidá-lo(a) a participar de uma pesquisa que tem por objetivo a obtenção de informações referentes ao comprometimento do sistema esquelético e do sistema nervoso central de pessoas com Doença de Gaucher. Nossa intenção é ajudar a entender porque acontecem certas complicações nessa doença.

Para que estas informações sejam obtidas será necessário que você (paciente) seja submetido à realização de ressonância magnética de crânio, coluna lombar, quadril e fêmur (coxa) que será realizada Serviço de Radiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

O tempo para realização de cada exame junto é em torno de 40 minutos, mas pode demorar um pouco mais. Durante a realização do exame, você ficará deitado, sem se mexer, dentro de uma máquina chamada "aparelho de realização de ressonância magnética". Como não será feita anestesia nem será colocada qualquer substância na sua veia para realização da ressonância, não existe o risco de ocorrência de reação alérgica. Entretanto, você pode se sentir mal por ter sensação de opressão (sensação de sufocação) por estar em uma máquina fechada. Esse desconforto será minimizado pelo acompanhamento por profissional treinado, mas o exame poderá ser interrompido a qualquer momento caso você não consiga ficar o tempo todo dentro da máquina. Se concordar em participar da pesquisa, você terá de realizar três desses exames (ressonância magnética), com intervalo de 12 meses entre cada um deles.

Cabe salientar que esta pesquisa não tem como finalidade imediata uma melhora para os pacientes. Vários centros que cuidam de pessoas com Doença de Gaucher recomendam que os pacientes realizem ressonância de osso a cada 12 meses, a fim de que seja avaliada a quantidade de depósito de células de Gaucher que tem dentro

Comitê de Ética em Pesquisa  
GPPG/HCPA  
VERSÃO APROVADA  
18/09/2012  
MCS/TACBTK/LSOAR

do osso. Dependendo da quantidade de depósito e de como a pessoa está e se sente, o tipo de remédio e as doses utilizadas do remédio para Doença de Gaucher podem ser alteradas. Isto também poderá acontecer no seu caso. O estudo pode ainda contribuir para um melhor entendimento desta doença, o qual, no futuro, pode levar ao desenvolvimento de uma terapia mais efetiva. O prazo máximo estimado para que você receba os resultados dos exames realizados nesta pesquisa é de aproximadamente 3 meses após a realização dos mesmos, mas, se os resultados forem disponibilizados antes desse prazo, eles serão imediatamente informados para você. Você pode optar por não saber o resultado dos testes quando estes estiverem disponíveis.

### **DÚVIDAS**

Se você tiver alguma dúvida em relação à pesquisa, pode contatar o pesquisador responsável por esta pesquisa, no endereço e telefone que constam no início deste Termo de Consentimento. Além disso, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, através do telefone 3359 8304.

### **AUTORIZAÇÃO PARA PERMITIR PESQUISA DOS REGISTROS MÉDICOS**

Você tem direito à privacidade. Os resultados deste estudo poderão ser publicados, mas o seu nome não será revelado. Por meio deste termo, você também autoriza que os pesquisadores envolvidos neste estudo pesquisem os seus registros médicos a fim de obter as informações necessárias para a realização desta pesquisa.

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

Sua participação no estudo é voluntária. Se você decidir não participar do estudo, isto não afetará em nada o seu tratamento no seu hospital. A sua participação pode também ser interrompida a qualquer momento por você mesmo (a). Em qualquer caso, você não será penalizado (a).

Pelo presente termo, você declara que foi informado(a), de forma clara e detalhada, sobre a presente pesquisa, e que teve suas dúvidas esclarecidas por

Comitê de Ética em Pesquisa  
GPPG/HCPA  
**VERSÃO APROVADA**  
AS 109 1202  
Jure AA0617

\_\_\_\_\_. Declara ter sido esclarecido que não receberá nenhuma remuneração financeira ou terá custos relativos à participação no estudo. Declara que foi informado da garantia de receber resposta ou esclarecimento sobre a pesquisa a ser realizada, bem como da liberdade de não participar do estudo e da possibilidade de desistir, em qualquer momento, da participação. Além disso, declara que recebeu cópia deste termo de consentimento.

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

Paciente/assinatura: \_\_\_\_\_

Responsável legal/assinatura: \_\_\_\_\_

Foi explicado a \_\_\_\_\_ os objetivos, riscos, benefícios e procedimentos necessários para esta pesquisa, e entreguei cópia deste termo de consentimento para o mesmo.

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

Nome/assinatura: \_\_\_\_\_

Ass. Serviço em Pesquisa  
GPR-3HCPA  
VERSÃO APROVADA  
18 / 09 / 2012  
Viv 110617



## 11.3 CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO (GPPG 110475)



### HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

#### COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CEP/HCPA), que é reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB00000921) analisou o projeto:

**Projeto:** 110475

**Data da Versão do Projeto:** 27/09/2010

**Versão do Projeto:** 1.0

**Data da Versão do TCLE:** 02/09/2011

**Versão do TCLE:** 1.0

**Pesquisadores:**

IDA VANESSA DOEDERLEIN SCHWARTZ

CRISTINA BRINCKMANN OLIVEIRA NETTO

TATIANE ALVES VIEIRA

TATIELE NALIN

FILIPPO PINTO VAIRO

**Título:** Pesquisa de Resultados na Doença de Gaucher (GOS). Diretriz Global para o GOS

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos, bem como o respectivo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as diretrizes e normas nacionais e internacionais de pesquisa clínica, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

- Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa não participaram do processo de avaliação dos projetos nos quais constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente ao CEP/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEP/HCPA.
- Somente poderá ser utilizado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido no qual conste o carimbo de aprovação do CEP/HCPA.

Porto Alegre, 07 de maio de 2012.

Prof. Nadine Clausell  
Coordenação GPPG e CEP/HCPA

## 11.4 CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO (GPPG 150083)



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

### **COMISSÃO CIENTÍFICA**

A Comissão Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre analisou o projeto:

**Projeto:** 150083

**Data da Versão do Projeto:** 24/02/2015

**Pesquisadores:**

IDA VANESSA DOEDERLEIN SCHWARTZ

FILIPPO PINTO VAIRO

TATIELE NALIN

KAMILA CASTRO GROKOSKI

TACIANE ALEGRA

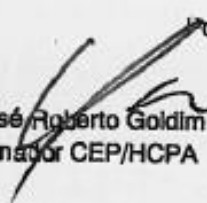
ANA PAULA VANZ

**Título:** Protocolo do Registro Gaucher

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.  
Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG)

Porto Alegre, 26 de março de 2015.

  
Prof. José Roberto Goldim  
Coordenador CEP/HCPA

# 11.5 ARTIGO “SERUM $\beta_2$ -MICROGLOBULIN IS FREQUENTLY ELEVATED IN TYPE 1 GAUCHER PATIENTS”

Molecular Genetics and Metabolism Reports 2 (2015) 38–40



Contents lists available at ScienceDirect

## Molecular Genetics and Metabolism Reports

journal homepage: <http://www.journals.elsevier.com/molecular-genetics-and-metabolism-reports/>



Short Communication

### Serum $\beta_2$ -microglobulin is frequently elevated in type 1 Gaucher patients



Tiago Koppe<sup>a,b</sup>, Filippo Vairo<sup>b,c</sup>, Matheus Camargo<sup>a</sup>, Livia Paskulin<sup>a</sup>,  
Liane Daudt<sup>d,e</sup>, Ida V. Schwartz<sup>b,c,f,g,\*</sup>

<sup>a</sup> School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, Brazil

<sup>b</sup> Postgraduate Program in Genetics and Molecular Biology, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

<sup>c</sup> Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre – HCPA, Porto Alegre, Brazil

<sup>d</sup> Department of Pediatrics and Paediatriculture, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

<sup>e</sup> Clinical Hematology Service, HCPA, Porto Alegre, Brazil

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

<sup>g</sup> BRAIN (Basic Research and Advanced Investigations in Neurosciences) Laboratory, Porto Alegre, Brazil

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 1 September 2014

Received in revised form 28 November 2014

Accepted 28 November 2014

Available online 15 December 2014

##### Keywords:

Serum  $\beta_2$ -microglobulin

Gaucher disease

Multiple myeloma

Chitotriosidase

Biomarkers

#### ABSTRACT

$\beta_2$ -Microglobulin is the major prognostic factor in multiple myeloma, a known comorbidity of Gaucher disease. We evaluated herein serum  $\beta_2$ -microglobulin levels of 31 type 1 Gaucher patients; for 8/31 patients, pre- and post-treatment comparisons were made. Thirteen patients (on treatment = 6) had high levels of  $\beta_2$ -microglobulin, and showed higher chitotriosidase activity and Severity Score Index, and lower concentration of platelets, than patients with normal levels. Levels of  $\beta_2$ -microglobulin correlated with chitotriosidase activity ( $\rho = 0.65$ ;  $p < 0.01$ ), platelets ( $\rho = -0.42$ ;  $p = 0.02$ ) and  $\alpha 1$ - ( $\rho = 0.43$ ;  $p = 0.02$ ) and  $\alpha 2$ -protein bands ( $\rho = -0.40$ ;  $p = 0.03$ ). Regarding pre- and post-treatment values, median  $\beta_2$ -microglobulin levels decreased after treatment (pre- = 2931 ng/mL; post- = 1970 ng/mL;  $p < 0.01$ ). Our data suggest that levels of serum  $\beta_2$ -microglobulin are frequently elevated in type 1 Gaucher patients, correlate with severity of the disease and decrease after treatment.

© 2014 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>).

#### 1. Introduction

Several epidemiological studies have been reporting an increased prevalence of multiple myeloma (MM) in type 1 Gaucher disease (GD) (OMIM #230800). Using the Gaucher Registry database, Rosenbloom et al. [6] found a relative risk of 5.9 [95% CI: 2.8–10.8] for GD patients showing MM. Putative explanation for these observations arises from the hypothesis of chronic stimulation of the immune system by Gaucher cells [8,9]. In fact, individuals with chronic inflammation are susceptible to develop MM as well as several lymphoproliferative disorders and malignancies [5]. There is an intense research field in this regard and a constellation of humoral and cellular surface molecules has been found to be abnormal in GD.

$\beta_2$ -Microglobulin (beta2) is a non-covalently attached-component of class I HLA (human leukocyte antigen) molecules, which is required for the proper functioning of this entire structure on the cell surface [3] and is released on extracellular fluid [1]. Beta2 is the core of the International Staging System for MM [4], being higher levels associated

with higher mortality in these patients. However, apart from the paper by Deibener et al. [2], who described a type 1 GD patient with raised serum levels of beta2 which became normal after 24 months on treatment with Alglucerase (Ceredase®, Genzyme Co, Cambridge, MA, USA), we were not able to find any other study on beta2 and Gaucher disease. We hypothesized that beta2 would be found in higher levels in GD patients and could be used as a marker for the follow-up.

#### 2. Methods

In order to prove such hypothesis we enrolled type 1 GD patients followed at the local Reference Center for GD (Rio Grande do Sul state – Brazil) who had no evidence of malignancy (e.g., MM) in a prospective study. For patients who were receiving any kind of specific treatment for GD at inclusion (enzyme replacement therapy – ERT, or substrate reduction therapy – SRT; group 1) only one measurement of beta2 was performed. For patients receiving no treatment at inclusion (group 2), beta2 levels were evaluated just before the onset of treatment and after a mean of 20 months, or just at inclusion if the patient remained untreated. Beta2 values at inclusion were correlated with age at inclusion, age at onset of treatment, time on treatment, ERT dosage, chitotriosidase activity, Severity Score Index (SSI) [10], hemoglobin, serum ferritin, platelets, immunoglobulins (IgA, IgE, IgG, and IgM), and concentrations of  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta$  and  $\gamma$

\* Corresponding author at: Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre - Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail address: [i.schwartz@hcpa.ufrgs.br](mailto:i.schwartz@hcpa.ufrgs.br) (I.V. Schwartz).

**Table 1**  
Characterization of type 1 Gaucher patients included in the study (n = 31).

	Group 1 (n = 21)		Group 2 (n = 10)	
	On treatment at inclusion	No treatment at inclusion	On treatment at follow-up (n = 8)	
Male:female	9:12	5:5	4:4	
GBA1 genotype				
-N370S/L444P	14	2	2	
-N370S/N370S	3	2	2	
-Other	4	6	4	
Age at inclusion (yrs)	28.7 [19.9–41.2]	39.9 [18.6–57]	43.9 [32.3–57.1]	
Age at onset of treatment (yrs)	16.7 [10.2–32.3]	–	44.4 [37.1–56.1]	
Time on treatment (mo)	108.5 [30–120]	–	20.4 [12–30]	
Type of treatment				
-Miglucerase	21	–	4	
-Taliglucerase alpha	0	–	2	
-Miglustat	0	–	2	
Dosage of ERT (IU/kg/inf)	15 [15–30]	–	15 [15–18.7] (n = 6)	
SSI score	3 [1.5–4.5]	4 [3–5.5]	3 [1–4]	

Values expressed as median [25th–75th percentiles] or absolute count. GD: Gaucher disease; ERT: enzyme replacement therapy; IU: International Unit; inf: infusion; –: not applicable.

proteins (blood serum gel electrophoresis), which were obtained retrospectively through chart review (values considered for analysis were those obtained closest to the beta2 measurement). Patients with high and normal beta2 levels at inclusion were also evaluated to these variables, as well as patients on treatment presenting high and normal beta2 levels.

Statistical analyses were performed on SPSS 18 (IBM®). Pearson chi-square tests were run to compare categorical data. For quantitative data, nonparametric tests were used (Wilcoxon-signed rank and Mann-Whitney tests, and Spearman correlation). Values were expressed as median [25th–75th percentiles] or absolute count. Alpha accepted was 0.05.

### 3. Results

Thirty-one type 1 GD patients (group 1 = 21; group 2 = 10) were included in the study (Table 1). For the whole sample, beta2 level was

2180 ng/mL [1880–2919] (range = 1465–4630). Significant Spearman correlations were observed only between beta2 and chitotriosidase activity ( $p = 0.65$ ;  $p < 0.01$ ;  $n = 31$ ), platelets ( $p = -0.42$ ;  $p = 0.02$ ;  $n = 31$ ), and  $\alpha 1$  ( $p = 0.43$ ;  $p = 0.02$ ;  $n = 29$ ) and  $\alpha 2$  protein bands ( $p = -0.40$ ;  $p = 0.03$ ;  $n = 29$ ) of blood serum gel electrophoresis. We did not find any correlation between beta2 and age at inclusion ( $p = 0.21$ ;  $p = 0.913$ ;  $n = 31$ ) nor differences between sexes (male beta2 median = 2191 ng/mL [1993–2500.5]; female = 2180 ng/mL [1801–3062];  $p = 0.52$ ).

Thirteen patients had beta2 above the reference range (600–2450 ng/mL); they are found to be less frequently on treatment, and to present higher chitotriosidase activity,  $\alpha 1$  concentration and SSI, and lower levels of platelets and  $\alpha 2$ , than patients presenting normal beta 2 (Table 2).

Regarding group 2, eight patients (patients A to H) started to receive treatment soon after the inclusion in the study (Table 1, Fig. 1). For the whole period of treatment, patient A is on miglustat; patients B, D and G,

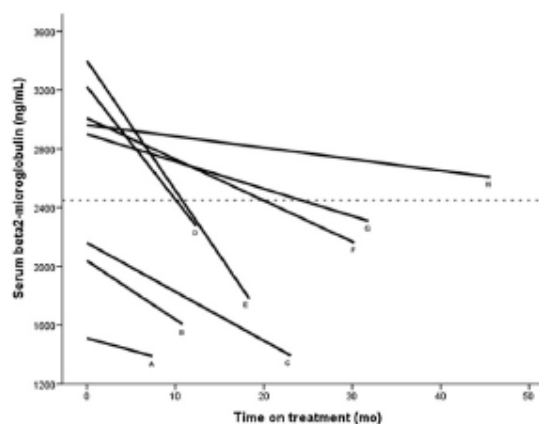
**Table 2**  
Comparison between type 1 Gaucher disease patients with elevated and normal serum  $\beta_2$ -microglobulin at inclusion.

	Elevated (n = 13)	Normal (n = 18)	p-Value
Male:female	5:8	9:9	0.524
Age at inclusion (yrs)	32.5 [18–56.1]	29.4 [20.5–42.6]	0.779
Splenectomy	2	3	0.924
SSI	4 [3–6.5]	2.5 [1–4.2]	0.045*
<b>Patients receiving treatment</b>	6	15	0.029*
-Age at onset of treatment (yrs)	22.8 [7.6–35.4]	14.5 [10.4–34.7]	0.938
-Time on treatment (mo)	74.4 [30–134.4]	108 [26.4–124.8]	0.815
-Dosage of ERT (IU/kg/inf)	17.5 [15–33.8]	15 [15–30]	0.502
<b>Chitotriosidase (nmol/h/mL)</b>	<b>6996 [5130–17,113]</b>	<b>3476 [2075.5–7038.7]</b>	<b>0.004*</b>
Hemoglobin (g/dL)	12.7 [11.5–13.5]	13.3 [12–15]	0.128
<b>Platelets (<math>\times 10^9/\mu\text{L}</math>)</b>	<b>82 [62.5–143.5]</b>	<b>138.5 [111.5–172]</b>	<b>0.031*</b>
Ferritin (ng/mL)	343.3 [207.3–1042.7]	349.7 [167–630.9]	0.401
Polyclonal gammopathy	3	2/16	0.347
Serum immunoglobulins (mg/dL)			
-IgG	1464 [1243–1722]	1262 [953.5–1635.5]	0.186
-IgA	240 [191–375.5]	295.5 [197.7–444]	0.337
-IgE	6.5 [2.8–21.3] (n = 11)	136.5 [33.5–334.7]	0.369
-IgM	244.5 [145–286.7] (n = 12)	162.5 [129.7–224.2] (n = 16)	0.228
Blood serum protein electrophoresis (g/dL)			
-Total protein	7.9 [7.3–8.2]	7.6 [7.3–8]	0.367
-Albumin	4.5 [4.1–4.9]	4.3 [4.1–4.6]	0.677
- $\alpha 1$	<b>0.24 [0.22–0.31]</b>	<b>0.21 [0.16–0.25]</b>	<b>0.031*</b>
- $\alpha 2$	<b>0.66 [0.59–0.76]</b>	<b>0.77 [0.65–0.88]</b>	<b>0.032*</b>
- $\beta$	0.7 [0.63–0.77]	0.76 [0.62–0.84]	0.334
- $\gamma$	1.61 [1.35–1.73]	1.48 [1.01–1.8]	0.525

Values expressed as median [25th–75th percentiles] or absolute count. GD: Gaucher disease; ERT: enzyme replacement therapy; IU: International Unit; inf: infusion. Comparisons made by Pearson chi-square or Mann-Whitney U test.

\* In bold, statistically significant results.





**Fig. 1.** Serum  $\beta_2$ -microglobulin levels in eight type 1 Gaucher disease patients just before and after onset of treatment. Each line represents one patient. Dashed line represents the upper limit of normality (2450 ng/mL). Patients A and F are on miglustat; patients B, D and G are on imiglucerase 15 IU/kg/inf; patient E is on imiglucerase 30 IU/kg/inf; and patients C and H are on taliglucerase alpha 15 IU/kg/inf at follow-up. Patients A to G are treatment-naïve. Patient H has received ERT for a year and had ERT interrupted for 4 months before the inclusion in the study.

on imiglucerase 15 IU/kg/inf; and patient E, on imiglucerase 30 IU/kg/inf. Patient C received imiglucerase 15 IU/kg/inf for 5 months and taliglucerase alpha 15 IU/kg/inf after that. Patient F received imiglucerase 15 IU/kg/inf for 10 months and miglustat after that; patient H received imiglucerase 15 IU/kg/inf for 9 months and taliglucerase alpha 15 IU/kg/inf after that. Patients A to G are treatment-naïve. Patient H has been previously treated for a year and had ERT interrupted for 4 months before the inclusion in the study. Out of the patients who started treatment, five had beta2 levels above the reference range at inclusion and only one at follow-up (Fig. 1). Treatment was associated with a significant reduction of beta2 levels (median levels of beta2 at inclusion = 2931 ng/mL [2068–3169]; median levels of beta2 at follow-up = 1970 ng/mL [1446–2300];  $p < 0.01$ ) (Fig. 1), and improvement of chitotriosidase levels (8302.5 nmol/mL/h [6728.2–11,044.2] vs. 2343 nmol/mL/h [1681.2–5817.7];  $p < 0.02$ ), SSI (4 [3–6.5] vs. 3 [1–3.7];  $p < 0.02$ ), hemoglobin (13.2 g/dL [11.8–13.8] vs. 14.1 g/dL [12.4–14.7];  $p < 0.02$ ), IgE (139 mg/dL [111–273] vs. 70.9 mg/dL [21.9–183.2];  $n = 7$ ,  $p = 0.028$ ) and IgM (266.5 mg/dL [167.2–394.2] vs. 174.5 mg/dL [123.2–306.7];  $p = 0.012$ ).

When we compared all patients on treatment ( $n = 29$ ; group 1 = 21; group 2 = 8), we did not find any difference between the variables analyzed (data not shown).

#### 4. Discussion/conclusions

To the best of our knowledge, this is the first study to report increased levels of beta2 in a cohort of GD patients. Our data is in accordance to that by Deibener et al. [2] and suggests that higher levels of beta2 arise from untreated patients, decrease after a short period of treatment and are associated with improvement of chitotriosidase, SSI,

IgE, IgM and hemoglobin. Therefore, ERT/SRT appears to decrease the chronic antigenic stimulation commonly found in GD. In addition, our data showed that patients with higher beta2 levels had SSI, platelet levels, and chitotriosidase activity worse than patients with normal levels of beta2, which suggests that it may be a biomarker of the severity of the disease.

The moderate positive correlation found between beta2 and chitotriosidase values may reflect increased coexpression of both proteins in macrophages, or the chitotriosidase secreted by macrophages may stimulate other cells at distance, expressing MHC-I molecules, and secondarily increasing beta2. Still,  $\alpha$  serum proteins are a heterogeneous group of proteins secreted by different sources. Therefore, the true meaning of the correlation found between beta2 and these proteins needs to be further studied.

Beta2 may be not only a putative GD biomarker but also it may have potential therapeutic utility, because new therapies have emerged from beta2 targeting. For example, specific antibodies to beta2 have remarkable tumoricidal activity for both solid tumors and blood malignancies with no toxicity to normal cells [7].

However, the correlation of beta2 levels with clinical endpoints of GD, such as the risk to develop MM and mortality, needs to be addressed by further studies, with larger sample sizes and periods of follow-up as well as focusing in specific  $\alpha$  serum proteins and other biomarkers.

#### Acknowledgments

Financial support for this study was provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (RPE/HCPA, Brazil) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil).

#### References

- [1] H. Broome, Plasma cell neoplasms: general considerations, in: MA. Lichtman, T.J. Kipps, U. Seligsohn, K. Kaushansky, J.T. Prchal (Eds.), *Williams Hematology*, 8 ed. McGraw-Hill, New York, NY, 2010 (Retrieved July 20, 2014 from <http://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?bookid=3588&sectionid=3983930>).
- [2] J. Deibener, P. Kaminsky, C. Jachb, B. Douset, M. Klein, M. Duc, Enzyme replacement therapy decreases hypergammaglobulinemia in Gaucher's disease, *Haematologica* 83 (1998) 479–480.
- [3] R.N. Germain, D.H. Margulies, The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation, *Annu. Rev. Immunol.* 11 (1993) 403–450.
- [4] P.R. Greipp, J. San Miguel, B.G. Durie, et al., International staging system for multiple myeloma, *J. Clin. Oncol.* 23 (2005) 3412–3420.
- [5] M.S. Raab, K. Podar, I. Breitkreutz, P.G. Richardson, K.C. Anderson, Multiple myeloma, *Lancet* 374 (2009) 324–339.
- [6] B.E. Rosenbloom, N.J. Weinreb, A. Zimran, K.A. Kacena, J. Charrow, E. Ward, Gaucher disease and cancer incidence: a study from the Gaucher Registry, *Blood* 105 (2005) 4569–4572.
- [7] C. Shi, Y. Zhu, Y. Su, L.W. Chung, T. Cheng, Beta2-microglobulin: emerging as a promising cancer therapeutic target, *Drug Discov. Today* 14 (2009) 25–30.
- [8] Y. Shoenfeld, L.A. Galant, M. Shukla, E. Livni, M. Djaldetti, J. Pinkhas, Gaucher's disease: a disease with chronic stimulation of the immune system, *Arch. Pathol. Lab. Med.* 106 (1982) 388–391.
- [9] F. Vairo, P. Portela, P.H. Salim, et al., Human leukocyte antigens and Gaucher disease, *Blood Cells Mol. Dis.* 50 (2013) 202–205.
- [10] A. Zimran, J. Sorge, E. Gross, M. Kubitz, C. West, E. Beutler, Prediction of severity of Gaucher's disease by identification of mutations at DNA level, *Lancet* 334 (1989) 349–352.

## 11.6 ARTIGO “THE PROGNOSTIC VALUE OF THE SERUM FERRITIN IN A SOUTHERN BRAZILIAN COHORT OF PATIENTS WITH GAUCHER DISEASE”



*Genetics and Molecular Biology*, 39, 1, 30-34 (2016)  
Copyright © 2016, Sociedade Brasileira de Genética. Printed in Brazil  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2015-0125>

Research Article

### The prognostic value of the serum ferritin in a southern Brazilian cohort of patients with Gaucher disease

Tiago Koppe<sup>1,2</sup>; Divair Doneda<sup>3</sup>; Marina Siebert<sup>1,6,7</sup>; Livia Paskulin<sup>1,2</sup>; Matheus Camargo<sup>1</sup>; Kristiane Michelin Tirelli<sup>4</sup>; Filippo Vairo<sup>4</sup>; Liane Daudi<sup>1,5</sup> and Ida Vanessa D. Schwartz<sup>1,2,4,6</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>3</sup> Laboratório de Técnica Dietética, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>4</sup> Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>5</sup> Serviço de Hematologia Clínica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>6</sup> Basic Research and Advanced Investigations in Neurosciences (BRAIN) Laboratory, Hospital de Clínicas (HCPA), Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>7</sup> Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (UAMP), Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brazil.

#### Abstract

The clinical utility of serum ferritin as a biomarker of disease severity and prognosis in Gaucher disease (GD) is still debated. Here, we aimed to evaluate ferritin and its relation to clinicolaboratory parameters of GD patients seen at the Reference Center for Gaucher Disease of Rio Grande do Sul, Brazil, so as to gather evidence on the utility of ferritin as a biomarker of this condition. A retrospective chart review was performed collecting pre- and post-treatment data from GD patients. Eighteen patients with ferritin levels available before and after treatment were included in the study. Nine of these participants were males, and seventeen had type I GD. All patients were given either enzyme replacement ( $n = 16$ ) or substrate reduction therapy ( $n = 2$ ), and ferritin was found to decrease from 756 [318-1441] ng/mL at baseline to 521 [227-626] ng/mL ( $p = 0.025$ ) after 28.8 months of treatment. Serum ferritin levels did not correlate with measures of disease severity, but showed an association with age at onset of treatment ( $p = 0.880$ ;  $n = 18$ ;  $p < 0.001$ ). In conclusion, although serum ferritin did not correlate with disease severity, after a median 28.8 months of treatment, clinical outcomes had clearly improved, and ferritin levels had decreased.

**Keywords:** ferritin, biomarkers, Gaucher disease, iron metabolism.

Received: May 17, 2015; Accepted: September 28, 2015.

#### Introduction

Gaucher disease (GD) (OMIM #230800) is a metabolic disorder caused by a deficiency in lysosomal glucocerebrosidase activity (EC 3.2.1.45) due to mutations in the *GBA1* gene (Grabowski *et al.*, 2014). The worldwide prevalence of GD is about 1:40,000-200,000 (Poorthuis *et al.*, 1999; Pinto *et al.*, 2004), and its clinical manifestations include multisystem organomegaly, pancytopenia and bone complications (Pastores and Hughes, 2000; Grabowski *et al.*, 2014).

Although the mechanisms by which *GBA1* gene mutations influence GD phenotype remain largely unknown, the main pathogenesis of this disorder is believed to be the lysosomal accumulation of glucocerebroside in mononuclear phagocytes. This process triggers the expression of cytokines and other inflammatory molecules which, in turn, engage other immune cells and ultimately lead to a systemic immune response (Barak *et al.*, 1999; Cox, 2001; Boven *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2012; Pandey and Grabowski, 2013; Vairo *et al.*, 2013; Thomas *et al.*, 2014). Several circulating molecules thought to be secreted by these lipid-laden macrophages have been studied as biological markers of disease burden and/or response to enzyme replacement therapy (ERT) (Aerts *et al.*, 2005; Cox, 2006). In this re-

Send correspondence to Ida V. Doederlein Schwartz, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, Bairro Rio Branco, 90035-903 Porto Alegre, RS, E-mail: [ischwartz@hcpa.ufrgs.br](mailto:ischwartz@hcpa.ufrgs.br).



gard, although lyso-Gb1 has recently emerged as a promising specific biomarker of GD (Fuller *et al.*, 2015), the most frequent and consistently altered molecules in GD have been found to be the following: chitotriosidase (EC 3.2.1.14), angiotensin converting enzyme (EC 3.4.15.1), CCL18 (P55774), tartarate-resistant acid phosphatase (EC3.1.3.2) and serum ferritin (SF) (P02792 and P02794) (Aronson, 2005; Boot *et al.*, 2009; Hughes and Pastores, 2013; Thomas *et al.*, 2013, 2014). Over the past few years, several studies have described hyperferritinemia in GD patients and demonstrated its reduction after the initiation of treatment. The first study to report hyperferritinemia over the course of GD was published by Morgan *et al.* (1983), and since then these findings have been replicated in different cohorts worldwide (Poll *et al.*, 2002; Grosbois *et al.*, 2009; Saadi *et al.*, 2010; Stein *et al.*, 2010; Stirnemann *et al.*, 2010; Stirnemann *et al.*, 2011; Mekinian *et al.*, 2012). The reduction in SF exhibited by patients with GD undergoing ERT could be indicative of a positive clinical outcome (Stirnemann *et al.*, 2010; Vigan *et al.*, 2014), although no studies to date have identified a clear association between SF levels and GD severity. In Brazilian patients, these findings have yet to be replicated. As such, the aim of this study was to evaluate the clinical use of SF as a biomarker of GD severity and/or response to treatment in a Brazilian cohort of GD patients.

## Material and Methods

A retrospective chart review of patients with GD treated at the GD Reference Center of Rio Grande do Sul, Brazil, was performed. An extensive database of patients with GD was analyzed, and all those who had at least two measurements of SF levels - one before and the other after the onset of GD therapy (*i.e.*, ERT or substrate reduction therapy - SRT) - were included in the study.

Pre-treatment SF levels were defined as the most recent measurements available in the database prior to the onset of treatment, and post-treatment SF was evaluated based on the most recent measurement available for each patient in the dataset. Hyperferritinemia was defined as SF > 322 ng/mL in males and > 291 ng/mL in females. All other variables were matched to SF levels by date to determine their status as pre- or post-treatment measures. In the referral center, the diagnosis of GD is confirmed in all cases by reduced glucocerebrosidase activity (*i.e.*, < 10% of normal) in leukocytes. All patients received standard care, and had their clinical history, physical examinations, lab tests and medical imaging results recorded during routine medical assessments.

Asthenia, abdominal pain, bone involvement, bleeding, splenomegaly and hepatomegaly were evaluated based on clinical assessments or ancillary tests recommended by current guidelines. SSI (Severity Score Index) was calculated on every medical visit as described in Zimran *et al.* (1989). Quantitative variables were expressed as median

[25th-75th percentiles], and categorical variables were displayed as absolute frequencies. Non-parametric tests were used to compare pre- and post-treatment variables and assess treatment effects. Two-tailed Wilcoxon signed-rank tests were used to analyze quantitative variables, while McNemar tests were involved in the evaluation of categorical data. Additionally, Spearman correlation analyses were carried out to assess the relationship between quantitative variables and SF. All tests were performed using SPSS 18 (IBM®) and statistical significance was considered when  $p < 0.05$ .

This study was approved by the Research Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

## Results

Eighteen patients with a diagnosis of GD met inclusion criteria for this study (male = 9, females = 9; GD type I = 17; GD type III = 1). Eleven patients had a N370S/L444P genotype, three were N370S/N370S, two were N370S/RecNcil, one was E349K/S366N and one, L444P/L444P. Median age at diagnosis and treatment onset was 39.5 years [15.7-51.2] and 41.1 years [24.6-52.9], respectively. Three patients had undergone splenectomy, one had cirrhosis and none had hepatocellular carcinoma. Patients had no history of blood transfusions, although three female patients received a short course of iron supplementation over the follow-up and were excluded from the analysis of serum iron levels and transferrin saturation. At inclusion, sixteen patients were on ERT (velaglucerase alpha = 1; taliglucerase alpha = 2; imiglucerase = 13), and received a mean dosage of  $21.56 \pm 12.21$  U/kg/inf every 2 weeks. Additionally, two patients were receiving SRT (eliglustat = 1; miglustat = 1). None of the 18 participants had any other biochemical evidence of iron overload, such as high transferrin saturation.

A consistent effect of therapy was observed in comparison between pre- and post-treatment clinical and laboratory data (Table 1). Treatment was also associated with a significant reduction in SF levels (Table 1). Prior to treatment, 14 patients (77.8%; 9/9 males and 5/9 females) exhibited hyperferritinemia, including all three splenectomized patients. All females without hyperferritinemia were younger than 29 years. In the post-treatment period, 12 patients (66.7%; 7/9 males and 5/9 females) presented hyperferritinemia, including all three splenectomized patients. The subgroup of the hyperferritinemic patients that normalized SF and the subgroup that did not normalize did not differ regarding all the other analyzed variables (data not shown). Correlations between SF and hemoglobin, platelets, alanine aminotransferase, lactate dehydrogenase, chitotriosidase, and SSI were not statistically significant (data not shown). However, pre-treatment SF levels were associated with age at onset of the treatment ( $\rho = 0.880$ ;  $n =$

Table 1 - Hyperferritinemia in patients with Gaucher disease: pre- and post-treatment data.

	Pre-treatment (n = 18)	Post-treatment (n = 18)	p
<b>Clinical findings:</b>			
- Abdominal pain	11	5	0.070
- Bleeding*	10	2	<b>0.008</b>
- Bone involvement <sup>1</sup>	14	12	0.500
- Splenomegaly <sup>2</sup>	14/n = 15	11/n = 15	0.250
- Hepatomegaly	11	6	0.125
- BMI <sup>3</sup> (kg/m <sup>2</sup> )	23.8 [20.9-27.7]	24.6 [21.6-28.1]	0.170
Hemoglobin* (g/dL)	12.6 [10.1-13.9]	14 [11.6-15]	<b>0.005</b>
Leukocytes (x103/ $\mu$ L)*	4.15 [2.93-6.8]	4.9 [4.5-7]	<b>0.050</b>
Platelets* (x103/ $\mu$ L)	79 [63.7-146.7]	145.5 [116-171]	<b>0.002</b>
ALT (IU/L)	22.5 [15-35.7]	27 [18-43]/n = 17	0.093
LDH (IU/L)	317 [246-360]/n = 15	296 [238-368]/n = 17	0.778
Chitotriosidase* (x103 nmol/h/mL)	14 [7.9-14.7]	3.7 [1.7-5.5]	<b>0.002</b>
SSI <sup>4</sup> *	7 [4-12]/n = 15	2 [1-5.5]/n = 17	<b>0.001</b>
BMB score <sup>5</sup>	8.5 [4.5-12]/n = 14	7 [4.25-10]/n = 12	0.180
<b>Serum ferritin (ng/mL)*</b>			
- Total*	756 [318-1441]	521 [227-626]	<b>0.025</b>
- Male*	811 [614-1544]/n = 9	528 [369-653]/n = 9	<b>0.038</b>
- Female	328 [190-1174]/n = 9	362 [123-624]/n = 9	0.374
Transferrin saturation (%)	19 [14-32]/n = 8	28 [23-34]/n = 13	0.138
Serum iron ( $\mu$ g/dL)	56 [46-89]/n = 10	91 [72-99]/n = 13	0.176

Values expressed as median [25th-75th percentiles] or absolute count, unless otherwise specified; \* $p < 0.05$  after McNemar or Wilcoxon signed-rank test; Reference values: serum ferritin (males: 22-322 ng/mL and females: 10-291 ng/mL); transferrin saturation (25-50%) and serum iron (50-170  $\mu$ g/dL). <sup>1</sup>Bone involvement was considered whenever patients mentioned pain/pathological fractures without any other attributable cause, or in the presence of imaging evidence of bone disease (e.g., osteopenia on bone densitometry). <sup>2</sup>Three patients had undergone splenectomy. <sup>3</sup>Body Mass Index (Kg/m<sup>2</sup>): < 18.5 – underweight; 18.5-24.9 – normal weight; 25-29.9 – overweight and > 30 – obesity <sup>4</sup>Clinical Severity Score Index: 0-9 – mild; 10-19 – moderate and > 20 – severe. <sup>5</sup>Bone Marrow Burden score: 0-4 – mild; 5-8 – moderate and 9-16 – severe.

18;  $p < 0.001$ ) and Body Mass Index (BMI) ( $p = 0.713$ ;  $n = 14$ ;  $p < 0.005$ ).

## Discussion

This study aimed to investigate the clinical use of SF as a biomarker of disease severity and/or response to treatment in GD. Our results showed that hyperferritinemia is a common occurrence in GD, especially in untreated, older male patients with a higher BMI. Our results are also in agreement with findings obtained both from general and GD populations. SF levels are known to be influenced by sex and age, so that reference values differ by age and gender, in addition to population characteristics, such as ethnicity and presence of other medical comorbidities (Luxton *et al.*, 1977; Vicente *et al.*, 1990; Custer *et al.*, 1995; Koziol *et al.*, 2001; Pan and Jackson, 2008; Ferraro *et al.*, 2012). Growing evidence has shown that SF is associated with BMI, obesity and insulin resistance, and nonalcoholic fatty liver disease (Guglielmi *et al.*, 2015). In addition, several studies have found that women, regardless of age and pres-

ence of medical comorbidities, always tend to have lower SF values than men. Additionally, premenopausal women have dramatically lower SF levels than postmenopausal females. The peaking of SF levels in menopause has not been associated with transferrin saturation (Koziol *et al.*, 2001), but has been found to be related to hepcidin, the central peptide in iron metabolism regulation, whose levels are very strongly correlated with those of SF (Galesloot *et al.*, 2011). The cutoff for hyperferritinemia varies across contexts. In our sample, only 55% of the women were labeled as hyperferritinemic according to the cutoff points provided by the laboratory where the analyses were performed. However, when the female cutoff values suggested by the American Association for the Study of Liver Diseases (15-150 ng/mL) (Bacon *et al.*, 2011) were applied to the sample, the percentage of females categorized as hyperferritinemic was found to be higher (data not shown).

The magnitude of the increase in SF levels in patients with GD was very similar to that observed in a previous study (median 756 vs. 739 ng/mL, respectively) (Mekinian *et al.*, 2012), but lower than that reported by Stein *et al.*



(2010), who found a 3.7-fold elevation above the upper limit of normality. These differences and similarities may be attributable to mean sample age, which was very similar between the present study and that performed by Mekinian *et al.* (2012), but much lower in our sample than in the participants recruited by Stein *et al.* (2010).

Our data did not support the use of SF as a biomarker of GD severity. Previous studies have shown the same findings, suggesting that SF levels may not be influenced by disease severity *per se*, but by the number of years of disease activity (*i.e.*, older individuals). Low SF is pathognomonic of iron deficiency and can be used to detect this condition with almost 100% specificity. However, high SF levels are not necessarily indicative of iron overload. Therefore, a transferrin saturation cutoff value > 45% has been suggested as a good predictor of iron overload (Gilles, 2013). In inflammatory conditions, such as GD, iron becomes unavailable for erythropoiesis, despite adequate iron storage levels. This phenomenon is called functional iron deficiency and is characteristic of the anemia of chronic disorders. So, hyperferritinemia may exist in the presence or in the absence of iron overload, and recent studies have demonstrated macrophage iron accumulation in anemia of chronic disease (King and Weiss, 2014). In this regard, iron overload in inflammatory cells has also been identified in conditions such as Parkinson's disease, multiple sclerosis and other neurodegenerative disorders using noninvasive imaging methods to quantify iron levels in different tissues (Stoll and Bendszus, 2009; Böttcher *et al.*, 2013; Mehta *et al.*, 2013). The analysis of participant iron profiles showed that transferrin saturation and serum iron levels also appeared to increase after treatment, although this change was not statistically significant in our sample. Since iron deficiency and iron deficiency anemia is far more frequent in the Brazilian population than in people from developed countries and this tendency is reflected in Brazilian GD cohorts (Sobreira *et al.*, 2007), this lack of statistical significance could reflect a poor-iron diet. Nonetheless, taken together these findings may suggest that patients under treatment may have higher concentrations of iron available for erythropoiesis.

In conclusion, SF does not appear to be a useful biomarker of disease severity in GD, but can be used as a biomarker of diagnosis and response to treatment. Treatment also seemed to increase serum iron and transferrin saturation levels, increasing the amount of iron available for erythropoiesis. These findings need to be further evaluated in order to clarify the relation between SF and iron metabolism in GD patients.

## Acknowledgments

Financial support for this study was provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

(FIPE/HCPA), and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, RS, Brazil).

## References

- Aerts JM, Hollak CE, van Broemen M, Maas M, Groener JE and Boot RG (2005) Identification and use of biomarkers in Gaucher disease and other lysosomal storage diseases. *Acta Paediatr Suppl* 2005 94:43-46.
- Aronson JK (2005) Biomarkers and surrogate endpoints. *Br J Clin Pharmacol* 59:491-494.
- Bacon BR, Adams PC, Kowdly KV, Powell LW, Tavill AS and American Association for the Study of Liver Diseases (2011) Diagnosis and management of hemochromatosis: Practice guideline from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* 54:328-343.
- Barak V, Acker M, Nisman B, Kalickman I, Abrahamov A, Zimran A, Yatziv S (1999) Cytokines in Gaucher's disease. *Eur Cytokine Netw* 10:205-210.
- Boot RG, van Breemen MJ, Wegdam W, Sprenger RR, de Jong S, Speijer D, Hollak CE, van Dussen L, Hoefsloot HC, Smilde AK, *et al.* (2009) Gaucher disease: a model disorder for biomarker discovery. *Expert Rev Proteomics* 6:411-419.
- Böttcher T, Rolfs A, Meyer B, Grossmann A, Berg D, Kropp P, Benecke R and Walter U (2013) Clinical, genetic, and brain sonographic features related to Parkinson's disease in Gaucher disease. *J Neuro* 260:2523-2531.
- Boven LA, van Meurs M, Boot RG, Mehta A, Boon L, Aerts JM, Laman JD (2004) Gaucher cells demonstrate a distinct macrophage phenotype and resemble alternatively activated macrophages. *Am J Clin Pathol* 122:359-369.
- Cox TM (2001) Gaucher disease: understanding the molecular pathogenesis of sphingolipidoses. *J Inher Metab Dis* 24 (Suppl 2):106-121.
- Custer EM, Finch CA, Sobel RE and Zettner A (1995) Population norms for serum ferritin. *J Lab Clin Med* 126:88-94.
- Ferraro S, Mozzi R, Panteghini M. (2012) Reevaluating serum ferritin as a marker of body iron stores in the traceability era. *Clin Chem Lab Med* 50:1911-1916.
- Fuller M, Szer J, Stark S and Fletcher JM (2015) Rapid, single-phase extraction of glucosylsphingosine from plasma: a universal screening and monitoring tool. *Clin Chim Acta* 29:6-10.
- Galesloot TE, Vermeulen SH, Geurts-Moespot AJ, Klaver SM, Kroot JJ, van Tienoven D, Wetzels JF, Kiemeneij LA, Sweep FC, den Heijer M and Swinkels DW (2011) Serum hepcidin: reference ranges and biochemical correlates in the general population. *Blood*. 117:e218-225.
- Gilles A (2013) Iron's ups and downs. *Rev Med Brux* 34:328-334.
- Grosbois B, Revest M, Decaux O (2009) Major hyperferritinemia, autoimmune thrombocytopenic purpura and lymphocytic lymphoma in Gaucher disease. *Presse Med* 38:2S56-2S57.
- Guglielmi V, D'Adamo M, Bellia A, Ciotto RT, Federici M, Lauro D and Sbraccia P (2015) Iron status in obesity: an independent association with metabolic parameters and effect of weight loss. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 25:541-547.
- Hughes DA and Pastores GM (2013) Haematological manifestations and complications of Gaucher disease. *Curr Opin Hematol* 20:41-47.
- King RL, and Weiss MJ (2014) Iron-laden macrophage in autoimmune disease. *Blood*. 123:469.

- Kozioł JA, Ho NJ, Felitti VJ and Beutler E (2001) Reference centiles for serum ferritin and percentage of transferrin saturation, with application to mutations of the HFE gene. *Clin Chem* 47:1804-1810.
- Liu J, Halene S, Yang M, Iqbal J, Yang R, Mehal WZ, Chuang WL, Jain D, Yuen T, Sun L, *et al.* (2012) Gaucher disease gene GBA functions in immune regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:10018-10023.
- Luxton AW, Walker WH, Gaudie J, Ali AM and Pelletier C (1977) A radioimmunoassay for serum ferritin. *Clin Chem* 23:683-689.
- Mehta V, Pei W, Yang G, Li S, Swamy E, Boster A, Schmalbrock P and Pitt D (2013) Iron is a sensitive biomarker for inflammation in multiple sclerosis lesions. *PLoS One* 8:e57573.
- Mekinian A, Stirnemann J, Belmatoug N, Heraoui D, Fantin B, Fain O, Charpentier A and Rose C (2012) Ferritinemia during type 1 Gaucher disease: mechanisms and progression under treatment. *Blood Cells Mol Dis* 49:53-57.
- Morgan MA, Hoffbrand AV, Lailich M, Luck W and Knowles S (1983) Serum ferritin concentration in Gaucher's disease. *Br Med J* 286:1864.
- Pan Y and Jackson RT (2008) Insights into the ethnic differences in serum ferritin between black and white US adult men. *Am J Hum Biol* 20:406-416
- Pandey MK and Grabowski GA (2013) Immunological cells and functions in Gaucher disease. *Crit Rev Oncog* 18:197-220.
- Pinto R, Caseiro C, Lemos M, Lopes L, Fontes A, Ribeiro H, Pinto E, Silva E, Rocha S, *et al.* (2004) Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal. *Eur J Hum Genet* 12:87-92.
- Poll LW, Koch JA, Willers R, Aerts H, Scherer A, Häussinger D, Mödder U and vom Dahl S (2002) Correlation of bone marrow response with hematological, biochemical, and visceral responses to enzyme replacement therapy of nonneuropathic (type 1) Gaucher disease in 30 adult patients. *Blood Cells Mol Dis* 28:209-220.
- Poorthuis BJ, Wevers RA, Kleijer WJ, Groener JE, de Jong JG, van Weely S, Niesen-Koning KE, van Diggelen OP (1999) The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. *Hum Genet* 105:151-156.
- Saadi T, Rosenbaum H, Veitsman E, Baruch Y (2010) Gaucher's disease type I: a disease masked by the presence of abnormal laboratory tests common to primary liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 22:1019-1021.
- Sobreira E, Pires RF, Cizmarik M, Grabowski GA (2007). Phenotypic and genotypic heterogeneity in Gaucher disease type I: a comparison between Brazil and the rest of the world. *Mol Genet Metab* 90:81-86.
- Stein P, Yu H, Jain D and Mistry PK (2010) Hyperferritinemia and iron overload in type 1 Gaucher disease. *Am J Hematol* 85:472-476.
- Stirnemann J, Belmatoug N, Vincent C, Fain O, Fantin B and Mentré F (2010) Bone events and evolution of biologic markers in Gaucher disease before and during treatment. *Arthritis Res Ther* 12:R156.
- Stirnemann J, Boutten A, Vincent C, Mekinian A, Heraoui D, Fantin B, Fain O, Mentré F, Belmatoug N (2011) Impact of imiglucerase on the serum glycosylated-ferritin level in Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis* 46:34-38.
- Stoll G and Bendszus M (2009) Imaging of inflammation in the peripheral and central nervous system by magnetic resonance imaging. *Neuroscience* 158:1151-1160.
- Thomas AS, Mehta AB and Hughes DA (2013) Diagnosing Gaucher disease: an on-going need for increased awareness amongst haematologists. *Blood Cells Mol Dis* 50:212-217.
- Thomas AS, Mehta AB and Hughes DA (2014) Gaucher disease: haematological presentations and complications. *Br J Haematol* 165:427-440.
- Vairo F, Portela P, Salim PH, Jobim M, Netto C, Dorneles A, Mittlestadt S, Jobim LF and Schwartz IV (2013) KIR genes and HLA class I ligands in Gaucher disease. *Gene* 516:53-57.
- Vicente C, Porto G and de Sousa M (1990) Method for establishing serum ferritin reference values depending on sex and age. *J Lab Clin Med* 116:779-784.
- Vigan M, Stirnemann J, Caillaud C, Froissart R, Boutten A, Fantin B, Belmatoug N, Mentré F (2014) Modeling changes in biomarkers in Gaucher disease patients receiving enzyme replacement therapy using a pathophysiological model. *Orphanet J Rare Dis* 9:95.
- Zimran A, Sorge J, Gross E, Kubitz M, West C and Beutler E (1989) Prediction of severity of Gaucher's disease by identification of mutations at DNA level. *Lancet* 2:349-352.

## Internet Resources

- Grabowski GA, Petsko GA, Kolodny EH (2014). Gaucher Disease. In: Valle D, Beaudet AL, Vogelstein B, Kinzler KW, Antonarakis SE, Ballabio A, Gibson K and Mitchell G (eds), OMMBID - The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases, <http://ommbid.mhmedical.com/content.aspx?bookid=474&Sectionid=45374148> (accessed August 20, 2014)
- Cox TM (2006) Biomarkers in lysosomal storage diseases. In: Mehta A, Beck M and Sunder-Plassmann G (eds) *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS*. Oxford PharmaGenesis, Oxford, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11586/> (accessed August 20, 2014)
- Pastores GM, and Hughes DA (2000) Gaucher Disease. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, *et al.* (eds), *GeneReviews®*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1269/> (accessed August 10, 2014).

*Associate Editor: Jeremy A. Squire*

License Information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (type CC-BY), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided the original article is properly cited.



11.7 APRESENTAÇÃO ORAL NO CONGRESSO MUNDIAL DE DOENÇAS LISOSSÔMICAS (WORLD 2018)

Basic Research  
Translational Studies  
Clinical Application

14TH ANNUAL  
**WORLD Symposium™**  
February 5-9, 2018

**2018 PROGRAM**

*We're Organizing Research on Lysosomal Diseases*

# **WORLD*Symposium***<sup>™</sup> **2018**

February 5-9, 2018  
Manchester Grand Hyatt  
San Diego, CA, USA

<b>2:30 PM</b>	<b>Simon A. Jones</b> Central Manchester University Hospitals - NHS Foundation Trust Manchester, United Kingdom	Effect of sebelipase alfa on survival to 3 years of age and liver function in infants with rapidly progressive lysosomal acid lipase deficiency: results from two studies
<b>2:45 PM</b>	<b>Break</b>	
<b>3:15 PM</b>	<b>Livia D. Paskulin</b> Universidade Federal do Rio Grande do Sul Porto Alegre, Brazil	Taliglucerase-alpha and Gaucher disease type 1: a five-year follow-up
<b>3:30 PM</b>	<b>David J. Kuter</b> Massachusetts General Hospital Boston, MA, United States	Open-label expanded access study of taliglucerase alfa in patients with Gaucher disease requiring enzyme replacement therapy
<b>3:45 PM</b>	<b>Joel Charrow</b> Northwestern University Feinberg School of Medicine Chicago, IL, United States	Long-term stability in randomized and non-randomized patients in the phase 3 randomized, double-blind EDGE trial of once-versus twice-daily dosing of eliglustat in patients with Gaucher disease type 1
<b>4:00 PM</b>	<b>Heather A. Lau</b> New York University New York, NY, United States	Long-term treatment response based on severity of Gaucher disease type 1 at baseline after 8 years of treatment with oral eliglustat: final efficacy and safety results from a phase 2 clinical trial in treatment-naïve adult patients
<b>4:15 PM</b>	<b>M. Judith Peterschmitt</b> Sanofi Genzyme Cambridge, MA, United States	Evaluation of glucosyl ceramide synthase (GCS) inhibition for GBA-associated Parkinson disease <i>(This session not available for CME credit.)</i>
<b>4:30 PM</b>	<b>Networking Reception in Foyer</b>	