

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Estudo dos mecanismos inflamatórios e de dano oxidativo em pacientes portadores de Niemann-Pick tipo C: Efeito *in vivo* do miglustate e *in vitro* de β -ciclodextrina nanoparticulada, N-Acetilcisteína e Coenzima Q10

TATIANE GRAZIELI HAMMERSCHMIDT

Porto Alegre, 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Estudo dos mecanismos inflamatórios e de dano oxidativo em pacientes portadores de Niemann-Pick tipo C: Efeito *in vivo* do miglustate e *in vitro* de β -ciclodextrina nanoparticulada, N-Acetilcisteína e Coenzima Q10

Tese apresentada por **Tatiane Grazieli Hammerschmidt**
para obtenção do TÍTULO DE DOUTORA em Ciências
Farmacêuticas

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Carmen Regla Vargas

Porto Alegre, 2022

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 26 de agosto 2022, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes membros:

Profa. Dra. Alethéa Gatto Barschak

Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Prof. Dr. Marcelo Dutra Arbo

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Maria Francisca de Lima Magriço Coutinho Reis

Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge - Porto

CIP - Catalogação na Publicação

Hammerschmidt, Tatiane Grazieli
Estudo dos mecanismos inflamatórios e de dano oxidativo em pacientes portadores de Niemann-Pick tipo C: Efeito in vivo do miglustate e in vitro de β -ciclodextrina nanoparticulada, N-Acetilcisteína e Coenzima Q10 / Tatiane Grazieli Hammerschmidt. -- 2022.
196 f.
Orientadora: Carmen Regla Vargas.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Niemann-Pick tipo C. 2. Miglustate. 3. N-Acetilcisteína. 4. Coenzima Q10. 5. Estresse Oxidativo. I. Vargas, Carmen Regla, orient. II. Título.

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

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análises de Metabólitos do Serviço de Genética Médica (LAM/SGM) e na Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (UAMP) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, com a colaboração do Laboratório de Genética Toxicológica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (GENTOX/UFSCPA) e do Departamento de Genética do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA/Porto – Portugal), os quais disponibilizaram os recursos técnicos e de infraestrutura necessários para a realização do mesmo. Este trabalho foi financiado com auxílio da FAPERGS, CNPq, CAPES e da FIPE/HCPA. A autora recebeu bolsa de estudos da CAPES. Agradecemos aos pacientes e seus familiares, assim como o corpo clínico do SGM/HCPA.

À Diana, que me inspira todos os dias a buscar o meu melhor.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, à Faculdade de Farmácia e ao Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, juntamente com seus colaboradores e professores, responsáveis por fornecer todo o suporte para o desenvolvimento desta tese.

À professora Carmen, que me ensinou a ser cientista. Obrigada por me ajudar a trilhar o caminho da pesquisa, por ser esse modelo de profissional competente e por me apoiar durante os mais de 10 anos de trajetória acadêmica, que teve seu começo ainda na iniciação científica.

À minha amiga, Bruna Donida, que me passou o bastão para investigar a doença de Niemann-Pick tipo C e foi como uma mentora durante esses anos de doutorado, espero ter feito um trabalho à altura do teu.

Aos meus colegas e amigos do LABMET Franciele, Gilian, Camila, Marion, e em especial à Jéssica, que dividiu comigo as dores, as angústias e também as alegrias da pós-graduação, obrigada por partilharem conhecimento e serem o ombro amigo nos momentos difíceis.

Aos bolsistas de iniciação científica, Bianca, Vitória e Marco que estavam sempre dispostos a ajudarem no que fosse preciso.

À Angela e à Daniella, do LAM, pelos ensinamentos e amizade.

Aos que passaram pelo grupo de pesquisa Desireé, Alana, Carol Mescka, Camila Vanzin, obrigada por transmitirem vosso conhecimento a diante.

Ao *Lysosomal Storage Diseases Research Group (R&D Unit - Human Genetics Department)* do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge – Porto, em especial às doutoras Sandra Alves e Marisa Encarnação, por me receberem de forma tão sincera e generosa durante minha missão de estudo no exterior.

Às minhas amigas de alma Jacqueline, Marina e Nathalya, obrigada por serem só apoio em todas as horas em que precisei.

À minha amiga de toda a vida Camila, por ter cuidado do meu maior tesouro enquanto eu iniciava esse projeto, não tenho palavras para te agradecer.

À minha amiga Carulina, com quem dividi vários cafés, vinhos e anseios, obrigada
por tanto.

Aos meus pais (Nadir e Luís), serei eternamente grata por todos os sacrifícios feitos
para que eu pudesse estar onde estou hoje. Obrigada pelo apoio incondicional e por
me incentivarem em todas as decisões que tomei.

Aos meus irmãos (Patrícia e Cristian), essa conquista também é de vocês.
Ao amor da minha vida Phellippe e à família que construímos juntos, obrigada por
serem meu porto seguro quando tudo parecia perdido. Amo vocês com todas as
minhas forças.

Ao Universo por ter colocado essas pessoas no meu caminho, gratidão.

“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more, so that we may fear less.”
— **Marie Curie**

APRESENTAÇÃO

A presente tese encontra-se estruturada na forma de capítulos, com encarte de publicações, de acordo com as normas vigentes no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Sendo assim, este exemplar encontra-se dividido da seguinte forma:

- Introdução;
- Objetivos, geral e específicos;
- Capítulo 1 - Artigo científico original publicado: *Cytokine profile and cholesterol levels in patients with Niemann-Pick type c disease presenting neurological symptoms: in vivo effect of miglustat and in vitro effect of N-acetylcysteine and Coenzyme Q10*;
- Capítulo 2 - Artigo científico original submetido: *Evidence of redox imbalance and mitochondrial dysfunction in Niemann-Pick type C 1 patients: in vitro effect of combined therapy with antioxidants and β -cyclodextrin nanoparticles*;
- Capítulo 3 - Artigo científico original submetido: *Plasmatic neurodegeneration markers in Niemann-Pick type C patients: beneficial effects of miglustat treatment*;
- Capítulo 4 - Artigo científico original submetido: *Beneficial in vitro effect of antioxidants on DNA damage in fibroblasts from Niemann-Pick type C patients*;
- Capítulo 5 - Resultados preliminares da análise haplotípica dos pacientes com a doença de Niemann-Pick tipo C;
- Discussão geral;
- Conclusões;
- Referências;
- Anexos.

RESUMO

Niemann-Pick tipo C (NP-C) é uma doença lisossômica de depósito, causada por disfunção nas proteínas NPC1 ou NPC2, responsáveis pelo tráfego de lipídeos intracelular. Alterações genéticas em uma dessas proteínas resulta em acúmulo de colesterol não-esterificado e de glicosfingolipídeos dentro do compartimento endossomal/lisossomal das células de pacientes afetados. Alguns estudos na literatura vêm relacionando o estresse oxidativo e a inflamação à fisiopatologia dessa doença, entretanto, por se tratar de uma doença genética rara, poucos estudos investigam como funcionam esses mecanismos deletérios em pacientes. Além disso, pouco se sabe sobre o efeito do tratamento com miglustate (N-butil-desoxinojirimicina) sobre o estresse oxidativo e inflamação, além da correlação com a melhora no dano neurológico observado nesses pacientes. Considerando que os marcadores de estresse oxidativo e inflamação tem se mostrado alvos importantes em doenças de acúmulo lisossomal e considerando que a NP-C não possui cura e nem tratamento satisfatório, objetivamos analisar esses parâmetros em pacientes durante o tratamento com miglustate com o intuito de melhor compreender a fisiopatologia da doença e futuros alvos terapêuticos. Foram avaliados parâmetros de dano ao DNA, produção de citocinas, estresse oxidativo, assim como marcadores plasmáticos de dano neurológico. Além disso, também foram investigados os efeitos *in vitro* da β -ciclodextrina nanoparticulada (NS β -CD) e dos antioxidantes N-Acetilcisteína (NAC) e Coenzima Q10 (CoQ10), em células de pacientes, no acúmulo de colesterol, nos parâmetros de estresse oxidativo, dano mitocondrial e na produção de citocinas. No primeiro capítulo desta tese encontramos um aumento na produção de citocinas pró e anti-inflamatórias em pacientes NP-C no momento do diagnóstico, bem como um efeito benéfico do miglustat ao diminuir as citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α , nos pacientes NP-C tratados. Já no segundo capítulo mostramos que o estresse oxidativo e nitrativo pode estar a contribuir para a fisiopatologia da NP-C, pois os níveis de lipoperoxidação e os níveis de nitrito e nitrato estavam aumentados nesses pacientes quando comparados a indivíduos saudáveis, assim como o dano ao DNA. As nanopartículas contendo β -CD reduziram o colesterol acumulado nos fibroblastos NP-C. Este resultado foi potencializado pelo uso concomitante das nanopartículas com os antioxidantes NAC e

CoQ10 em comparação com fibroblastos de indivíduos saudáveis. Além disso, tratamentos combinando nanopartículas de β -CD e antioxidantes podem reduzir o estresse oxidativo mitocondrial, demonstrando vantagens em relação ao β -CD livre. No terceiro capítulo verificamos uma redução dos níveis de dois dos marcadores plasmáticos de neurodegeneração avaliados (PAI-1 e PDGF-AA) em pacientes NP-C, além da normalização dos níveis de BDNF, NCAM, PFGF-AB/BB e Catepsina D. Com a análise molecular dos pacientes estudados no capítulo cinco, identificamos quatro variantes patogênicas previamente descritas, bem como um mesmo padrão de SNPs para os 2 pacientes que possuem a mesma variante. Isso nos leva a crer que essa mutação pode ter uma origem comum, visto que esses indivíduos não relacionados apresentam os mesmos polimorfismos. Nos ensaios *in vitro* realizados no quarto capítulo, encontramos um benefício no tratamento com NAC e CoQ10, através da redução do acúmulo de colesterol e da mitigação do dano ao DNA em fibroblastos de pacientes NP-C tratados com estes antioxidantes em comparação aos fibroblastos não tratados. Estas moléculas podem atuar reduzindo ou prevenindo a formação de espécies reativas, protegendo os ácidos nucléicos dos danos oxidativos. Os ensaios *in vitro* demonstraram que há um efeito positivo do tratamento com antioxidantes, apesar dos mecanismos ainda não estarem claros. Os resultados obtidos nos permitem concluir que há envolvimento do dano oxidativo, da inflamação e da neurodegeneração na fisiopatologia da NP-C, e que, tanto o miglustate quanto a NS β -CD, NAC e CoQ10, possuem efeitos protetores nestes processos.

Palavras-chave: Niemann-Pick tipo C; Colesterol; Miglustate; Estresse Oxidativo; N-Acetilcisteína; Coenzima Q10; β -ciclodextrina nanoparticulada

ABSTRACT

Study of inflammatory mechanisms and oxidative damage in patients with Niemann-Pick Type C: in vivo effect of miglustat and in vitro of nanoparticulated β -Cyclodextrin, N-Acetylcysteine and Coenzyme Q10

Niemann-Pick type C (NP-C) is a lysosomal storage disease caused by dysfunction in NPC1 or NPC2 proteins, responsible for intracellular lipid traffic. Genetic alterations in one of these proteins result in the accumulation of unesterified cholesterol and glycosphingolipids within the endosomal/lysosomal compartment of the cells of affected patients. Some studies in the literature have linked oxidative stress and inflammation to the pathophysiology of this disease, however, as it is a rare genetic disease, few studies investigate how these deleterious mechanisms work in patients. In addition, little is known about the effect of miglustat (N-butyl-deoxynojirimycin) treatment on oxidative stress and inflammation, in addition to the correlation with the improvement in neurological damage observed in these patients. Considering that markers of oxidative stress and inflammation have been shown to be important targets in lysosomal accumulation diseases and considering that NP-C has no cure or satisfactory treatment, we aimed to analyze these parameters in patients during treatment with miglustat in order to better understand the disease pathophysiology and future therapeutic targets. DNA damage parameters, cytokine production, oxidative stress, as well as plasma markers of neurological damage were evaluated. In addition, *in vitro* effects of β -cyclodextrin nanoparticulated and antioxidants N-Acetylcysteine (NAC) and Coenzyme Q10 (CoQ10) in patient cells, on cholesterol accumulation, on oxidative stress parameters, mitochondrial damage and cytokine production were also investigated. In the first chapter of this thesis, we found an increase in the production of pro and anti-inflammatory cytokines in NP-C patients at the time of diagnosis, as well as a beneficial effect of miglustat by decreasing the cytokines IL-1 β , IL-6, IL-10 and TNF- α , in treated NP-C patients. In the second chapter, we showed that oxidative and nitrative stress may be contributing to the pathophysiology of NP-C, since the levels of lipid peroxidation and nitrite and nitrate were increased in these patients when compared to healthy individuals, as well as high damage to the DNA. The nanoparticles containing

β -CD reduced the cholesterol accumulated in the NP-C fibroblasts. This result was potentiated by the concomitant use of nanoparticles with the antioxidants NAC and CoQ10 in comparison with fibroblasts from healthy individuals. Furthermore, treatments combining β -CD nanoparticles and antioxidants can reduce mitochondrial oxidative stress, demonstrating advantages over free β -CD. In the third chapter, we verified a reduction in the levels of two of the neurodegeneration plasma markers evaluated (PAI-1 and PDGF-AA) in NP-C patients, in addition to the normalization of BDNF, NCAM, PFGF-AB/BB and Cathepsin D levels. With the molecular analysis of the patients studied in chapter five, we identified four previously described pathogenic variants, as well as the same pattern of SNPs for the 2 patients who have the same variant. This leads us to believe that this mutation may have a common origin, since these unrelated individuals have the same polymorphisms. In the *in vitro* assays carried out in the fourth chapter, we found a benefit in the treatment with NAC and CoQ10, through the reduction of cholesterol accumulation and the mitigation of DNA damage in fibroblasts from NP-C patients treated with these antioxidants compared to untreated fibroblasts. These molecules can act by reducing or preventing the formation of reactive species, protecting nucleic acids from oxidative damage. *In vitro* assays have shown that there is a positive effect of treatment with antioxidants, although the mechanisms are still unclear. The results obtained allow us to conclude that oxidative damage, inflammation, and neurodegeneration are involved in the pathophysiology of NP-C, and that miglustat or the *in vitro* treatments with NS β -CD, NAC and CoQ10 have protective effects on these processes.

Keywords: Niemann-Pick type C; Cholesterol; Miglustat; Oxidative stress; N-Acetylcysteine; Coenzyme Q10; nanoparticulated β -cyclodextrin

LISTA DE ABREVIATURAS

3 β ,5 α ,6 β -triol: colestano-3 β ,5 α ,6 β -triol

7-KC: 7-cetocolesterol

¹O₂: oxigênio *singlet*

8-OH-dG: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine

β -CD: β -ciclodextrina

BDNF: Fator neurotrófico derivado do cérebro

BHE: barreira hematoencefálica

CG/MS: Cromatografia gasosa – espectroscopia de massas

CoQ10: Coenzyme Q10

DLDs - Doenças lisossômicas de depósito

EIM: Erros inatos do metabolismo

ERN: espécies reativas do nitrogênio

ERO: espécies reativas do oxigênio

GM-CSF: Fator estimulador de colônias macrófagos-granulócitos

GSH: Glutathione

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

HO1: Heme-oxigenase 1

IFN- γ : *Interferon gamma*

IL-1 β : Interleucina 1 β

IL-2: Interleucina 2

IL-4: Interleucina 4

IL-5: Interleucina 5

IL-6: Interleucina 6

IL-8: Interleucina 8

IL-10: Interleucina 10

LC/MS/MS: Cromatografia líquida acoplada a espectroscopia de massas em tandem

MDA: malondialdeído;

NAC: N-Acetilcisteína

NCAM: molécula de adesão neuronal

NGS: *Next Generation Sequencing*

NF κ B: factor de transcrição kappa

NPC: Niemann-Pick tipo C

NO: óxido nítrico

NS-βCD: β-Ciclodextrina nanoparticulada

O₂⁻: radical superóxido

O₂: oxigênio molecular

OH⁻: radical hidroxila

ONOO⁻: peroxinitrito

PDGF-AA: Fator de crescimento derivado de plaquetas AA

PDGF-AB/BB: Fator de crescimento derivado de plaquetas AB

TBARS: espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

TNF-α: Fator de necrose tumoral α

SUMÁRIO

PARTE I

1	INTRODUÇÃO.....	27
1.1	<i>Erros Inatos do metabolismo</i> -----	27
1.2	<i>Doenças lisossômicas de depósito</i> -----	28
1.3	<i>Niemann-Pick tipo C</i> -----	29
1.3.1	Sintomatologia e achados clínicos	30
1.3.2	Diagnóstico	31
1.3.3	Tratamento	32
1.3.4	Mecanismo de dano neuronal	33
1.3.5	Envolvimento mitocondrial na doença Niemann-Pick C	35
1.4	<i>Espécies reativas de oxigênio, radicais livres e estresse oxidativo</i> -----	36
1.5	<i>Defesas não-enzimáticas e enzimáticas</i> -----	36
1.6	<i>Antioxidantes</i> -----	38
1.7	<i>Inflamação</i> -----	39
1.8	<i>Estresse oxidativo, inflamação e Niemann-Pick tipo C</i> -----	40
2	OBJETIVOS.....	43
2.1	<i>Objetivo Geral</i> -----	43
2.2	<i>Objetivos específicos</i> -----	43
2.2.1	Capítulo 1:.....	43
2.2.2	Capítulo 2:.....	43
2.2.3	Capítulo 3:.....	44
2.2.4	Capítulo 4:.....	44
2.2.5	Capítulo 5:.....	44

PARTE II

3	RESULTADOS	47
3.1	<i>Capítulo 1: Cytokine profile and cholesterol levels in patients with Niemann-Pick type c disease presenting neurological symptoms: in vivo effect of miglustat and in vitro effect of n-acetylcysteine and coenzyme Q10 -----</i>	47
3.2	<i>Capítulo 2: Evidence of redox imbalance and mitochondrial dysfunction in Niemann-Pick type c 1 patients: the in vitro effect of combined therapy with antioxidants and β-cyclodextrin nanoparticles -----</i>	51
3.3	<i>Capítulo 3: Plasmatic neurodegeneration markers in Niemann-Pick type C1 patients: beneficial effects of miglustat treatment-----</i>	63
3.4	<i>Capítulo 4: Beneficial in vitro effect of antioxidants on DNA damage in fibroblasts from Niemann-Pick type C 1 patients -----</i>	91
3.5	<i>Capítulo 5: Resultados preliminares da determinação de genótipo e haplótipo em pacientes brasileiros portadores da doença de Niemann-Pick Tipo C</i>	115

PARTE III

4	DISCUSSÃO	145
5	CONCLUSÕES.....	159
5.1	<i>Capítulo 1:-----</i>	159
5.2	<i>Capítulo 2:-----</i>	159
5.3	<i>Capítulo 3:-----</i>	160
5.4	<i>Capítulo 4:-----</i>	160
5.5	<i>Capítulo 5:-----</i>	161
5.6	<i>Conclusão geral-----</i>	161
6	PERSPECTIVAS.....	163
7	REFERÊNCIAS.....	165

8 ANEXOS.....	183
8.1 <i>Anexo 1: Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre</i> -----	183
8.2 <i>Anexo 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Indivíduos saudáveis)</i> -----	188
8.3 <i>Anexo 3: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Pacientes NP-C)</i> --	191
8.4 <i>Comprovativo de submissão de artigo no periódico Metabolic Brain Disease</i> -----	194
8.5 <i>Comprovativo de submissão de artigo no periódico Clinica Chimica Acta</i> -	195
8.6 <i>Comprovativo de submissão de artigo no periódico International Journal of Developmental Neuroscience</i> -----	196

PARTE I

Introdução e Objetivos

1 INTRODUÇÃO

1.1 Erros Inatos do metabolismo

Erros inatos do metabolismo (EIM) são doenças genéticas que se caracterizam pela síntese alterada de uma proteína, na maioria dos casos uma enzima, que pode ter sua atividade parcial ou totalmente reduzida. Como resultado desse defeito genético temos o bloqueio de determinada via metabólica levando ao acúmulo de substratos e metabólitos secundários de metabolização, bem como a diminuição de produtos finais da rota afetada (SCRIVER CR, SLY WA, BEAUDET AL, 2001). Clinicamente esse bloqueio metabólico se apresenta de forma variável, sendo geralmente grave ou letal (WABER, 1990). Os EIM podem ser classificados em três grandes grupos baseados em sua fisiopatologia: erros inatos do metabolismo intermediário, doenças envolvendo déficit de energia e distúrbios na síntese ou degradação de macromoléculas complexas (SAUDUBRAY *et al.*, 2006) (quadro 1).

Apesar da incidência isolada de cada uma das doenças metabólicas ser pequena (visto que geralmente são de herança autossômica recessiva), se forem contabilizados os dados de cerca dos 500 distúrbios conhecidos (ARAÚJO, 2004; SANSEVERINO MTV, WAJNER M, 2000; SOUZA; SCHWARTZ; GIUGLIANI, 2002) a frequência acaba se tornando expressiva, chegando a aproximadamente 1/5.000 nascidos vivos (MARTINS, 2003; SOUZA; SCHWARTZ; GIUGLIANI, 2002). Além disso, deve-se levar em consideração que os números baixos podem representar não só a raridade dos distúrbios como também, a subestimação de seu diagnóstico e, no que diz respeito a isto vale destacar o papel fundamental da triagem neonatal, conhecida como “teste do pezinho”. Esta triagem possibilitou grande avanço no conhecimento e tratamento dessas doenças a partir de sua detecção em fase pré-clínica, prevenindo o dano neurológico ou mesmo a morte dos pacientes (JARDIM; ASHTON-PROLLA, 1996; SOUZA; SCHWARTZ; GIUGLIANI, 2002).

Quadro 1. Classificação dos EIMs de acordo com Saudubray e colaboradores (SAUDUBRAY; SEDEL; WALTER, 2006).

Erros inatos do metabolismo intermediário	As doenças que compõe esse grupo podem causar intoxicação aguda (quadros de acidose metabólica, vômitos, letargia e desidratação) ou intoxicação crônica (retardo mental, atraso no desenvolvimento psicomotor e luxação do cristalino), têm relação com ingesta alimentar e os pacientes podem apresentar intervalos livres de sintomas. A intoxicação acontece pelo acúmulo de componentes tóxicos e de metabólitos, provenientes do bloqueio das rotas metabólicas ou de vias alternativas de metabolização. Fazem parte deste grupo as aminoacidopatias (ex.: fenilcetonúria, doença do xarope do bordo, homocistinúria), acidemias orgânicas (acidemia isovalérica, acidemia metilmalônica), defeitos no ciclo da ureia (argininemia) e as intolerâncias aos açúcares (galactosemia).
Doenças envolvendo déficit de energia	Neste grupo de doenças, os sintomas são causados por deficiência, total ou parcial, na obtenção ou utilização de energia pelos diversos tecidos. As doenças envolvendo defeitos mitocondriais são geralmente mais severas, mas nessas desordens também se incluem as doenças de depósito de glicogênio, defeitos de gliconeogênese, acidemias lácticas congênitas e defeitos de oxidação dos ácidos graxos.
Distúrbios na síntese ou de degradação de macromoléculas complexas	Este grupo envolve organelas celulares e inclui doenças que perturbam a síntese ou o catabolismo de moléculas complexas. Os sintomas são permanentes, progressivos, independentes de eventos intercorrentes e não relacionados à ingestão de alimentos. Fazem parte deste grupo as doenças lisossômicas de depósito (ex.: doença de Gaucher, doença de Fabry, mucopolissacaridoses, Niemann-Pick, entre outras) e as desordens peroxissomais (ex.: adrenoleucodistrofia ligada ao X, doença de Refsum, síndrome de Zellweger e outras)

1.2 Doenças lisossômicas de depósito

Doenças de lisossômicas de depósito (DLDs) são EIMs que afetam a função do lisossomo. As DLDs compreendem um grupo de aproximadamente 70 distúrbios monogênicos do catabolismo lisossomal, a maioria dos quais são herdados como traços autossômicos recessivos, mas três são ligados ao X (PLATT *et al.*, 2018b).

Esses distúrbios são causados por mutações em genes que codificam proteínas lisossomais, como glicosidases, proteases, proteínas integrais de membrana, transportadores, modificadores ou ativadores enzimáticos (PLATT *et al.*, 2018b). Mutações em genes lisossomais afetam a função da proteína codificada, resultando em mau funcionamento lisossomal e no acúmulo gradual de substratos dentro do lisossomo, o que acaba levando à disfunção celular e morte celular (PLATT *et al.*, 2018b). O acúmulo de macromoléculas na maioria das DLDs inicia-se na vida fetal e torna-se evidente clinicamente nos dois primeiros anos de vida (P. *et al.*, 2003).

1.3 Niemann-Pick tipo C

A doença de Niemann-Pick tipo C (NPC1, MIM*607623; NPC2, MIM*607625) é uma DLD, causada por variantes patogênicas no gene *NPC1* ou *NPC2* (menos de 5%). A NPC1 é uma grande proteína transmembrana de 1278 aminoácidos e se localiza nos endossomos tardios/lisossomos (LE/L), enquanto a NPC2 é uma pequena proteína de ligação ao colesterol solúvel que contém 151 resíduos de aminoácidos (BLOM, 2003). Essas proteínas estão envolvidas no transporte intracelular de lipídeos, e quando uma delas se encontra disfuncional causa o acúmulo de colesterol não esterificado e outros lipídeos, como a glicosilceramida e os gangliosídeos GM2 e GM3 nas células de tecidos periféricos (fígado, baço) e no sistema nervoso central (SNC) de indivíduos afetados (VANIÉR, 2013). (Fig.1).

A NP-C é uma doença de caráter hereditário autossômico recessivo, com uma incidência média de 1:89.000 nascidos vivos, entretanto esse dado pode ser subestimado, devido aos amplos aspectos clínicos em que se apresenta (WASSIF *et al.*, 2016). Existem cerca de 420 mutações no gene *NPC1* relatadas como possivelmente causadoras de doença, de acordo com a *The Human Gene Mutation Database* (HGMD) (INSTITUTE OF MEDICAL GENETICS IN CARDIFF, [s. d.]). Um estudo conduzido por Polese-Bonatto e colaboradores em 2019 demonstrou que as mutações mais recorrentes nos pacientes NP-C1 brasileiros é a p.Ala1035Val (27%), seguido pela p.Pro1007Ala (16,9%) (POLESE-BONATTO *et al.*, 2019).

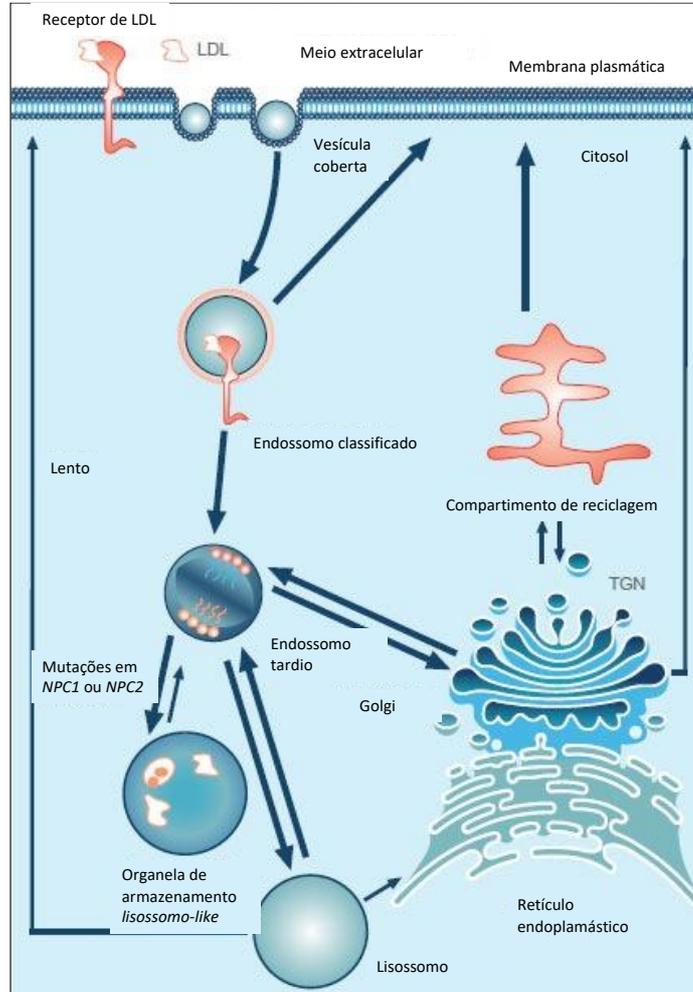


Figura 1. Transporte de colesterol em células normais e deficientes das proteínas NPC. Adaptado de (PATTERSON, 2003)

1.3.1 Sintomatologia e achados clínicos

A NP-C é uma doença multissistêmica que pode se manifestar em diferentes etapas do desenvolvimento do indivíduo (Fig. 2), além de ter sintomas inespecíficos e que podem ser confundidos com outras doenças, o que torna o diagnóstico, realizado somente em centros especializados, bastante difícil (PATTERSON *et al.*, 2017). Classificada como uma doença neurovisceral, a NP-C possui manifestações clínicas bastante heterogêneas, que dependem da idade do aparecimento dos sintomas nos pacientes, podendo incluir hepatoesplenomegalia, icterícia, sintomas neurológicos (disartria, disfagia, paralisia supranuclear vertical, crises convulsivas) e psiquiátricos (transtorno bipolar, esquizofrenia, déficit cognitivo) (PATTERSON *et al.*, 2017). Os danos neurológicos observados nos pacientes são devido à neurodegeneração das células de Purkinje no cerebelo (YAMADA *et al.*, 2001) além de manifestações em

outras regiões cerebrais, como inchamento neuronal, degeneração e formação ectópica de dendritos (PRESSEY *et al.*, 2012). A demência é um sintoma comum em pacientes com NP-C, com achados histopatológicos *post-mortem* semelhantes aos encontrados na doença de Parkinson o que sugere que a biologia celular de NP-C acelera o processamento da proteína precursora de amiloide e os defeitos de fosforilação de tau tipicamente associados ao envelhecimento na população em geral (AUER *et al.*, 1995).

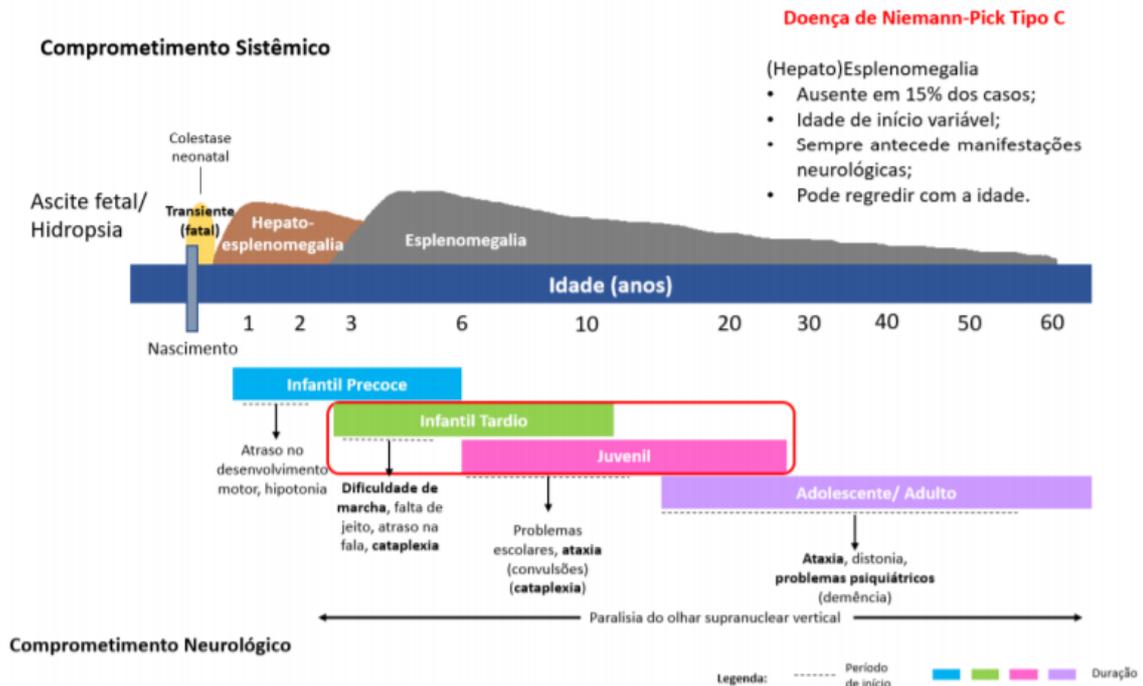


Figura 2. Sinais e sintomas da doença, de acordo com a idade das manifestações. Adaptado de (SAÚDE, 2020)

1.3.2 Diagnóstico

O diagnóstico de NP-C se dá pela presença de colesterol não esterificado em grande quantidade em fibroblastos, determinado pela coloração de Filipin (Vanier & Latour, 2015). O colesterol intracelular sofre oxidação de diferentes maneiras, podendo ser mediado por enzimas ou através de reações não enzimáticas (Fig. 3). Os produtos de colesterol oxidado, especificamente colestano-3 β ,5 α ,6 β -trioi (3 β , 5 α , 6 β -trioi) e 7-cetocolesterol (7-KC), são marcadamente aumentados no plasma de pacientes com NP-C e em modelos animais, enquanto permanecem normal em outras DLDs (JIANG *et al.*, 2011). Esses achados indicam que 3 β ,5 α ,6 β -trioi e 7-KC são marcadores bioquímicos específicos da doença NP-C e sugerem uma possível utilidade destes no diagnóstico e avaliação terapêutica dessa desordem (RIBAS *et al.*, 2016). Outro

como inibidor da enzima glicosilceramida sintase e diminui a produção de glicosfingolípídeos (FECAROTTA *et al.*, 2015). Testes clínicos e estudos observacionais têm demonstrado que esse medicamento melhora ou pelo menos estabiliza as manifestações neurológicas, provavelmente por diminuir as concentrações de GM2 e GM3 no cérebro de pacientes NP-C (PATTERSON *et al.*, 2020). Um estudo recente do nosso grupo de pesquisa demonstrou que pacientes em uso de miglustate apresentaram uma diminuição dos níveis de oxisteróis, mais especificamente do $3\beta,5\alpha,6\beta$ -tríol, indicando que esse tratamento causa uma melhora no status bioquímico desses indivíduos (HAMMERSCHMIDT *et al.*, 2018). O uso de β -ciclodextrina (β -CD) e de seus derivados tem sido investigado pelo seu potencial em remover o colesterol acumulado nas células de indivíduos NP-C, uma vez que esses compostos podem formar um complexo de inclusão supramolecular com o colesterol, aumentando a aparente solubilidade deste em água, facilitando sua remoção do compartimento lisossomal (DONIDA *et al.*, 2020).

1.3.4 *Mecanismo de dano neuronal*

Os mecanismos pelos quais o dano neurológico ocorre nos pacientes NP-C não estão bem estabelecidos, entretanto o efeito do acúmulo cerebral de colesterol e dos gangliosídeos GM2 e GM3 tem sido estudado. Alguns estudos em modelos animais têm sugerido que a ativação da micróglia contribui para a degeneração das células de Purkinje, destruindo seus dendritos (KAVETSKY *et al.*, 2019), enquanto outros apontam para a diminuição na disponibilidade de vesículas para exocitose, principalmente nas sinapses GABAérgicas, pela ação indireta de regulação do colesterol nas vesículas exocíticas pela proteína NPC1 (XU *et al.*, 2010). Em estudos com animais *knockout* para o gene NP-C o acúmulo de colesterol nas mitocôndrias vem sendo relacionado com a inibição da produção de ATP e diminuição da disponibilidade de GSH, o que leva à disfunção mitocondrial, e por consequência à morte neuronal (SAFFARI *et al.*, 2017). Além disso, modelos *in vitro* utilizando neurônios formados por indução de células-tronco pluripotentes oriundas de pacientes NP-C mostraram que há um defeito no fluxo autofágico nessas células, o que pode estar relacionado com a morte celular (MAETZEL *et al.*, 2014b). A neuroinflamação

também exerce um papel importante no processo neurodegenerativo que ocorre nessa doença. (SHIN *et al.*, 2019a) encontraram um aumento na expressão de genes responsivos aos interferons (IFN) γ e α , bem como a elevação dos níveis de IP-10/CXCL10 e outras citocinas responsivas à IFN- γ no cerebelo de camundongos NPC^{-/-}, indicando que esse mecanismo leva à resposta pró-inflamatória envolvendo diversas células do SNC.

Muitas das doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson (DP) e a doença de Alzheimer (DA), compartilham mecanismos comuns sugerindo que podem ser extrapolados para outras doenças que causam degeneração do tecido cerebral, como os IEM, incluindo NP-C (BEN-MENACHEM; KYLLERMAN; MARKLUND, 2000; PETROU; TERZIDAKI, 2017; SCAINI *et al.*, 2017). A disfunção do sistema neurotransmissor e a perda de sinapses são características de doenças neurodegenerativas, uma vez que populações neuroquímicas específicas de neurônios podem ser mais vulneráveis à degeneração devido a alterações específicas na plasticidade sináptica (BIERER *et al.*, 1995). Diversos estudos que investigam essas doenças têm relatado a ocorrência de alterações em marcadores envolvidos na plasticidade, sinaptogênese, neurogênese, mielinização e autofagia, como o (COVACEUSZACH *et al.*, 2009; KOJIMA; MIZUI, 2017). Recentemente, Scaini e colaboradores descreveram pacientes acometidos pela doença da urina do xarope de bordo, um defeito na rota catabólica dos aminoácidos de cadeia ramificada, principalmente a leucina, e que também apresentam importantes sequelas neurológicas, possuem níveis alterados de marcadores plasmáticos de inflamação e neurodegeneração (como catepsina-D e células de adesão neuronal) (SCAINI *et al.*, 2017). Ainda assim, vários estudos mostram que esses marcadores estão alterados em outras patologias e que seu uso pode ser útil, até mesmo como marcador precoce de doenças como DA, DP e doença de Huntington (BIERER *et al.*, 1995; BRUNO *et al.*, 2009). Entretanto até o momento não existem dados na literatura com foco nesse aspecto em NP-C, ou seja, avaliando os marcadores de neurodegeneração periférica: fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), e molécula de adesão neuronal (NCAM), que estão envolvidos na plasticidade no sistema nervoso central; fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-AA e PDGF-AB/BB); principal protease

aspártica lisossomal envolvida na regulação da apoptose e processos inflamatórios (catepsina-D) e inibidor do ativador do plasminogênio-1 total (PAI-1 total) nem mesmo o efeito do atual tratamento com miglustate sobre esses parâmetros.

1.3.5 Envolvimento mitocondrial na doença Niemann-Pick C

Distúrbios no transporte e armazenamento de colesterol estão associados a outras disfunções celulares, como alterações na distribuição das organelas celulares, propriedades alteradas da membrana plasmática e do retículo endoplasmático (ER), desregulação de localização intracelular de várias proteínas ou alterações na expressão de genes, incluindo elementos de importantes vias de sinalização (WOSÍ *et al.*, 2016). Além do acúmulo de colesterol característico no compartimento endossomal/lisossomal das células de pacientes NP-C, estudos recentes mostram que as mitocôndrias também acabam sendo comprometidas e acumulam colesterol no seu interior (KENNEDY *et al.*, 2014). Os níveis elevados de colesterol mitocondrial contribuem para o desenvolvimento de estresse oxidativo (por exemplo, através de defeitos na fosforilação ou na importação mitocondrial de glutatona) o qual, por sua vez, promove alterações metabólicas. Alterações metabólicas em células deficientes de NPC1 incluem aumento de produção de lactato, defeitos na cadeia respiratória mitocondrial, transporte prejudicado de ATP através da membrana mitocondrial e aumento do estresse oxidativo. Essas alterações só ocorrem quando há um acúmulo de colesterol intramitocondrial, e são revertidas quando há o bloqueio do transporte do colesterol do lisossomo à mitocôndria (KENNEDY *et al.*, 2014). Já foi descrito que o excessivo acúmulo de colesterol em fibroblastos de pacientes NP-C é acompanhado por mudanças na organização da rede mitocondrial e também por alterar a função desta organela (WOSÍ *et al.*, 2016). Além disso, as células de pacientes NP-C apresentaram baixos níveis de ATP, apesar de um aumento de sua massa, sugerindo uma disfunção mitocondrial em termos de fosforilação oxidativa, bioenergética e metabolismo celular.

1.4 Espécies reativas de oxigênio, radicais livres e estresse oxidativo

Radicais livres (RL) são estruturas químicas com um elétron desemparelhado no seu último orbital, ou seja, ocupando um orbital atômico sozinho, conferindo uma alta reatividade à molécula (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Em nosso organismo são produzidos radicais livres de carbono, enxofre, nitrogênio (espécies reativas de nitrogênio ou ERN) e oxigênio (espécies reativas de oxigênio ou ERO), sendo estas últimas as que ganham maior destaque devido à sua alta reatividade e aos danos gerados às biomoléculas. As ERO podem ser produzidas por fontes exógenas, tais como a radiação, cigarro, solventes orgânicos, agrotóxicos (ex. paraquat) e medicamentos (ex. paracetamol) e por fontes endógenas, através de processos como a degradação de ácidos graxos, a fagocitose, citocromo P-450 e cadeia de transporte de elétrons. O termo ERO é utilizado tanto para RL de oxigênio, como o superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxil (OH^{\cdot}) e o oxigênio singlete (1O_2), quanto para alguns não radicais capazes de gerar RL, como por exemplo, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que pode produzir o OH^{\cdot} (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Os RL também estão envolvidos em diversas funções fisiológicas, como por exemplo, no sistema imune (armazenados nos fagócitos para atacar potenciais patógenos), na sinalização celular e na indução da resposta mitogênica (PIZZINO *et al.*, 2017), entretanto, quando sua produção é exacerbada, podem causar danos às biomoléculas (YOUNG J., WOODSIDE, 2001).

1.5 Defesas não-enzimáticas e enzimáticas

Em situações fisiológicas o organismo consegue minimizar a ação das ERO através do sistema de defesa antioxidante. A definição clássica para o termo antioxidante é a de qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações em relação a um substrato oxidável, significativamente diminui ou previne a oxidação deste substrato. As defesas antioxidantes que atuam em sistemas biológicos são compostas por antioxidantes não enzimáticos e antioxidantes enzimáticos. Nos primeiros estão incluídas as vitaminas (como por ex., vitaminas A, C e E), a GSH, os carotenoides, proteínas ligantes de metal (transferrina, ferritina), dentre outros. Os antioxidantes não enzimáticos podem atuar de diversas maneiras, por exemplo, através da remoção do oxigênio presente no meio, como detoxificadores/sequestradores de RL,

quelantes de íons metálicos e reparadores de lesão (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Já, entre os antioxidantes enzimáticos, têm-se as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutiona-peroxidase (GPx). A SOD é uma metaloenzima que catalisa a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ ao H_2O_2 , o qual é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas, como a CAT ou a GPx. A CAT é uma ferrihemoenzima, localizada nos peroxissomos, cuja principal função é converter H_2O_2 à água e oxigênio. A GPx é uma seleno-enzima que representa a principal defesa mitocondrial contra o H_2O_2 , já que essas organelas, em geral, não possuem a CAT. A ação da GPx é baseada na oxidação da GSH ao dissulfeto correspondente (glutona oxidada - GSSG) com consequente redução do H_2O_2 à água (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

De uma forma geral, o sistema de defesa antioxidante atua convertendo as espécies reativas em derivados inativos. Entretanto, em situações patológicas, pode ocorrer o aumento da produção de RL e/ou uma diminuição da capacidade do sistema antioxidante, gerando uma condição conhecida como estresse oxidativo (Fig. 4).

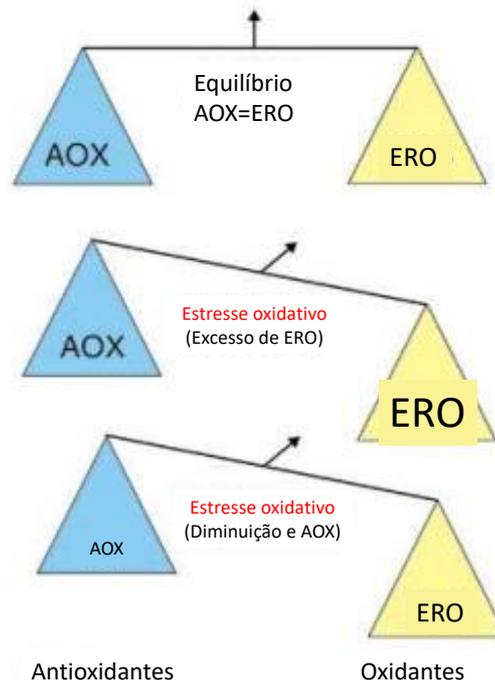


Figura 4. Estresse oxidativo. Adaptado de (SCANDALIOS, 2002)

Entre as principais consequências do estresse oxidativo estão (BECKMAN; AMES, 1998; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015; RAMOS-VASCONCELOS; ALVES; HERMES-LIMA, 2000):

- lipoperoxidação das membranas celulares, podendo alterar sua fluidez e permeabilidade;
- oxidação de proteínas, o que leva à alteração da atividade enzimática e mesmo à desnaturação,
 - lesão ao DNA/RNA celular, podendo causar mutações que, por sua vez, levam ao aparecimento de doenças como câncer, Parkinson, entre outras.

1.6 Antioxidantes

Diversas moléculas com ação redutora têm sido empregadas com a finalidade de mitigar os efeitos oxidantes em muitas doenças, entre elas os EIMs e as DLDs. A N-acetilcisteína (NAC) é a forma acetilada do aminoácido cisteína, e tem sido relatada como uma molécula *scavenger* de ERO, capaz de regular as reações redox e consequentemente alterar a sinalização celular, e reduzir as citocinas inflamatórias (DEAN; GIORLANDO; BERK, 2011; PARASASSI *et al.*, 2010) (Fig. 5). Em um modelo *in vitro* de células gliais, Marchetti e colaboradores demonstraram um efeito protetor da NAC frente ao metabólito C26:0, acumulado na adrenoleucodistrofia ligada ao X (MARCHETTI *et al.*, 2018b). A NAC também foi capaz de aumentar os níveis de GSH no fígado de camundongos *Npc1^{-/-}* e, com a sua utilização, observou-se uma melhora nos sintomas neurológicos e aumento de sobrevivência dos animais, porém não se observou efeito sobre o estresse oxidativo (razão GSH/GSSG e capacidade antioxidante total) ou nos níveis de oxiesteróis em pacientes (FU *et al.*, 2013).

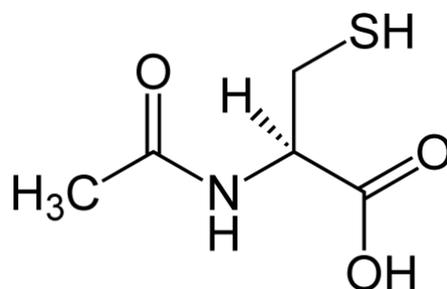


Figura 5. Estrutura molecular da N-acetilcisteína.

A coenzima Q10 (CoQ10) é parte integrante da cadeia transportadora de elétrons (CTE) e essencial para a produção de ATP, além de atuar como um antioxidante

lipofílico (HARGREAVES, 2003) (Fig. 6). A síntese de CoQ10 se dá em todos os tecidos, mas a concentração plasmática depende da biossíntese hepática (WEBER; BYSTED; HØLMER, 1997). De acordo com (MONTERO *et al.*, 2019), pacientes portadores de EIM com envolvimento neurológico (ex. fenilcetonúria e mucopolissacaridoses) apresentam diminuição dos níveis plasmáticos de CoQ10, demonstrando um possível papel da molécula na fisiopatologia dessas doenças.

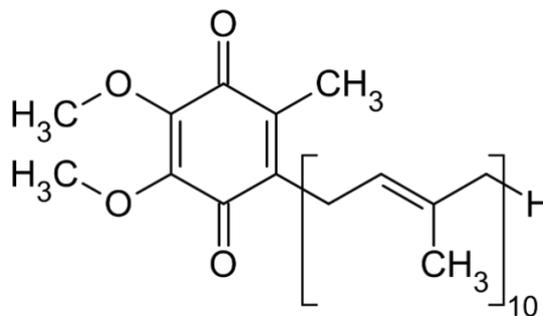


Figura 6. Estrutura molecular da coenzima Q10

1.7 Inflamação

A inflamação é descrita como uma resposta inespecífica a uma agressão, sendo considerada um mecanismo de defesa do organismo contra agentes agressores de diferentes origens, (química, física ou biológica), e é a resposta mais precoce quando há uma lesão tissular ou quadro infeccioso (TILLEY; COFFMAN; KOLLER, 2001). Os processos inflamatórios são, de certa forma, uma desordem complexa envolvendo diferentes células e componentes moleculares (MURIACH *et al.*, 2014).

Em conjunto com o estresse oxidativo, a inflamação está associada com os mecanismos fisiopatológicos de diversas doenças, como desordens neurodegenerativas e distúrbios neurometabólicos (CAI; LIU, 2012; CSISZAR *et al.*, 2008). Apesar de fisiológicos, os processos inflamatórios podem levar a exacerbação de outras condições pré-existentes ou a uma resposta inadequada, formando juntamente com outros fatores, os componentes significativos de muitas doenças, dentre elas os EIMs (RANG, H.P. J.M. RITTER, R.J. FLOWER, 2016).

As citocinas são proteínas que possuem papel importante na resposta inflamatória, uma vez que estão envolvidas tanto no desenvolvimento como na manutenção e supressão desse processo. Já foram identificadas diversos desses compostos, que formam um grande conjunto de proteínas que contém as interleucinas (IL), fatores de necrose tumoral (TNF), interferonas (IFN), quimiocinas e fatores estimuladores de colônia (CSF). Dependendo da ação que tem sobre o organismo, as citocinas podem ser classificadas de acordo com a tabela 1.

Tabela 1. Classificação das citocinas inflamatórias de acordo com Tayal et. al (TAYAL; KALRA, 2008).

Classificação	Exemplos
Pró-inflamatórias	IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α , GM-CSF
Anti-inflamatórias	IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e TGF- β

As citocinas pró-inflamatórias agem pela ativação das células sanguíneas brancas, como macrófagos, linfócitos NK (do inglês, *Natural Killer*), T e B, e estimulando a síntese de imunoglobulinas, enquanto as citocinas anti-inflamatórias exercem um papel de retroalimentação negativa ao regular a produção das citocinas pró-inflamatórias e suprimir a ação dos monócitos (GALIC; RIAZI; PITTMAN, 2012; TILLEY; COFFMAN; KOLLER, 2001).

Visto isso, alguns estudos têm demonstrado o desequilíbrio da resposta inflamatória nos EIM e nas DLDs, como os achados referente ao aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias em pacientes com a doença da Urina do Xarope do Bordo (MESCKA *et al.*, 2015), adrenoleucodistrofia ligada ao X (MARCHETTI *et al.*, 2018a) e MPS tipo IVA (DONIDA *et al.*, 2015) encontrados recentemente.

1.8 Estresse oxidativo, inflamação e Niemann-Pick tipo C

Nos últimos anos muito tem se falado sobre o papel dos RL na fisiopatologia de diversas doenças humanas, e especialmente em doenças neurodegenerativas, como DA e DP (BUTTERFIELD; HALLIWELL, 2019). Alguns estudos já evidenciaram o papel do estresse oxidativo na fisiopatogenia de algumas DLDs e em outros EIM, uma vez

que o acúmulo de metabólitos tóxicos que acontece nessas doenças pode levar a um aumento excessivo na produção de ERO (BARSCHAK *et al.*, 2007; DONIDA *et al.*, 2017; DOS SANTOS MELLO *et al.*, 2015; JACQUES *et al.*, 2016; MARCHETTI *et al.*, 2018b; WAJNER *et al.*, 2004).

Análises *in vitro* demonstraram que fibroblastos deficientes da proteína NPC1 apresentam aumento do conteúdo de ERO e consequente peroxidação lipídica (REDDY; GANLEY; PFEFFER, 2006; ZAMPIERI *et al.*, 2009). Além disso, estudos em animais indicaram estresse oxidativo em fígado de ratos com NP-C, com aumento de proteínas carboniladas e diminuição de GSH (VÁZQUEZ *et al.*, 2012). Também já se evidenciou em cerebelo de camundongos *Npc1*^{-/-} a diminuição da atividade da CAT e aumento de ERO (SEQUEIRA *et al.*, 1998). Kim e colaboradores encontraram um aumento na produção de óxido nítrico (NO) em células-tronco neurais de ratos deficientes de NPC, bem como um aumento na expressão da enzima óxido nítrico sintase (NOS) no cérebro desses mesmos animais, indicando um possível papel para esse agente oxidante na neurodegeneração encontrada nessa doença (KIM, S.-J. *et al.*, 2008).

Corroborando com os achados em animais, estudos realizados com pacientes portadores de NP-C demonstraram aumento da lipoperoxidação e proteínas carboniladas em plasma, bem como aumento da atividade da GPx em eritrócitos (RIBAS *et al.*, 2012). Além disso, Fu e colaboradores encontraram uma redução da fração reduzida da CoQ10 e da capacidade antioxidante equivalente de trolox em soro de pacientes NP-C, indicando níveis aumentados de estresse oxidativo nesses indivíduos (FU *et al.*, 2013). Sabe-se que a resposta inflamatória se encontra intimamente relacionada com as defesas antioxidantes e com o estresse oxidativo. Em uma “via de mão dupla”, ERO/ERN são capazes de alterar diferentes vias de sinalização, estimulando a liberação de citocinas e outros mediadores pró-inflamatórios. Da mesma maneira, a sustentação de estados inflamatórios pode promover um aumento do estresse oxidativo (HIGDON *et al.*, 2012; MARINHO *et al.*, 2014; OKUN; GRIFFIOEN; MATTSON, 2011; OLSEN; CORNELIUS; GREGERSEN, 2015). Dentre os principais mediadores entre a inflamação e as

ERO/ERN, encontram-se o fator nuclear-kappa B (NF- κ B), a enzima heme oxigenase-1 (HO-1) e o fator nuclear eritroide 2 (Nrf-2).

Nesse contexto, Vazqu ez et al. encontraram um aumento na expressão de HO1 em fígado de camundongos NP-C, indicando que há envolvimento do estresse oxidativo e inflama o na fisiopatologia dessa doença (VÁZQUEZ *et al.*, 2011). Já Cologna e colaboradores verificaram um aumento de IL16 e uma diminui o de IL 4, 10 e 13 em líquido cefalorraquidiano de pacientes NP-C tratados ou não com miglustate, demonstrando que esses marcadores inflamatrios podem estar correlacionados com a progressão neurológica da doença (COLOGNA *et al.*, 2014). Em outro estudo utilizando modelo animal, a análise multiplex de proteínas confirmou que IFN- γ e IP-10/CXCL10 foi significativamente regulada de forma positiva na fase pré-sintomática e mais exacerbada na fase terminal da doença, descrevendo novos padrões de sinaliza o do IFN na NP-C e indicando o possível uso de antioxidantes como tratamento adjuvante nessa desordem (SHIN *et al.*, 2019a). Ademais, a literatura carece de dados de pacientes a respeito desses biomarcadores.

2 OBJETIVOS

2.1 *Objetivo Geral*

O presente estudo teve como objetivo geral avaliar os mecanismos de estresse oxidativo, inflamação e neurodegeneração em pacientes portadores de NP-C durante o tratamento com miglustate, bem como avaliar o efeito *in vitro* da β -ciclodextrina nanoparticulada e dos antioxidantes N-acetilcisteína e Coenzima Q10 em cultura de fibroblastos derivados de biópsia de pele de pacientes NP-C.

2.2 *Objetivos específicos*

2.2.1 *Capítulo 1:*

- a) Avaliar os níveis de colestano-3 β ,5 α ,6 β -triol em plasma de pacientes em tratamento com miglustate;
- b) Quantificar os níveis intracelulares de colesterol em pacientes,
- c) Determinar os níveis de citocinas pró- e anti-inflamatórias, nomeadamente interleucinas (IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-8, IL-10), interferon-gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) em plasma e fibroblastos de pacientes;
- d) Verificar os efeitos do tratamento *in vitro* com N-acetilcisteína e Coenzima Q10 sob o acúmulo de colesterol e produção de citocinas.

2.2.2 *Capítulo 2:*

- a) Avaliar os níveis de estresse oxidativo em pacientes através das dosagens de nitrito + nitrato (NO₃⁻ + NO₂⁻) plasmáticos, 8-isoprostanos urinários e dano ao DNA;
- b) Verificar o efeito *in vitro* dos tratamentos com antioxidantes (N-Acetilcisteína e Coenzima Q10) e β -ciclodextrina nanoparticulada sobre o acúmulo de colesterol;
- c) Determinar dano mitocondrial em fibroblastos de pacientes, bem como o verificar o possível efeito benéfico dos tratamentos com antioxidantes (N-

Acetilcisteína e Coenzima Q10) e com β -ciclodextrina nanoparticulada *in vitro* sobre esse parâmetro;

2.2.3 **Capítulo 3:**

- a) Identificar as variantes patogênicas no gene *NPCI* apresentadas pelos pacientes recrutados;
- b) Determinar os níveis urinários de colestano-3 β ,5 α ,6 β -triol em pacientes e indivíduos saudáveis;
- c) Avaliar a produção de marcadores periféricos de neurodegeneração em pacientes, nomeadamente BDNF, NCAM, PDGF-AA, PDGF-AB/BB, Catepsina D e PAI-Total.

2.2.4 **Capítulo 4:**

- a) Avaliar dano ao DNA em pacientes através do ensaio do cometa alcalino;
- b) Investigar o efeito *in vitro* dos tratamentos com os antioxidantes (N-Acetilcisteína e Coenzima Q10) sobre o dano ao DNA.

2.2.5 **Capítulo 5:**

- a) Avaliar o genótipo de pacientes não relacionados, diagnosticados clinicamente ou pela coloração de Filipin com NP-C, utilizando um painel customizado para análise de genes relacionados com DLDs, através da tecnologia de sequenciamento de nova geração (*next generation sequencing* – NGS).

PARTE II

Resultados

3 RESULTADOS

3.1 *Capítulo 1: Cytokine profile and cholesterol levels in patients with Niemann-Pick type c disease presenting neurological symptoms: in vivo effect of miglustat and in vitro effect of n-acetylcysteine and coenzyme Q10*

Artigo publicado na revista *Experimental Cell Research* (fator de impacto = 4,145)

O capítulo I é constituído por artigo científico publicado, conforme referência abaixo, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 49-57.

Hammerschmidt TG, Donida B, Faverzani JL, Moura AP, Dos Reis BG, Machado AZ, Kessler RG, Sebastião FM, Reinhardt LS, Moura DJ, Vargas CR. Cytokine profile and cholesterol levels in patients with Niemann-Pick type C disease presenting neurological symptoms: in vivo effect of miglustat and in vitro effect of N-acetylcysteine and coenzyme Q10. *Exp Cell Res.* 2022 Jul 15;416(2):113175. doi: 10.1016/j.yexcr.2022.113175. Epub 2022 Apr 27. PMID: 35487270.

3.2 *Capítulo 2: Evidence of redox imbalance and mitochondrial dysfunction in Niemann-Pick type c 1 patients: the in vitro effect of combined therapy with antioxidants and β -cyclodextrin nanoparticles*

Artigo submetido à revista *Metabolic Brain Disease* (fator de impacto= 3,655)

O capítulo II, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as 61-85, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta da descrição da investigação dos mecanismos de estresse oxidativo e o efeito dos tratamentos *in vitro* com N-acetilcisteína, Coenzima Q10 e β -ciclodextrina nanoparticulada sobre esses parâmetros e o acúmulo de colesterol em pacientes com a doença de Niemann-Pick tipo C.

3.3 Capítulo 3: *Plasmatic neurodegeneration markers in Niemann-Pick type C1 patients: beneficial effects of miglustat treatment*

Artigo submetido à revista *Clinica Chimica Acta* (fator de impacto = 6,314)

O capítulo III, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as 89-109, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta da descrição da investigação dos marcadores periféricos de neurodegeneração, bem como da análise molecular do gene *NPCI* em pacientes com a doença de Niemann-Pick tipo C.

3.4 *Capítulo 4: Beneficial in vitro effect of antioxidants on DNA damage in fibroblasts from Niemann-Pick type C 1 patients*

Artigo submetido à revista International Journal of Developmental Neuroscience (fator de impacto = 2,540)

O capítulo VI, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as 113-129, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta da descrição do efeito in vitro da N-acetilcisteína e da Coenzima Q10 sobre o dano ao DNA em fibroblastos derivados de pacientes com a doença de Niemann-Pick tipo C.

3.5 *Capítulo 5: Resultados preliminares da determinação de genótipo e haplótipo em pacientes brasileiros portadores da doença de Niemann-Pick Tipo C*

Trabalho realizado durante missão de estudos no exterior, a ser submetido à revista científica.

O capítulo V, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as 133-141, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta da descrição da investigação dos haplótipos apresentados pelos pacientes com a doença de Niemann-Pick tipo C para o gene *NPCI*.

PARTE III

Discussão e Conclusões

4 DISCUSSÃO

As principais características neurológicas apresentadas pelos pacientes com NP-C são vacuolização citoplasmática neuronal generalizada, distrofia neuroaxonal e perda neuronal principalmente das células de Purkinje, formação de meganeurito nos neurônios piramidais corticais e dendritogênese ectópica, gliose e neuroinflamação, devido ao acúmulo de colesterol intracelular e armazenamento ganglionar (STEIN *et al.*, 2012). Estes achados se refletem em uma sintomatologia ampla e heterogênea, como ataxia, paralisia supranuclear vertical do olhar, distonia, disfagia, declínio intelectual e convulsões (PLATT *et al.*, 2018b). Bioquimicamente, esses pacientes apresentam um acúmulo intracelular de colesterol, esfingosina e gangliosídeos (GM1, GM2 e GM3) no compartimento endossomal/lisossomal de diversos tipos celulares, tendo como consequência disfunção mitocondrial e ativação do sistema imune, levando à exacerbação do processo inflamatório (PLATT *et al.*, 2018b).

A inflamação é um processo fisiológico e integrante do sistema imune, com a função de proteger o organismo frente a potenciais micro-organismos patógenos, como vírus e bactérias, ou outros estímulos potencialmente danosos. Todavia o estímulo do processo inflamatório de forma crônica é potencialmente prejudicial, podendo levar a dano tecidual nas regiões afetadas e causar danos ao bom funcionamento do corpo como um todo (ALAM *et al.*, 2016). Neuroinflamação é um termo usado para descrever a ampla gama de respostas imunológicas do SNC, diferindo da inflamação periférica em vários aspectos, principalmente no que diz respeito às principais células envolvidas (como micróglia e astrócitos) (LYMAN *et al.*, 2014). Citocinas são proteínas de sinalização celular que medeiam a neuroinflamação, causando sua exacerbação ou inibição. Citocinas como a IL-1 e o TNF sabidamente possuem ações pró-inflamatórias, levando ao aceleração da progressão da doença, enquanto outras interleucinas, como a IL-10 e IL-4 agem através de um efeito anti-inflamatório (OPAL; DEPALO, 2000).

Os neurônios são extremamente sensíveis aos processos inflamatórios, uma vez que essas células não possuem a capacidade de se dividir e regenerar após uma lesão, e por essa razão é que a neuroinflamação exerce um papel muito importante na patologia de diversas doenças neurodegenerativas, como Alzheimer, Parkinson, e algumas DLDs com envolvimento neurológico (AKIYAMA *et al.*, 2000; BOSCH; KIELIAN, 2015; HIRSCH; HUNOT, 2009).

O presente trabalho foi elaborado a partir da investigação de possíveis alterações no perfil inflamatório e dano oxidativo que os pacientes NP-C apresentam, bem como da análise de biomarcadores plasmáticos de dano neurodegenerativo. Também avaliamos o efeito do tratamento específico utilizado para essa doença, miglustate, na produção destes metabólitos. Além disso, investigamos o efeito *in vitro* da β -ciclodextrina nanoparticulada (NS β -CD) e dos antioxidantes NAC e CoQ10 sobre as culturas de fibroblastos destes pacientes a fim de verificar o possível benefício desses fármacos sobre o acúmulo de colesterol, nos parâmetros de estresse oxidativo e de dano mitocondrial.

Apesar dos mecanismos pelos quais o dano neurológico ocorre na NP-C não estarem completamente explicados, diversos estudos têm surgido para tentar esclarecer a fisiopatologia dessa doença e como se dá sua progressão. Pesquisas já relacionaram o acúmulo de colesterol e glicosfingolípídeos nos lisossomos com a desregulação da imunidade inata, tanto a nível periférico quanto central, contribuindo para a ativação crônica do estado inflamatório e consequente destruição tecidual estendida (PLATT *et al.*, 2016). A ativação da micróglia com consequente aumento da produção de TNF- α e IL-1 β causa apoptose em diferentes regiões cerebrais de camundongos *NPC^{-/-}*, levando à perda neuronal no estriado, tálamo, substância negra, neocórtex e cerebelo (BAUDRY *et al.*, 2003). Peake e colaboradores não encontraram diferença na expressão de genes de citocinas inflamatórias e de proteínas envolvidas com a resposta ao estresse oxidativo em culturas primárias de micróglia de camundongos *NPC^{-/-}*,

indicando que somente a ativação da micróglia não é suficiente para levar à morte neuronal (PEAKE *et al.*, 2011). Os astrócitos desempenham um papel de forma mais tardia nesse processo, o qual está mais associado com a resposta à morte neuronal prévia. O tratamento com anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs), em combinação com miglustate e curcumina se mostrou benéfico ao reduzir a ativação microglial e a morte de células de Purkinje, além de aumentar a sobrevivência de camundongos NPC^{-/-} (WILLIAMS *et al.*, 2014). A molécula 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina (HP β CD) também tem se mostrado eficaz em modelos animais de NP-C, diminuindo a ativação de micróglia e astrócitos através da redução de colesterol e gangliosídeos acumulados no cerebelo de felinos (VITE *et al.*, 2015). Todos esses estudos evidenciam o efeito da neuroinflamação na fisiopatologia da NP-C, contudo os mecanismos pelos quais ocorre o dano neuronal não estão totalmente elucidados.

No primeiro capítulo desse trabalho foi verificado um aumento da produção de citocinas IL-6, IL-8 e IL-10 em pacientes NP-C no momento do diagnóstico, bem como uma diminuição significativa das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, TNF- α e da anti-inflamatória IL-10 no plasma de pacientes NP-C tratados com miglustate quando comparados com indivíduos saudáveis. A IL-10 é uma citocina secretada pelo linfócito Th2 e possui uma potente ação anti-inflamatória e equilibra a resposta imune para prevenir doenças advindas da inflamação crônica agindo nas respostas imunes inata e adaptativa (PORRO; CIANCIULLI; PANARO, 2020). Shin e colaboradores demonstraram que o padrão atípico de sinalização do interferon é ativado no cerebelo de camundongos *Npc1*^{-/-} mostrando-se como um dos principais mediadores inflamatórios na doença (SHIN *et al.*, 2019a). Outro estudo avaliando genes inflamatórios em camundongos *Npc1*^{-/-} mostrou que a expressão de IL1- β , Ccl3, Ccl8, C3, Cxcl9 e Cxcl10 está aumentada no córtex cerebral desses animais, embora a análise no LCR de pacientes NP-C tenha mostrado uma diminuição na produção de várias citocinas, como IL-4, IL-10 e IL-16 (COLOGNA *et al.*, 2014). Vale ressaltar que nosso

trabalho relata pela primeira vez na literatura um aumento de interleucinas pró-inflamatórias no plasma e fibroblastos de pacientes com NP-C. Esse efeito pode ser devido ao acúmulo de colesterol e gangliosídeos que esses indivíduos apresentam. Sabe-se que o miglustate tem efeito anti-inflamatório, pois diminuiu a ativação e expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal classe II (MHC classe II), bem como a ativação microglial em modelo de camundongo de gangliosidose GM2 (VITNER; FUTERMAN; PLATT, 2015). Dessa forma, podemos levantar a hipótese de que o tratamento atual com miglustate é capaz de mitigar a inflamação crônica observada nesse distúrbio.

Os benefícios de uma terapia adjuvante para NP-C têm sido objeto de estudo em diversas pesquisas, e os antioxidantes aparecem em relatos na literatura como candidatos promissores a desempenhar esse papel, como a NAC, o α -tocoferol e a curcumina (LONG et al., 2016; MARÍN et al., 2014; SMITH et al., 2009; TORRES et al., 2017; YU et al., 2014). Em nosso estudo optamos por avaliar dois fármacos que conhecidamente possuem ação antioxidante, além de se mostrarem deficientes nos pacientes portadores de NP-C: a NAC e a CoQ10. A NAC é a forma acetilada do aminoácido cisteína, e possui ação como sequestrador de ERO, regulando as reações redox e, conseqüentemente, alterando a sinalização celular (FU et al., 2013). Além disso, a suplementação com NAC aumenta os níveis de GSH, composto importante no processo de detoxificação de xenobióticos e espécies reativas (SAMUNI et al., 2013). Já a CoQ10 é uma proteína que faz parte, entre outras funções, da cadeia transportadora de elétrons, participando ativamente da geração de ATP pela célula, além de agir como um antioxidante lipofílico no ambiente intracelular (CRANE, 2007). Estudos já demonstraram que a deficiência de CoQ10 é um achado importante em alguns EIMs, como PKU e outras aminoacidopatias, MPSs e acidemias orgânicas (MONTERO et al., 2019). Também se tem relatos na literatura de deficiência de CoQ10 em plasma de

pacientes NP-C, deficiência essa, que não teve melhora após suplementação com NAC (FU et al., 2013).

Posto isso, verificamos o efeito *in vitro* dos antioxidantes sobre o acúmulo de colesterol em fibroblastos oriundos de pacientes NP-C. Utilizando a coloração de Filipin e quantificando o colesterol não esterificado utilizando software de análise de imagem conseguimos constatar que ambos os fármacos estudados, NAC e CoQ10, tiveram efeito de redução no acúmulo desse metabólito nos fibroblastos em todas as concentrações empregadas (NAC 1 e 2,5 mM; CoQ10 5 e 10 μ M), tendo as doses maiores reduzido os níveis de colesterol a nível de controle saudável. O exato mecanismo pelo qual essas substâncias estão causando a diminuição do colesterol nas células desses indivíduos ainda não está claro, entretanto alguns benefícios desses antioxidantes podem ser explicados. Estudos já relataram vantagens da NAC em doenças cardiovasculares e diabetes mellitus tipo 1 em modelos animais, com diminuição da biossíntese de colesterol (KAGA et al., 2018), bem como o aumento do colesterol esterificado em camundongos *Npc1*^{-/-} (FU et al., 2013). A CoQ10 tem a sua biossíntese em rota metabólica conjunta com o colesterol, e essa pode ser uma das razões pelas quais essa proteína se encontra deficiente em pacientes NP-C (STEPIEN et al., 2020). O modo como a CoQ10 contribui com a redução do acúmulo de colesterol pode estar relacionado com sua ação de antioxidante lipofílico, uma vez que já foi observado um efeito similar em fibroblastos de pacientes com MPS III, onde a administração de um coquetel contendo CoQ10 foi capaz de diminuir o acúmulo de glicosaminoglicanos (GAGs) (MATALONGA et al., 2014). Uma vez que compostos antioxidantes podem exercer efeito de inibição da HMG-CoA sintase, NAC e CoQ10 podem estar diminuindo o acúmulo de colesterol por esse mecanismo (PEREIRA BRAGA et al., 2013). Dando sequência nas análises *in vitro*, verificamos o efeito dos antioxidantes estudados sobre a produção de citocinas. Nós encontramos níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-8 e TNF- α) em fibroblastos de

pacientes com NP-C e o tratamento *in vitro* com NAC a 2,5 mM foi capaz de reverter essa alteração. Recentemente, uma revisão da literatura mostrou evidências de que a NAC tem potencial terapêutico na diminuição da ativação imune e da tempestade de citocinas resultante, podendo ser usada para gerenciar infecções por SARS-COV 2 (MOHANTY *et al.*, 2021). Em outro estudo *in vitro*, agora usando células humanas, foi visto que a NAC inibe as citocinas inflamatórias TNF α , IL-1 β e IL-6 em macrófagos ativados por LPS sob condições oxidativas leves (PALACIO; MARKERT; MARTÍNEZ, 2011). Considerando esse cenário, podemos hipotetizar que o aumento observado de citocinas pró-inflamatórias em fibroblastos de pacientes com NP-C pode ser influenciado pelo estresse oxidativo, uma vez que o tratamento *in vitro* com o antioxidante NAC foi capaz de diminuir os níveis de IL-6 e TNF α . Ainda assim, mais análises precisam ser feitas para investigar como se dá o benefício do uso desses fármacos sobre o acúmulo de colesterol em fibroblastos de pacientes NP-C, bem como do potencial efeito anti-inflamatório da NAC.

No segundo capítulo desta tese, abordamos os aspectos de dano oxidativo, mitocondrial e ao DNA em pacientes com NP-C, bem como o efeito *in vitro* da NAC, CoQ10 e NS β -CD sob o acúmulo de colesterol e a produção de superóxido pela mitocôndria, em fibroblastos destes indivíduos. Nós pudemos verificar que os pacientes NP-C possuem um desbalanço no sistema redox, uma vez que apresentaram níveis aumentados de isoprostanos urinários, importante marcador de lipoperoxidação, e de nitrito + nitrato (NO $_3^-$ + NO $_2^-$) plasmáticos, o que implica o aumento na produção de NO e por consequência de dano tecidual. Nós também verificamos, através do ensaio de cometa alcalino, que os pacientes possuem dano ao DNA quando comparados à indivíduos saudáveis. O aumento do dano à lipídios e ao DNA podem ser atribuídos ao aumento na produção de espécies reativas nesses pacientes. Além das ERO, ERN também podem ser danosas às biomoléculas. O NO $^-$, por exemplo, apesar de possuir funções importantes no organismo como segundo mensageiro em algumas

vias de sinalização, quando em contato com O_2^- , pode gerar $ONOO^-$, que, por sua vez, é altamente reativo e pode levar a nitrosilação de aminoácidos e perda de função e atividade de proteínas e enzimas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

Para determinar a eficácia dos tratamentos (NAC e CoQ10) em reduzir o colesterol acumulado nos lisossomos, estes foram incubados com os fibroblastos de pacientes NP-C (ou indivíduos saudáveis, para fins de comparação) e, após 48 horas, as células foram coradas pelo reagente de Filipin. A intensidade de fluorescência conferida por este reagente é proporcional ao colesterol não-esterificado presente no interior dos lisossomos. Em um primeiro momento, comparando-se os tratamentos em células de pacientes NP-C e controles saudáveis podemos perceber que os únicos tratamentos capazes de reverter os valores de fluorescência aos valores apresentados por indivíduos controle foram as combinações da nanopartícula contendo β -CD com os antioxidantes NAC e CoQ10. Estes resultados demonstram que os antioxidantes são capazes de potencializar a ação das NS β -CD como redutoras de colesterol não esterificado em lisossomos de pacientes NP-C. Além disso, ao analisar os tratamentos em células NP-C, pode-se concluir que a nanopartícula “branca” (NS) não tem ação no colesterol acumulado, entretanto, todos os outros tratamentos são benéficos para a redução do colesterol, sendo que as NS β -CD sozinhas ou juntamente com os antioxidantes parecem exercer a maior eficácia *in vitro*. Além disso, a formulação da NS β -CD já se demonstrou capaz de atingir o cérebro de camundongos, ao contrário da β -CD livre, surgindo como uma vantagem tecnológica no tratamento do comprometimento cerebral na doença NP-C (DONIDA *et al.*, 2020).

É importante destacar que o efeito adverso mais grave relatado com o tratamento com β -CD é a ototoxicidade, tanto em modelo animal quanto em pacientes com NP-C que usaram esse composto (CRUMLING; KING; DUNCAN, 2017). Os mecanismos exatos da ototoxicidade ainda são desconhecidos, mas algumas possibilidades foram levantadas, sugerindo que as ciclodextrinas podem atuar sobre vários alvos, como

canais iônicos, junções estreitas, integridade da membrana e bioenergética mitocondrial, resultando na perda preferencial das células ciliadas externas cocleares (CRUMLING; KING; DUNCAN, 2017). A disfunção mitocondrial está associada à perda auditiva neurossensorial, como a perda auditiva relacionada à idade, perda auditiva induzida por ruído e ototoxicidade por drogas, bem como perda auditiva devido à mutação genética mitocondrial. As mitocôndrias são as principais fontes EROs, e o estresse oxidativo induzido por EROs está envolvido no dano coclear. Além disso, a liberação de EROs causa mais danos aos componentes mitocondriais (FUJIMOTO; YAMASOBA, 2019). Considerando o exposto, avaliamos os níveis de estresse oxidativo das mitocôndrias, parâmetro fundamental para a saúde ou lesão celular, em fibroblastos dérmicos saudáveis após as 48 h de tratamento com NS β -CD, os antioxidantes NAC na concentração de 5mM e CoQ10 na concentração de 10 μ M e a combinação dos tratamentos. Os resultados de determinação de superóxido mitocondrial demonstram que, tanto as nanopartículas contendo β -CD, quanto a combinação entre as NS β -CD com os antioxidantes foram capazes de reduzir os valores de estresse oxidativo mitocondrial. Interessantemente a β -CD livre não teve a capacidade de atuar na redução de superóxido, demonstrando que a nanopartícula tem vantagem tecnológica frente à utilização da molécula bioativa livre.

Um artigo recentemente publicado (BALBOA *et al.*, 2017) relatou pela primeira vez que a expressão de MLN64 (proteína da membrana endossômica tardia que se liga ao colesterol, implicada no transporte do colesterol das membranas endossômicas para a membrana plasmática e/ou mitocôndrias) é aumentada nas células NP-C, o que sugere que ela poderia estar causando um acúmulo de colesterol não só lisossomal, mas também mitocondrial. Sendo assim, salienta-se a importância dos resultados obtidos com o presente estudo, demonstrados pelos efeitos sinérgicos dos tratamentos com as NS β -CD e os antioxidantes. A nanopartícula atuando na redução do colesterol e os antioxidantes na redução do estresse oxidativo mitocondrial (evidenciado pela

produção de superóxido mitocondrial). Além disso, cabe salientar que a NAC utilizada pode ter exercido seu efeito através da restauração dos níveis de glutathiona reduzida, que parecem estar reduzidos, uma vez que é precursora desse composto (TORRES *et al.*, 2017).

Como seguimento do estudo, analisamos os efeitos dos antioxidantes NAC e CoQ10 sobre o dano ao DNA em fibroblastos dos pacientes NP-C, através do ensaio do cometa alcalino. Foi possível observar que o dano ao DNA é maior nos pacientes NP-C em comparação com indivíduos saudáveis, e que os dois antioxidantes agiram de forma a reduzir esse prejuízo nas duas concentrações utilizadas. As biomoléculas são particularmente sensíveis ao ataque de EROs, e, uma vez que os mecanismos de defesa contra agentes oxidantes não estão funcionando de forma correta, podem ocorrer quebras de fitas simples ou duplas no DNA, causando lesões que podem levar a instabilidades genômicas e por fim tumorigênese (SOUTO *et al.*, 2020). Diversos estudos já relataram que há dano ao DNA em alguns EIMs, como doença de Fabry, MPS II, PKU e acidemia 3-hidroxi-3-metilglutárica (BIANCINI *et al.*, 2015; DELGADO *et al.*, 2019; DEON *et al.*, 2015; DIAZ JACQUES *et al.*, 2018), ademais é a primeira vez que se tem relato de dano ao DNA em fibroblastos de pacientes NP-C. Embora o ensaio cometa não seja capaz de informar o tipo de dano que o DNA sofreu para ocorrer a lesão observada, podemos inferir que o agente causador é oxidativo, uma vez que os tratamentos com NAC e CoQ10 forma capazes de minimizar esse dano, de acordo com os resultados que encontramos no capítulo 4 desta tese. Esse efeito pode ser devido à diminuição das espécies reativas induzidas por NAC e CoQ10, uma vez que já foi descrito que pacientes com NP-C apresentam aumento de marcadores periféricos de estresse oxidativo como espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS, indica dano lipídico) e proteínas carboniladas, como uma diminuição nas defesas antioxidantes, determinado pelo estado antioxidante total (TAS) no plasma de pacientes NP-C não tratados (RIBAS *et al.*, 2012). Além disso, o

efeito antioxidante do NAC diminui a produção de ROS e inibe a formação de *foam cells* (um achado precoce da aterosclerose) em estudos *in vitro*, modulando a expressão de genes envolvidos na resposta ao dano oxidativo e agressão ao DNA (SUNG *et al.*, 2012). Vários efeitos benéficos da CoQ10 em danos ao DNA já foram relatados na literatura. A suplementação dessa molécula em indivíduos saudáveis diminuiu a frequência de quebra da fita de DNA em linfócitos (TOMASETTI; ALLEVA; COLLINS, 2001), além de diminuir a frequência de micronúcleos em pacientes com doenças mitocondriais (MIGLIORE *et al.*, 2004). Além disso, os níveis elevados de isoprostanos e $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ encontrado nos pacientes NP-C indicam que há um aumento na produção de espécies reativas, que é responsável pelo dano observado nessas biomoléculas.

Levando em consideração que tanto NAC quanto CoQ10 diminuam o acúmulo de colesterol, e ambos possuem uma ação antioxidante bem estabelecida, podemos presumir que a minimização do dano ao DNA observado nos fibroblastos tratados *in vitro* com esses fármacos possa ter ocorrido de duas formas: através da redução do colesterol, melhorando o tráfego celular e proporcionando um ambiente menos oxidativo a nível celular desses pacientes e/ou pela redução de EROs.

Os mecanismos que levam ao dano cerebral em pacientes NP-C ainda não estão bem elucidados. Nos últimos anos vários estudos se propuseram a levantar hipóteses de como que isso ocorre, a fim de tentar explicar as manifestações neurológicas observadas nesses indivíduos. Essas hipóteses incluem formação de agregados neurofibrilares de proteína Tau, desmielinização do corpo caloso, ativação da micróglia e de astrócitos, levando à neuroinflamação e presença de estresse oxidativo (AUER *et al.*, 1995; COLOGNA *et al.*, 2014; DAVIES-THOMPSON *et al.*, 2016; FU *et al.*, 2010; GERMAN *et al.*, 2002; RIBAS *et al.*, 2012).

Existe uma crescente no número de estudos explicando o papel do estresse oxidativo em desordens neurodegenerativas, como nas doenças de Alzheimer,

Parkinson e esclerose múltipla (BUTTERFIELD; HALLIWELL, 2019; KIM *et al.*, 2020; ZAIDI *et al.*, 2020). Em outras doenças de caráter crônico sem envolvimento do sistema neurológico, como a artrite reumatoide, o diabetes mellitus e as doenças cardiovasculares, há evidências do efeito do desequilíbrio redox na fisiopatologia das mesmas (BASSU *et al.*, 2020; SHARIF *et al.*, 2020; WAYHS *et al.*, 2014). Entre essas doenças temos os EIM, onde diversos estudos já descreveram os efeitos do estresse oxidativo e sua relação com os danos neurológicos encontrados nesses pacientes. Essas pesquisas têm como objetivo entender os mecanismos que levam à neurodegeneração e descobrir novas abordagens terapêuticas que possam colaborar para uma melhora no prognóstico das doenças (DONIDA *et al.*, 2020; GUERREIRO *et al.*, 2018, 2020; JACQUES *et al.*, 2016). Recentemente diversas pesquisas envolvendo doenças neurodegenerativas têm focado em encontrar indicadores de neurodegeneração no plasma, com o intuito de desvendar como a deterioração neuronal ocorre, bem como descobrir novos biomarcadores nessas enfermidades. Nesse sentido algumas moléculas têm se mostrado úteis, como BDNF, Catepsina D, VCAM, NCAM, PDGF e PAI-1 (GERENU *et al.*, 2017; GUERREIRO *et al.*, 2020; REULAND; CHURCH, 2020; SCAINI *et al.*, 2018), as quais foram então analisadas no plasma dos pacientes com NP-C de nosso estudo.

Dessa forma, no terceiro capítulo dessa tese nós investigamos os níveis de marcadores periféricos de neurodegeneração em pacientes NP-C, bem como a possível relação desses metabólitos com os níveis de oxiesteróis, o genótipo e a clínica apresentados por esses indivíduos. Primeiramente pudemos observar que os níveis de $3\beta,5\alpha,6\beta$ -tríol não diferiram dos indivíduos saudáveis, e estão dentro dos valores de referência para esse metabólito, isso devido ao tratamento com miglustate que contribui para a normalização destes níveis (HAMMERSCHMIDT *et al.*, 2018). Além disso, neste estudo, investigamos a mutação causal em pacientes com NP-C usando a tecnologia de sequenciamento de nova geração (*next generation sequencing* – NGS)

em parceria com o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, na cidade do Porto, em Portugal. Como resultado, a partir do fluxo de trabalho de sequenciamento direcionado, encontramos uma variante homozigótica causadora de doença conhecida no gene *NPC1* em dois pacientes relacionados, P1 e P2 (c.C3019G:p.P1007A); no paciente P5 identificamos a variante c.G2974C:p.G992R em heterozigose composta com mutação c.C3104T:p.A1035V. Para os pacientes P3 e P4 encontramos apenas um alelo mutado (c.C3019G:p.P1007A). As variantes foram confirmadas por sequenciamento de Sanger e não foram detectadas mutações no gene *NPC2*.

Encontramos também uma diminuição significativa dos níveis plasmáticos de PDGF-AA e PAI-1 em pacientes NPC tratados com miglustate quando comparados com indivíduos saudáveis. O PDGF-AA é um dos fatores de crescimento secretados pela astrogliia, e é responsável pela diferenciação e maturação de oligodendrócitos a partir de células-tronco neurais, que irão auxiliar na formação da bainha de mielina no SNC (SCHEUER *et al.*, 2019). A redução dos níveis de PDGF-AA indica uma diminuição da proliferação de oligodendrócitos, levando a baixa produção de mielina (HU *et al.*, 2008). A desmielinização é um achado importante em diversos EIM que possuem envolvimento neurológico, como é o caso da acidemia glutárica tipo I (AGI), Síndrome de Hunter, mucopolissacaridose tipo I (MPS I) e adrenoleucodistrofia ligada ao X (X-ALD) (OKANE *et al.*, 1998; OLIVERA-BRAVO *et al.*, 2016; SAUTE *et al.*, 2016), bem como na esclerose múltipla (GOVINDARAJAN; DE RIVERO VACCARI; KEANE, 2020). Alguns estudos demonstram que há uma perda de mielina em pacientes e em modelos animais de NP-C, que pode estar relacionada com o processo de morte neuronal (GABANDÉ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2019; KODACHI *et al.*, 2017a; TANG; LI; LIU, 2010). A partir dos nossos resultados, podemos inferir que a desmielinização observada nos pacientes NP-C pode estar relacionada com a redução dos níveis de PDGF-AA, visto que a proliferação de oligodendrócitos produtores de mielina está condicionada à liberação desse fator de crescimento. Na doença de

Parkinson existem estudos que relacionam o aumento plasmático de PAI-1 com a agregação da proteína α -sinucleína, formando os corpos de Lewy que são responsáveis pela morte de neurônios, além de contribuir para a neuroinflamação (REULAND; CHURCH, 2020). Outrossim, a diminuição dos níveis plasmáticos de PAI-1 que encontramos em pacientes NP-C pode ser atribuída à redução da produção de citocinas vista nesses indivíduos, devido ao tratamento com miglustate

Em nosso estudo não encontramos diferença entre pacientes e indivíduos saudáveis para BDNF, NCAM, PDGF-AB/BB e Catepsina-D, e esse resultado pode ser devido a um efeito indireto do tratamento com miglustate. Chao e colegas mostraram que o miglustate melhora, em modelo animal, a encefalomielite autoimune progressiva crônica experimental (EAE), através da modulação da função dos astrócitos (CHAO *et al.*, 2019). A lactosilceramida (LacCer), um glicosíngolípídeo acumulado na NP-C, aumenta a atividade enzimática da fosfolipase A2 (cPLA2), bem como a ativação de NF- κ B, levando a um aumento da expressão gênica pró-inflamatória em astrócitos ativados de murinos e humanos. Assim, a sinalização LacCer-cPLA2 impulsiona a transcrição pró-inflamatória dependente de NF- κ B em astrócitos (CHAO *et al.*, 2019). O miglustate também mostrou um papel protetor sobre o estresse oxidativo em pacientes com NP-C, sendo capaz de prevenir a peroxidação lipídica e melhorar o status antioxidante nesses indivíduos (RIBAS *et al.*, 2016), além de diminuir a produção de oxisteróis (HAMMERSCHMIDT *et al.*, 2018). Dessa forma, podemos hipotetizar que o uso de miglustate diminui os níveis de LacCer no SNC dos pacientes NP-C estudados, o que poderia levar a uma inibição da neuroinflamação e neurodegeneração. Além disso, o miglustate provavelmente induz uma melhora global nos níveis de marcadores de neurodegeneração plasmáticos ao diminuir os oxisteróis, envolvidos no processo de estresse oxidativo.

Diversas variantes patogênicas no gene *NPCI* estão envolvidas com as manifestações da NP-C, e alguns autores estudaram as possíveis correlações

genótipo/fenótipo para essa doença (SHAMMAS *et al.*, 2019). A análise de polimorfismos de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphisms* – SNP) surge como opção metodológica para auxiliar a estabelecer essa relação (MORRIS *et al.*, 1999). Dessa forma, no quinto capítulo desta tese nós realizamos a análise do genótipo de 3 pacientes não relacionados utilizando a moderna técnica de NGS, que nos permite, além de determinar a variante patogênica responsável pelo aparecimento da NP-C no gene *NPC1*, identificar os SNPs que estão relacionados com o fenótipo desta doença (FERNANDEZ-VALERO *et al.*, 2005).

Nós identificamos três variantes patogênicas diferentes no gene NP-C1 dos pacientes analisados, previamente descritas. Em um dos indivíduos estudados não foi possível identificar o segundo alelo mutado pelo método de NGS. Além disso, analisamos os seguintes SNPs: Y129Y, H215R, M642I, I858V e N931N. De modo preliminar nós podemos identificar que existe somente um haplótipo quando analisamos os SNPs que investigamos para a variante p.Pro1007Ala. Ao analisar os resultados obtidos, identificamos o mesmo padrão de SNPs para os 2 pacientes que possuem essa variante. Isso nos leva a crer que essa mutação pode ter uma origem comum, visto que esses indivíduos não relacionados apresentam os mesmos polimorfismos. Entretanto, quanto às outras variantes encontradas não podemos estabelecer correlações com os SNPs, visto que só identificamos um alelo de cada uma.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesta tese permitem concluir que:

5.1 Capítulo 1:

- Pacientes portadores de NP-C apresentam níveis mais elevados de citocinas pró-inflamatórias no momento do diagnóstico da doença, demonstrado pela primeira vez em nosso estudo.

- O tratamento atual com Miglustat foi capaz de normalizar as alterações das citocinas, provavelmente devido ao seu efeito anti-inflamatório.

- Análises *in vitro* nos permitiram verificar preliminarmente os benefícios de uma terapia adjuvante em pacientes com NP-C. Ambas as drogas, NAC e CoQ10, apresentaram bons resultados nos parâmetros avaliados, reduzindo o acúmulo intracelular de colesterol não esterificado.

- Para a NAC também foi demonstrada uma proteção frente ao processo inflamatório, uma vez que as citocinas IL-6 e TNF- α foram reduzidas em fibroblastos de pacientes com NP-C após o tratamento *in vitro*.

5.2 Capítulo 2:

- Pacientes portadores de NP-C apresentam um desequilíbrio redox, uma vez que possuem um aumento no dano ao DNA em comparação com indivíduos saudáveis, bem como elevados níveis de lipoperoxidação e estresse nitrativo, o que pode contribuir para a fisiopatologia desta doença.

- Fibroblastos de pacientes com doença NP-C apresentaram diminuição do colesterol lisossomal acumulado quando submetidos ao tratamento *in vitro* com NS β -CD e antioxidantes NAC e CoQ10 combinados.

- Foi verificado um efeito sinérgico da NS β -CD e dos antioxidantes na redução da produção de superóxido mitocondrial, mostrando um efeito benéfico na função mitocondrial.

5.3 Capítulo 3:

- Foi demonstrado, pela primeira vez, que os pacientes com NP-C apresentam baixos níveis de PAI-1 TOTAL e PDGF-AA comparados a indivíduos saudáveis.

- Não foi observada alteração nos níveis plasmáticos de Catepsina-D, BDNF, PDGF-AB/BB e NCAM, provavelmente secundária ao tratamento com miglustat, uma terapia capaz de retardar a progressão dos sintomas neurológicos em pacientes com NP-C.

- A análise de biomarcadores de neurodegeneração surge como alternativa para avaliar a progressão da NP-C, e o crescente conhecimento desses mecanismos pode contribuir compreender melhor as consequências patológicas do comprometimento neurológico causado por esse grave distúrbio.

5.4 Capítulo 4:

- Fibroblastos de pacientes NP-C apresentam dano ao DNA determinado pelo ensaio cometa.

- O dano ao DNA foi mitigado pelo tratamento *in vitro* com NAC e CoQ10, nas concentrações estudadas.

- A proteção contra o dano ao DNA pode ser atribuída ao efeito antioxidante dessas moléculas, que ao reduzir as espécies reativas, ou impedir sua formação, protegem os ácidos nucleicos desse tipo de agressão.

- Ao diminuir a quantidade de colesterol, NAC e CoQ10 também proporcionam um ambiente menos favorável à oxidação em nível celular, levando a uma melhora no estado bioquímico como um todo.

5.5 *Capítulo 5:*

- Foram identificadas 3 variantes patogênicas diferentes para o gene *NPCI* nos pacientes recrutados para o estudo.

- Para a variante mais frequente foi visualizada um haplótipo em comum ao analisar 5 SNPs importantes para a apresentação clínica da NP-C.

- Esse único haplótipo pode nos indicar uma possível ancestralidade comum dessa variante, entretanto mais estudos são necessários para confirmar esse achado.

5.6 *Conclusão geral*

Em conjunto, os dados apresentados nesta tese sugerem que os pacientes NP-C apresentam um desequilíbrio do *status* redox e um processo inflamatório no momento do diagnóstico, e que o tratamento atual (miglustate) é capaz de normalizar as alterações das citocinas, provavelmente devido ao seu efeito anti-inflamatório. Os tratamentos *in vitro* com NS β -CD, NAC e CoQ10 tiveram resultados promissores ao diminuir o acúmulo de colesterol em fibroblastos de pacientes NP-C. Além disso, encontramos um aumento do dano ao DNA nestes pacientes, e ambos os antioxidantes, NAC e CoQ10, foram capazes de reverter esse dano. Tanto os tratamentos com os antioxidantes, quanto a NS β -CD e o as combinações destes fármacos se mostraram eficazes em diminuir a produção de superóxido mitocondrial. Todos esses tratamentos surgem como terapias promissoras para a doença NP-C. Apesar de algumas limitações do nosso trabalho, como um pequeno número de pacientes e a ausência de um grupo

NP-C não tratado, nossos resultados sugerem que a análise de biomarcadores de neurodegeneração pode ter utilidade clínica, e que o crescente conhecimento desses mecanismos possa contribuir para melhor compreender as consequências patológicas do comprometimento neurológico causado por esse grave distúrbio. A fim de melhor desvendar os mecanismos pelos quais a NS β -CD, NAC e CoQ10 estão agindo, e correlacionar com os achados *in vitro*, estudos em modelo animal de NP-C serão promissores.

6 PERSPECTIVAS

Pretendemos dar continuidade a este trabalho, avaliando os seguintes parâmetros de estresse oxidativo e inflamação no tecido cerebral e no sangue em modelo animal químico de NP-C, utilizando U18666A, um agente inibidor no transporte de colesterol:

- Avaliar os efeitos dos tratamentos com NS β -CD, NAC e CoQ10 sobre o acúmulo de colesterol no córtex e hipocampo dos animais;
- Avaliar parâmetros de estresse oxidativo, tais como a quantificação de EROs utilizando o marcador 2,7-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) e a sonda mitocondrial MitoSox; quantificar os níveis de proteínas carboniladas e de sulfidrilas em tecido cerebral dos animais; avaliar a lipoperoxidação através dos níveis de TBARS;
- Avaliar o perfil inflamatório em amostras de córtex e hipocampo dos animais, através da dosagem das citocinas pró e anti-inflamatórias IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ , TNF- α e avaliar os efeitos da NS β -CD, NAC e CoQ10 frente a inflamação.

Também vamos realizar um estudo haplotípico mais aprofundado, ao aumentar o número de indivíduos brasileiros e adicionar os pacientes portugueses, bem como analisar o perfil dos SNPs estudados para a variante mais comum em ambas as populações, a fim de estabelecer se há uma relação de efeito fundador entre estas.

7 REFERÊNCIAS

ABI-MOSLEH, Lina *et al.* Cyclodextrin overcomes deficient lysosome-to-endoplasmic reticulum transport of cholesterol in Niemann-Pick type C cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 106, n. 46, 2009.

AKIYAMA, Haruhiko *et al.* Inflammation and Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, [s. l.], v. 21, n. 3, p. 383–421, 2000. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S019745800000124X>.

ALAM, Qamre *et al.* Inflammatory Process in Alzheimer's and Parkinson's Diseases: Central Role of Cytokines. **Current Pharmaceutical Design**, [s. l.], v. 22, n. 5, p. 541–548, 2016.

AQUL, Amal *et al.* Unesterified Cholesterol Accumulation in Late Endosomes/Lysosomes Causes Neurodegeneration and Is Prevented by Driving Cholesterol Export from This Compartment. **The Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 31, n. 25, p. 9404 LP – 9413, 2011. Disponível em: <http://www.jneurosci.org/content/31/25/9404.abstract>.

ARAÚJO, APQC. Psychiatric features of metabolic disorders. **Revista de Psiquiatria Clínica**, [s. l.], v. 31, n. 6, p. 285–289, 2004.

AUER, I. A. *et al.* Paired helical filament tau (PHFtau) in Niemann-Pick type C disease is similar to PHFtau in Alzheimer's disease. **Acta Neuropathologica**, [s. l.], 1995.

BALBOA, Elisa *et al.* MLN64 induces mitochondrial dysfunction associated with increased mitochondrial cholesterol content. **Redox Biology**, [s. l.], v. 12, 2017.

BARSchak, Alethéa G *et al.* Erythrocyte glutathione peroxidase activity and plasma selenium concentration are reduced in maple syrup urine disease patients during treatment. **International Journal of Developmental Neuroscience**, [s. l.], v. 25, n. 5, p. 335–338, 2007.

BASSU, Stefania *et al.* Oxidative Stress Biomarkers and Peripheral Endothelial Dysfunction in Rheumatoid Arthritis: A Monocentric Cross-Sectional Case-Control Study. **Molecules**, [s. l.], v. 25, n. 17, p. 3855, 2020.

BAUDRY, Michel *et al.* Postnatal development of inflammation in a murine model of Niemann-Pick type C disease: Immunohistochemical observations of microglia and astroglia. **Experimental Neurology**, [s. l.], 2003.

BECKMAN, KB; AMES, BN. The free radical theory of aging matures. **Physiol Rev**, [s. l.], v. 78, n. 2, p. 547–581, 1998.

BENES, Petr; VETVICKA, Vaclav; FUSEK, Martin. Cathepsin D—Many functions of one aspartic protease. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, [s. l.], v. 68, n. 1, p. 12–28, 2008. Disponível em: Acesso em: 2 jun. 2022.

BEN-MENACHEM, Elinor; KYLLERMAN, Mårten; MARKLUND, Stefan. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase function in progressive myoclonus epilepsies. **Epilepsy Research**, [s. l.], v. 40, n. 1, 2000.

BIANCINI, Giovana Brondani *et al.* DNA damage in Fabry patients: An investigation of oxidative damage and repair. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental**

- Mutagenesis**, [s. l.], v. 784–785, p. 31–36, 2015. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383571815001163>.
- BIERER, Linda M. *et al.* Neurochemical Correlates of Dementia Severity in Alzheimer's Disease: Relative Importance of the Cholinergic Deficits. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 64, n. 2, 1995.
- BLOM, T. S. Defective endocytic trafficking of NPC1 and NPC2 underlying infantile Niemann-Pick type C disease. **Human Molecular Genetics**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 257–272, 2003. Disponível em: <https://academic.oup.com/hmg/article-lookup/doi/10.1093/hmg/ddg025>.
- BOLTON, Shaun C. *et al.* Clinical disease characteristics of patients with Niemann-Pick Disease Type C: findings from the International Niemann-Pick Disease Registry (INPDR). **Orphanet Journal of Rare Diseases**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 1–10, 2022. Disponível em: <https://ojrd.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13023-022-02200-4>. Acesso em: 4 maio 2022.
- BOSCH, Megan E.; KIELIAN, Tammy. Neuroinflammatory paradigms in lysosomal storage diseases. **Frontiers in Neuroscience**, [s. l.], v. 9, n. OCT, p. 1–11, 2015.
- BRUNO, Martin A. *et al.* Amyloid β -induced nerve growth factor dysmetabolism in Alzheimer disease. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, [s. l.], v. 68, n. 8, 2009.
- BUTTERFIELD, D. Allan; HALLIWELL, Barry. Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 148–160, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41583-019-0132-6>.
- CAI, Dongsheng; LIU, Tiewen. Inflammatory cause of metabolic syndrome via brain stress and NF- κ B. **Aging**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 98–115, 2012. Disponível em: <https://www.aging-us.com/article/100431>. Acesso em: 23 jun. 2022.
- CARSTEA, Eugene D. *et al.* Niemann-Pick C1 disease gene: Homology to mediators of cholesterol homeostasis. **Science**, [s. l.], v. 277, n. 5323, 1997.
- CHAO, Chun Cheih *et al.* Metabolic Control of Astrocyte Pathogenic Activity via cPLA2-MAVS. **Cell**, [s. l.], v. 179, n. 7, p. 1483-1498.e22, 2019.
- COELHO, Janice Carneiro; GIUGLIANI, Roberto. Fibroblasts of skin fragments as a tool for the investigation of genetic diseases: Technical recommendations. **Genetics and Molecular Biology**, [s. l.], v. 23, n. 2, 2000.
- COLOGNA, Stephanie M. *et al.* Human and mouse neuroinflammation markers in Niemann-Pick disease, type C1. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, [s. l.], v. 37, n. 1, p. 83–92, 2014.
- COUGNOUX, Antony *et al.* Reduction of glutamate neurotoxicity: A novel therapeutic approach for Niemann-Pick disease, type C1. **Molecular Genetics and Metabolism**, [s. l.], v. 134, n. 4, p. 330–336, 2021. Disponível em: Acesso em: 31 maio 2022.
- COUTINHO, Maria Francisca *et al.* Molecular Characterization of a Novel Splicing Mutation underlying Mucopolysaccharidosis (MPS) type VI-Indirect Proof of Principle on Its

Pathogenicity. **Diagnostics (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 10, n. 2, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31973102/>. Acesso em: 5 jul. 2022.

COVACEUSZACH, Sonia *et al.* Development of a Non Invasive NGF-Based Therapy for Alzheimers Disease. **Current Alzheimer Research**, [s. l.], v. 6, n. 2, 2009.

CRUMLING, Mark A.; KING, Kelly A.; DUNCAN, R. Keith. **Cyclodextrins and iatrogenic hearing loss: New drugs with significant risk**. [S. l.: s. n.], 2017.

CSISZAR, Anna *et al.* Inflammation and endothelial dysfunction during aging: Role of NF- κ B. **Journal of Applied Physiology**, [s. l.], v. 105, n. 4, p. 1333–1341, 2008. Disponível em: Acesso em: 23 jun. 2022.

CUISSET, Jean Marie *et al.* Impact of miglustat on evolution of atypical presentation of late-infantile-onset Niemann-Pick disease type C with early cognitive impairment, behavioral dysfunction, epilepsy, ophthalmoplegia, and cerebellar involvement: A case report. **Journal of Medical Case Reports**, [s. l.], v. 10, n. 1, 2016.

DAVIDSON, Cristin D. *et al.* Chronic cyclodextrin treatment of murine Niemann-Pick C disease ameliorates neuronal cholesterol and glycosphingolipid storage and disease progression. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 4, n. 9, 2009.

DAVIES, J. P.; IOANNOU, Y. A. Topological analysis of Niemann-Pick C1 protein reveals that the membrane orientation of the putative sterol-sensing domain is identical to those of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase and sterol regulatory element binding protein cleavage-activating protein. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 275, n. 32, 2000.

DAVIES-THOMPSON, J. *et al.* Reduced Myelin Water in the White Matter Tracts of Patients with Niemann-Pick Disease Type C. **American Journal of Neuroradiology**, [s. l.], v. 37, n. 8, p. 1487–1489, 2016.

DE MELLO, Alexandre Silva *et al.* The modulation of inflammatory parameters, Brain-derived neurotrophic factor levels and global histone H4 acetylation status in peripheral blood of patients with Gaucher disease type 1. **Clinical biochemistry**, [s. l.], v. 50, n. 4–5, p. 228–233, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27865783/>. Acesso em: 2 jun. 2022.

DEAN, Olivia; GIORLANDO, Frank; BERK, Michael. **N-acetylcysteine in psychiatry: Current therapeutic evidence and potential mechanisms of action**. [S. l.: s. n.], 2011.

DELGADO, Camila Aguilar *et al.* Prevention by L-carnitine of DNA damage induced by 3-hydroxy-3-methylglutaric and 3-methylglutaric acids and experimental evidence of lipid and DNA damage in patients with 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 668, p. 16–22, 2019.

DEON, Marion *et al.* Protective effect of L-carnitine on Phenylalanine-induced DNA damage. **Metabolic Brain Disease**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 925–933, 2015.

DIAZ JACQUES, Carlos Eduardo *et al.* Hunter syndrome: Long-term idursulfase treatment does not protect patients against DNA oxidation and cytogenetic damage. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, [s. l.], v. 835, p. 21–24, 2018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383571818301797>.

- DIZDAROGLU, Miral. Oxidatively induced DNA damage: Mechanisms, repair and disease. **Cancer Letters**, [s. l.], v. 327, n. 1–2, p. 26–47, 2012. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383512000468>.
- DONIDA, Bruna *et al.* Nanoparticles containing β -cyclodextrin potentially useful for the treatment of Niemann-Pick C. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, [s. l.], v. 43, n. 3, p. 586–601, 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jimd.12210>.
- DONIDA, Bruna *et al.* **Oxidative damage and redox in Lysosomal Storage Disorders: Biochemical markers**. [S. l.: s. n.], 2017.
- DONIDA, Bruna *et al.* Oxidative stress and inflammation in mucopolysaccharidosis type IVA patients treated with enzyme replacement therapy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, [s. l.], v. 1852, n. 5, p. 1012–1019, 2015. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925443915000551>.
- DOS SANTOS MELLO, M. *et al.* Increased oxidative stress in patients with 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria. **Molecular and Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 402, n. 1–2, 2015.
- DUBERLEY, K. E. *et al.* Effect of Coenzyme Q10 supplementation on mitochondrial electron transport chain activity and mitochondrial oxidative stress in Coenzyme Q 10 deficient human neuronal cells. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, [s. l.], v. 50, n. 1, p. 60–63, 2014.
- ENCARNAÇÃO, Marisa *et al.* Assessing Lysosomal Disorders in the NGS Era: Identification of Novel Rare Variants. **International journal of molecular sciences**, [s. l.], v. 21, n. 17, p. 1–18, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32883051/>. Acesso em: 5 jul. 2022.
- FECAROTTA, Simona *et al.* Long term follow-up to evaluate the efficacy of miglustat treatment in Italian patients with Niemann-Pick disease type C. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 22, 2015. Disponível em: <http://www.ajrd.com/content/10/1/22>.
- FERNANDEZ-VALERO, E. M. *et al.* Identification of 25 new mutations in 40 unrelated Spanish Niemann-Pick type C patients: Genotype-phenotype correlations. **Clinical Genetics**, [s. l.], v. 68, n. 3, p. 245–254, 2005.
- FU, Rao *et al.* Efficacy of N-acetylcysteine in phenotypic suppression of mouse models of niemann-pick disease, type C1. **Human Molecular Genetics**, [s. l.], v. 22, n. 17, p. 3508–3523, 2013.
- FU, Rao *et al.* Oxidative stress in Niemann–Pick disease, type C. **Molecular Genetics and Metabolism**, [s. l.], v. 101, n. 2, p. 214–218, 2010. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1096719210002532>.
- FUJIMOTO, Chisato; YAMASOBA, Tatsuya. **Mitochondria-targeted antioxidants for treatment of hearing loss: A systematic review**. [S. l.: s. n.], 2019.
- GABANDÉ-RODRÍGUEZ, Enrique *et al.* Lipid-induced lysosomal damage after demyelination corrupts microglia protective function in lysosomal storage disorders. **The EMBO Journal**, [s. l.], 2019.

- GALIC, Michael A.; RIAZI, Kiarash; PITTMAN, Quentin J. **Cytokines and brain excitability**. [S. l.: s. n.], 2012.
- GARVER, William S. *et al.* The National Niemann-Pick C1 disease database: Report of clinical features and health problems. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, [s. l.], v. 143, n. 11, 2007.
- GEBERHIWOT, Tarekegn *et al.* Consensus clinical management guidelines for Niemann-Pick disease type C. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 50, 2018.
- GERENU, Gorka *et al.* Modulation of BDNF cleavage by plasminogen-activator inhibitor-1 contributes to Alzheimer's neuropathology and cognitive deficits. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, [s. l.], 2017.
- GERMAN, D. C. *et al.* Neurodegeneration in the Niemann-Pick C mouse: Glial involvement. **Neuroscience**, [s. l.], 2002.
- GIESE, Anne Katrin *et al.* A novel, highly sensitive and specific biomarker for Niemann-Pick type C1 disease. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, [s. l.], v. 10, n. 1, 2015.
- GNANAPAVAN, Sharmilee *et al.* Neural cell adhesion molecule - Description of a CSF ELISA method and evidence of reduced levels in selected neurological disorders. **Journal of Neuroimmunology**, [s. l.], v. 225, n. 1–2, 2010.
- GNANAPAVAN, Sharmilee; GIOVANNONI, Gavin. Neural cell adhesion molecules in brain plasticity and disease. **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 13–20, 2013. Disponível em: <http://www.msard-journal.com/article/S2211034812000958/fulltext>. Acesso em: 1 jun. 2022.
- GOVINDARAJAN, Vaidya; DE RIVERO VACCARI, Juan Pablo; KEANE, Robert W. Role of inflammasomes in multiple sclerosis and their potential as therapeutic targets. **Journal of Neuroinflammation**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 260, 2020.
- GRAMLING, Mark W.; CHURCH, Frank C. **Plasminogen activator inhibitor-1 is an aggregate response factor with pleiotropic effects on cell signaling in vascular disease and the tumor microenvironment**. [S. l.: s. n.], 2010.
- GRIFFIN, Lisa D. *et al.* Niemann-Pick type C disease involves disrupted neurosteroidogenesis and responds to allopregnanolone. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 10, n. 7, 2004.
- GUERREIRO, Gilian *et al.* Elevated levels of BDNF and cathepsin- β as possible peripheral markers of neurodegeneration in plasma of patients with glutaric acidemia type I. **International Journal of Developmental Neuroscience**, [s. l.], v. 80, n. 1, p. 42–49, 2020.
- GUERREIRO, Gilian *et al.* Oxidative damage in glutaric aciduria type I patients and the protective effects of l-carnitine treatment. **Journal of Cellular Biochemistry**, [s. l.], 2018.
- HALLIWELL, Barry. **Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life**. [S. l.: s. n.], 2006.
- HALLIWELL, B. **Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: Therapeutic implications for antioxidant treatment**. [S. l.: s. n.], 2001.

HALLIWELL, Barry; GUTTERIDGE, John M. C. Free Radicals in Biology and Medicine. **Free Radicals in Biology and Medicine**, [s. l.], 2015.

HAMMERSCHMIDT, Tatiane G. *et al.* Cytokine profile and cholesterol levels in patients with Niemann-Pick type C disease presenting neurological symptoms: in vivo effect of miglustat and in vitro effect of N-acetylcysteine and coenzyme Q10. **Experimental Cell Research**, [s. l.], v. 416, n. 2, p. 113175, 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014482722001689>.

HAMMERSCHMIDT, T.G. *et al.* Molecular and biochemical biomarkers for diagnosis and therapy monitorization of Niemann-Pick type C patients. **International Journal of Developmental Neuroscience**, [s. l.], v. 66, n. 66, p. 18–23, 2018.

HARGREAVES, Iain P. Ubiquinone: cholesterol's reclusive cousin. **Ann Clin Biochem**, [s. l.], v. 40, p. 2017–2218, 2003.

HEESE, Bryce A. **Current Strategies in the Management of Lysosomal Storage Diseases**. [S. l.: s. n.], 2008.

HELDIN, C. H.; LENNARTSSON, J.; WESTERMARK, B. **Involvement of platelet-derived growth factor ligands and receptors in tumorigenesis**. [S. l.: s. n.], 2018.

HÉRON, Bénédicte *et al.* Miglustat therapy in the French cohort of paediatric patients with Niemann-Pick disease type C. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, [s. l.], v. 7, n. 1, 2012.

HIGDON, Ashlee *et al.* Cell signalling by reactive lipid species: new concepts and molecular mechanisms. **The Biochemical Journal**, [s. l.], v. 442, n. 3, p. 453–464, 2012.

HIRSCH, Etienne C.; HUNOT, Stéphane. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? **The Lancet Neurology**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 382–397, 2009.

HOVAKIMYAN, M. *et al.* Combined therapy with cyclodextrin/allopregnanolone and miglustat improves motor but not cognitive functions in Niemann-Pick Type C1 mice. **Neuroscience**, [s. l.], v. 252, 2013.

HOWELLS, D. W. *et al.* Reduced BDNF mRNA expression in the Parkinson's disease substantia nigra. **Experimental neurology**, [s. l.], v. 166, n. 1, p. 127–135, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11031089/>. Acesso em: 2 jun. 2022.

HU, J. G. *et al.* Platelet-derived growth factor-AA mediates oligodendrocyte lineage differentiation through activation of extracellular signal-regulated kinase signaling pathway. **Neuroscience**, [s. l.], 2008.

HUANG, Yixian *et al.* Serum concentration and clinical significance of brain-derived neurotrophic factor in patients with Parkinson's disease or essential tremor. **The Journal of international medical research**, [s. l.], v. 46, n. 4, p. 1477–1485, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29350074/>. Acesso em: 2 jun. 2022.

INSTITUTE OF MEDICAL GENETICS IN CARDIFF. **The Human Gene Mutation Database**. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=NPC1>. Acesso em: 25 maio 2022.

ISOBE, Chiaki; ABE, Takashi; TERAYAMA, Yasuo. Levels of reduced and oxidized coenzyme Q-10 and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in the CSF of patients with Alzheimer's disease demonstrate that mitochondrial oxidative damage and/or oxidative DNA damage contributes to the neurodegenerative process. **Journal of Neurology**, [s. l.], v. 257, n. 3, p. 399–404, 2010. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00415-009-5333-x>.

ITO, Fumiaki; SONO, Yoko; ITO, Tomoyuki. Measurement and clinical significance of lipid peroxidation as a biomarker of oxidative stress: Oxidative stress in diabetes, atherosclerosis, and chronic inflammation. **Antioxidants**, [s. l.], v. 8, n. 3, 2019. Disponível em: Acesso em: 29 mar. 2022.

JACQUES, Carlos Eduardo Diaz *et al.* Oxidative and nitrative stress and pro-inflammatory cytokines in Mucopolysaccharidosis type II patients: effect of long-term enzyme replacement therapy and relation with glycosaminoglycan accumulation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, [s. l.], v. 1862, n. 9, p. 1608–1616, 2016. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925443916301387>.

JARDIM, Laura Bannach; ASHTON-PROLLA, Patrícia. Erros inatos do metabolismo em crianças agudamente enfermas: guia para o seu diagnóstico e manejo. **Jornal de Pediatria**, [s. l.], v. 72, n. 2, p. 63–70, 1996.

JIANG, X. *et al.* A sensitive and specific LC-MS/MS method for rapid diagnosis of Niemann-Pick C1 disease from human plasma. **The Journal of Lipid Research**, [s. l.], v. 52, n. 7, p. 1435–1445, 2011. Disponível em: <http://www.jlr.org/cgi/doi/10.1194/jlr.D015735>.

KATOH-SEMBA, Ritsuko *et al.* Riluzole enhances expression of brain-derived neurotrophic factor with consequent proliferation of granule precursor cells in the rat hippocampus. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, [s. l.], v. 16, n. 10, p. 1328–1330, 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12154010/>. Acesso em: 2 jun. 2022.

KAVETSKY, Larisa *et al.* Increased interactions and engulfment of dendrites by microglia precede Purkinje cell degeneration in a mouse model of Niemann Pick Type-C. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 14722, 2019. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41598-019-51246-1>.

KENNEDY, Barry E. *et al.* Adaptations of energy metabolism associated with increased levels of mitochondrial cholesterol in Niemann-Pick type C1-deficient cells. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 289, n. 23, 2014.

KIM, Sun Jung *et al.* Defective cholesterol traffic and neuronal differentiation in neural stem cells of Niemann-Pick type C disease improved by valproic acid, a histone deacetylase inhibitor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 360, n. 3, p. 593–599, 2007. Disponível em: Acesso em: 31 maio 2022.

KIM, Sun Jung *et al.* Impaired functions of neural stem cells by abnormal nitric oxide-mediated signaling in an in vitro model of Niemann-Pick type C disease. **Cell Research**, [s. l.], v. 18, n. 6, p. 686–694, 2008. Disponível em: Acesso em: 29 mar. 2022.

KIM, Sun-Jung *et al.* Impaired functions of neural stem cells by abnormal nitric oxide-mediated signaling in an in vitro model of Niemann-Pick type C disease. **Cell Research**, [s.

l.], v. 18, n. 6, p. 686–694, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2008.48>. Acesso em: 18 jul. 2017.

KIM, Ji Hyun *et al.* Krill Oil Attenuates Cognitive Impairment by the Regulation of Oxidative Stress and Neuronal Apoptosis in an Amyloid β -Induced Alzheimer's Disease Mouse Model. **Molecules**, [*s. l.*], v. 25, n. 17, p. 3942, 2020.

KODACHI, Tsuyoshi *et al.* Case Report Severe demyelination in a patient with a late infantile form of Niemann-Pick disease type C. **Neuropathology**, [*s. l.*], n. November 2016, p. 1–5, 2017a.

KODACHI, Tsuyoshi *et al.* Severe demyelination in a patient with a late infantile form of Niemann-Pick disease type C. **Neuropathology**, [*s. l.*], 2017b.

KOGAN, Anna *et al.* Formation and characterization of ordered bicontinuous microemulsions. **Journal of Physical Chemistry B**, [*s. l.*], v. 113, n. 31, 2009.

KOJIMA, M.; MIZUI, T. BDNF Propeptide: A Novel Modulator of Synaptic Plasticity. *Em: VITAMINS AND HORMONES*. [*S. l.: s. n.*], 2017. v. 104.

LI, Hao *et al.* GM2/GD2 and GM3 gangliosides have no effect on cellular cholesterol pools or turnover in normal or NPC1 mice. **Journal of Lipid Research**, [*s. l.*], v. 49, n. 8, 2008.

LIAO, Guanghong *et al.* Cholesterol Accumulation Is Associated with Lysosomal Dysfunction and Autophagic Stress in *Npc1*^{-/-} Mouse Brain. **The American Journal of Pathology**, [*s. l.*], v. 171, n. 3, p. 962–975, 2007. Disponível em: <http://ajp.amjpathol.org/article/S0002944010620275/fulltext>. Acesso em: 2 jun. 2022.

LIU, Yujing *et al.* Alleviation of neuronal ganglioside storage does not improve the clinical course of the Niemann-Pick C disease mouse. **Human Molecular Genetics**, [*s. l.*], v. 9, n. 7, 2000.

LIU, Benny *et al.* Cyclodextrin overcomes the transport defect in nearly every organ of NPC1 mice leading to excretion of sequestered cholesterol as bile acid. **Journal of Lipid Research**, [*s. l.*], v. 51, n. 5, 2010.

LONG, Yan *et al.* Induced Pluripotent Stem Cells for Disease Modeling and Evaluation of Therapeutics for Niemann-Pick Disease Type A. **STEM CELLS Translational Medicine**, [*s. l.*], 2016.

LYMAN, Monty *et al.* Neuroinflammation: The role and consequences. **Neuroscience Research**, [*s. l.*], v. 79, n. 1, p. 1–12, 2014.

LYSENG-WILLIAMSON, Katherine A. Miglustat: A review of its use in Niemann-Pick disease type C. **Drugs**, [*s. l.*], v. 74, n. 1, p. 61–74, 2014.

MAETZEL, Dorothea *et al.* Genetic and chemical correction of cholesterol accumulation and impaired autophagy in hepatic and neural cells derived from niemann-pick type C patient-specific iPS cells. **Stem Cell Reports**, [*s. l.*], v. 2, n. 6, p. 866–880, 2014a. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.03.014>.

- MAETZEL, Dorothea *et al.* Genetic and Chemical Correction of Cholesterol Accumulation and Impaired Autophagy in Hepatic and Neural Cells Derived from Niemann-Pick Type C Patient-Specific iPS Cells. **Stem Cell Reports**, [s. l.], v. 2, n. 6, p. 866–880, 2014b.
- MARCHETTI, Desirée Padilha *et al.* Inflammatory profile in X-linked adrenoleukodystrophy patients: Understanding disease progression. **Journal of Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 119, n. 1, 2018a.
- MARCHETTI, Desirée Padilha *et al.* Oxidative Imbalance, Nitritative Stress, and Inflammation in C6 Glial Cells Exposed to Hexacosanoic Acid: Protective Effect of N-acetyl-L-cysteine, Trolox, and Rosuvastatin. **Cellular and Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 38, n. 8, p. 1505–1516, 2018b. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10571-018-0626-1>.
- MARÍN, Tamara *et al.* Vitamin E dietary supplementation improves neurological symptoms and decreases c-Abl/p73 activation in Niemann-Pick C mice. **Nutrients**, [s. l.], v. 6, n. 8, p. 3000–3017, 2014.
- MARINHO, H Susana *et al.* Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. **Redox biology**, [s. l.], v. 2, p. 535–562, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2014.02.006>. Acesso em: 18 jul. 2017.
- MARTINS, A. M. **Erros Inatos do Metabolismo: Abordagem Clínica**. [S. l.: s. n.], 2003.
- MATTHEWS, Russell T. *et al.* Coenzyme Q10 administration increases brain mitochondrial concentrations and exerts neuroprotective effects. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 95, n. 15, 1998.
- MCKAY BOUNFORD, K.; GISSEN, P. Genetic and laboratory diagnostic approach in Niemann Pick disease type C. **Journal of Neurology**, [s. l.], v. 261, n. SUPPL. 2, p. 569–575, 2014.
- MEHRA, Anupriya *et al.* The plasminogen activation system in neuroinflammation. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, [s. l.], 2016.
- MESCKA, Caroline Paula *et al.* Investigation of inflammatory profile in MSUD patients: benefit of L-carnitine supplementation. **Metabolic Brain Disease**, [s. l.], v. 30, n. 5, 2015.
- MIGLIORE, L. *et al.* Evaluation of cytogenetic and DNA damage in mitochondrial disease patients: Effects of coenzyme Q10 therapy. **Mutagenesis**, [s. l.], 2004.
- MILLAT, Gilles *et al.* Niemann-Pick C1 Disease: Correlations between NPC1 Mutations, Levels of NPC1 Protein, and Phenotypes Emphasize the Functional Significance of the Putative Sterol-Sensing Domain and of the Cysteine-Rich Luminal Loop. **The American Journal of Human Genetics**, [s. l.], v. 68, n. 6, p. 1373–1385, 2001. Disponível em: <http://www.cell.com/article/S0002929707610489/fulltext>. Acesso em: 29 jun. 2022.
- MOHANTY, R. R. *et al.* Therapeutic potential of N-acetyl cysteine (NAC) in preventing cytokine storm in COVID-19: Review of current evidence. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, [s. l.], v. 25, n. 6, p. 2802–2807, 2021.
- MONTERO, Raquel *et al.* Plasma coenzyme Q10 status is impaired in selected genetic conditions. **Scientific Reports**, [s. l.], 2019.

- MORRIS, Jill A. *et al.* The genomic organization and polymorphism analysis of the human Niemann-Pick C1 gene. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 261, n. 2, 1999.
- MURIACH, Maria *et al.* Diabetes and the brain: oxidative stress, inflammation, and autophagy. **Oxidative medicine and cellular longevity**, United States, v. 2014, p. 102158, 2014.
- OKANE, K *et al.* [Brain magnetic resonance imaging findings in two cases of Hunter's syndrome]. **No to shinkei = Brain and nerve**, [s. l.], v. 50, n. 3, p. 273–277, 1998.
- OKUN, Eitan; GRIFFIOEN, Kathleen J; MATTSON, Mark P. Toll-like receptor signaling in neural plasticity and disease. **Trends in Neurosciences**, [s. l.], v. 34, n. 5, p. 269–281, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2011.02.005>. Acesso em: 18 jul. 2017.
- OLIVERA-BRAVO, Silvia *et al.* Astrocyte Dysfunction in Developmental Neurometabolic Diseases. *Em: [S. l.: s. n.]*, 2016. p. 227–243.
- OLSEN, Rikke K J; CORNELIUS, Nanna; GREGERSEN, Niels. Redox signalling and mitochondrial stress responses; lessons from inborn errors of metabolism. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, [s. l.], v. 38, n. 4, p. 703–719, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10545-015-9861-5>. Acesso em: 18 jul. 2017.
- OPAL, Steven M.; DEPALO, Vera A. Anti-inflammatory cytokines. **Chest**, [s. l.], 2000.
- P., Mabe *et al.* Errores innatos Del metabolismo lisosomal. *Em: ERRORES INNATOS EN EL METABOLISMO DEL NIÑO. [S. l.: s. n.]*, 2003. p. 225–256.
- PALACIO, J. R.; MARKERT, U. R.; MARTÍNEZ, P. Anti-inflammatory properties of N-acetylcysteine on lipopolysaccharide-activated macrophages. **Inflammation Research**, [s. l.], v. 60, n. 7, p. 695–704, 2011. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00011-011-0323-8>.
- PARASASSI, Tiziana *et al.* **Thiol redox transitions in cell signaling: A lesson from N-acetylcysteine.** [S. l.: s. n.], 2010.
- PATTERSON, Marc C. A Riddle Wrapped in a Mystery: Understanding Niemann-Pick Disease, Type C. **The Neurologist**, [s. l.], v. 9, n. 6, p. 301–310, 2003. Disponível em: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00127893-200311000-00004>.
- PATTERSON, Marc C. *et al.* **Recommendations for the detection and diagnosis of Niemann-Pick disease type C : An update.** [S. l.: s. n.], 2017.
- PATTERSON, Marc C. *et al.* Recommendations for the diagnosis and management of Niemann-Pick disease type C: An update. **Molecular Genetics and Metabolism**, [s. l.], v. 106, n. 3, p. 330–344, 2012a.
- PATTERSON, Marc C. *et al.* Recommendations for the diagnosis and management of Niemann-Pick disease type C: An update. **Molecular Genetics and Metabolism**, [s. l.], v. 106, n. 3, 2012b.

- PATTERSON, Marc C. *et al.* Treatment outcomes following continuous miglustat therapy in patients with Niemann-Pick disease Type C: A final report of the NPC Registry. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, [s. l.], 2020.
- PAULINA ORDONEZ, M. *et al.* Disruption and therapeutic rescue of autophagy in a human neuronal model of Niemann Pick type C1. **Human Molecular Genetics**, [s. l.], v. 21, n. 12, p. 2651, 2012. Disponível em: /pmc/articles/PMC3363339/. Acesso em: 3 maio 2022.
- PCHELINA, S. N. *et al.* Increased plasma oligomeric alpha-synuclein in patients with lysosomal storage diseases. **Neuroscience Letters**, [s. l.], 2014.
- PEAKE, Kyle B. *et al.* Niemann-Pick Type C1 deficiency in microglia does not cause neuron death in vitro. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, [s. l.], 2011.
- PERRY, Seth W. *et al.* **Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: A practical usage guide**. [S. l.: s. n.], 2011.
- PETROU, Athinoula L.; TERZIDAKI, Athina. **A meta-analysis and review examining a possible role for oxidative stress and singlet oxygen in diverse diseases**. [S. l.: s. n.], 2017.
- PIZZINO, Gabriele *et al.* Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2017, p. 1–13, 2017.
- PLATT, Nick *et al.* **Immune dysfunction in Niemann-Pick disease type C**. [S. l.: s. n.], 2016.
- PLATT, Frances M. *et al.* **Lysosomal storage diseases**. [S. l.: s. n.], 2018a.
- PLATT, Frances M. *et al.* Lysosomal storage diseases. **Nature Reviews Disease Primers**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 27, 2018b. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41572-018-0025-4>.
- POLESE-BONATTO, Márcia *et al.* Niemann-Pick Disease Type C: Mutation Spectrum and Novel Sequence Variations in the Human NPC1 Gene. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 56, n. 9, p. 6426–6435, 2019. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s12035-019-1528-z>.
- PONTIKIS, Charles C. *et al.* Cyclodextrin alleviates neuronal storage of cholesterol in Niemann-Pick C disease without evidence of detectable blood-brain barrier permeability. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, [s. l.], v. 36, n. 3, 2013.
- PORRO, Chiara; CIANCIULLI, Antonia; PANARO, Maria Antonietta. The Regulatory Role of IL-10 in Neurodegenerative Diseases. **Biomolecules**, [s. l.], v. 10, n. 7, p. 1–15, 2020.
- PRESSEY, Sarah N.R. *et al.* Early glial activation, synaptic changes and axonal pathology in the thalamocortical system of Niemann-Pick type C1 mice. **Neurobiology of Disease**, [s. l.], 2012.
- RAMOS-VASCONCELOS, GR; ALVES, ALH; HERMES-LIMA, M. Radicais livres, antioxidantes e a adaptabilidade animal. *Em: O QUE É VIDA: PARA ENTENDER A BIOLOGIA DO SÉCULO XXI*. [S. l.: s. n.], 2000. p. 209–331.
- RANG, H.P. J.M. RITTER, R.J. FLOWER, G. Henderson. Rang and Dales pharmacology Eighth edition. *Em: RANG AND DALES PHARMACOLOGY*. [S. l.: s. n.], 2016.

- REDDY, Jonathan v.; GANLEY, Ian G.; PFEFFER, Suzanne R. Clues to neuro-degeneration in Niemann-Pick type C disease from global gene expression profiling. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 1, n. 1, 2006.
- REPETTO, Guillermo; DEL PESO, Ana; ZURITA, Jorge L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature protocols**, England, v. 3, n. 7, p. 1125–1131, 2008.
- REULAND, Carolyn J; CHURCH, Frank C. Synergy between plasminogen activator inhibitor-1, α -synuclein, and neuroinflammation in Parkinson's disease. **Medical Hypotheses**, [s. l.], v. 138, p. 109602, 2020. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306987719313751>.
- RIBAS, Graziela S. *et al.* Oxidative stress in Niemann-Pick type C patients: A protective role of N-butyl-deoxynojirimycin therapy. **International Journal of Developmental Neuroscience**, [s. l.], v. 30, n. 6, p. 439–444, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2012.07.002>.
- RIBAS, G. S. *et al.* Selective screening of Niemann-Pick type C Brazilian patients by cholestane-3 α ,5 α ,6 α -triol and chitotriosidase measurements followed by filipin staining and NPC1/NPC2 gene analysis. **Clinica Chimica Acta**, [s. l.], v. 459, p. 57–62, 2016.
- RIBEIRO, I. *et al.* Niemann-Pick type C disease: NPC1 mutations associated with severe and mild cellular cholesterol trafficking alterations. **Human Genetics**, [s. l.], v. 109, n. 1, p. 24–32, 2001.
- SAFFARI, Afshin *et al.* Linking mitochondrial dysfunction to neurodegeneration in lysosomal storage diseases. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, [s. l.], v. 40, n. 5, p. 631–640, 2017. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1007/s10545-017-0048-0>.
- SAHER, Gesine; STUMPF, Sina Kristin. Cholesterol in myelin biogenesis and hypomyelinating disorders. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, [s. l.], v. 1851, n. 8, p. 1083–1094, 2015. Disponível em: Acesso em: 31 maio 2022.
- SANDHIR, Rajat *et al.* N-acetylcysteine reverses mitochondrial dysfunctions and behavioral abnormalities in 3-nitropropionic acid-induced Huntington's disease. **Neurodegenerative Diseases**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 145–157, 2012.
- SANSEVERINO MTV, WAJNER M, Giugliani R. Aplicação de um protocolo clínico-laboratorial para identificação de erros inatos do metabolismo em crianças gravemente enfermas. **Jornal de Pediatria**, [s. l.], p. 375–382, 2000.
- SAÚDE, Ministério da. **Diretrizes Brasileiras para Diagnóstico e Tratamento da Doença de Niemann-Pick Tipo C**. [S. l.: s. n.], 2020.
- SAUDUBRAY, Jean Marie *et al.* A clinical approach to inherited metabolic diseases. *Em: INBORN METABOLIC DISEASES: DIAGNOSIS AND TREATMENT*. [S. l.: s. n.], 2006.
- SAUDUBRAY, J. M.; SEDEL, F.; WALTER, J. H. Clinical approach to treatable inborn metabolic diseases: An introduction. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, [s. l.], v. 29, n. 2–3, p. 261–274, 2006.

SAUTE, Jonas Alex Morales *et al.* Neurological outcomes after hematopoietic stem cell transplantation for cerebral X-linked adrenoleukodystrophy, late onset metachromatic leukodystrophy and Hurler syndrome. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, [s. l.], v. 74, n. 12, p. 953–966, 2016.

SCAINI, Giselli *et al.* Evaluation of plasma biomarkers of inflammation in patients with maple syrup urine disease. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, [s. l.], v. 41, n. 4, p. 631–640, 2018.

SCAINI, Giselli *et al.* Serum Markers of Neurodegeneration in Maple Syrup Urine Disease. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 54, n. 7, 2017.

SCANDALIOS, John G. **Oxidative stress responses - What have genome-scale studies taught us?**. [S. l.: s. n.], 2002.

SCHUEER, Till *et al.* Transient Improvement of Cerebellar Oligodendroglial Development in a Neonatal Hyperoxia Model by PDGFA Treatment. **Developmental Neurobiology**, [s. l.], v. 79, n. 3, p. 222–235, 2019.

SCOTT, Catherine; IOANNOU, Y. A. **The NPC1 protein: Structure implies function**. [S. l.: s. n.], 2004.

SCRIVER CR, SLY WA, BEAUDET AL, Valle D. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. [s. l.], 2001.

SEQUEIRA, J S *et al.* Niemann-Pick disease type C and defective peroxisomal beta-oxidation of branched-chain substrates. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 149–154, 1998. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9584266>. Acesso em: 18 jul. 2017.

SHAMMAS, Hadeel *et al.* Different Niemann-Pick C1 Genotypes Generate Protein Phenotypes that Vary in their Intracellular Processing, Trafficking and Localization. **Scientific Reports 2019 9:1**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-41707-y>. Acesso em: 29 jun. 2022.

SHARIF, Hina *et al.* Pathophysiology of atherosclerosis: Association of risk factors and treatment strategies using plant-based bioactive compounds. **Journal of Food Biochemistry**, [s. l.], v. n/a, n. n/a, p. e13449, 2020.

SHIN, Samuel D. *et al.* Interferon downstream signaling is activated early in pre-symptomatic Niemann-Pick disease type C. **Neuroscience Letters**, [s. l.], v. 706, p. 43–50, 2019a. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304394019303179>.

SHIN, Samuel D. *et al.* Loss of amyloid precursor protein exacerbates early inflammation in Niemann-Pick disease type C. **Journal of Neuroinflammation**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 1–15, 2019b.

SINGH, Narendra P. *et al.* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, [s. l.], 1988.

SITARSKA, Dominika; ŁUGOWSKA, Agnieszka. Laboratory diagnosis of the Niemann-Pick type C disease: an inherited neurodegenerative disorder of cholesterol metabolism.

Metabolic Brain Disease, [s. l.], v. 34, n. 5, p. 1253–1260, 2019. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11011-019-00445-w>. Acesso em: 5 maio 2022.

SMITH, David *et al.* Beneficial effects of anti-inflammatory therapy in a mouse model of Niemann-Pick disease type C1. **Neurobiology of Disease**, [s. l.], v. 36, n. 2, p. 242–251, 2009.

SØRENSEN, P. Soelberg *et al.* Low cerebrospinal fluid concentration of brain-specific protein D2 in patients with normal pressure hydrocephalus. **Journal of the Neurological Sciences**, [s. l.], v. 62, n. 1–3, 1983.

SOUTO, Eliana B *et al.* Ocular Cell Lines and Genotoxicity Assessment. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [s. l.], v. 17, n. 6, 2020.

SOUZA, CFM; SCHWARTZ, Ida Vanessa D.; GIUGLIANI, Roberto. Triagem neonatal e distúrbios metabólicos. **Ciência e Saúde Coletiva**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 129–137, 2002.

STEIN, Veronika M. *et al.* Miglustat Improves Purkinje Cell Survival and Alters Microglial Phenotype in Feline Niemann-Pick Disease Type C. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, [s. l.], v. 71, n. 5, p. 434–448, 2012.

STREKALOVA, Helen *et al.* Elevated levels of neural recognition molecule L1 in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer disease and other dementia syndromes. **Neurobiology of Aging**, [s. l.], v. 27, n. 1, 2006.

SUNG, Ho Joong *et al.* N-acetyl cysteine suppresses the foam cell formation that is induced by oxidized low density lipoprotein via regulation of gene expression. **Molecular Biology Reports**, [s. l.], v. 39, n. 3, p. 3001–3007, 2012. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s11033-011-1062-1>.

TAKIKITA, Shoichi *et al.* Perturbed Myelination Process of Premyelinating Oligodendrocyte in Niemann-Pick Type C Mouse. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, [s. l.], v. 63, n. 6, p. 660–673, 2004. Disponível em: <https://academic.oup.com/jnen/article/63/6/660/2916653>. Acesso em: 7 jun. 2022.

TANG, Xiaoyi *et al.* Nitric oxide might be an inducing factor in cognitive impairment in Alzheimer's disease via downregulating the monocarboxylate transporter 1. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, [s. l.], v. 91, p. 35–41, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.niox.2019.07.006>. Acesso em: 31 mar. 2022.

TANG, Ying; LI, He; LIU, Jun Ping. Niemann-pick disease type C: From molecule to clinic. *Em: , 2010. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. [S. l.: s. n.], 2010.

TAYAL, Vandana; KALRA, Bhupinder Singh. Cytokines and anti-cytokines as therapeutics - an update. **European journal of pharmacology**, [s. l.], v. 579, n. 1–3, p. 1–12, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18021769/>. Acesso em: 23 jun. 2022.

THOMAS, Ryan; KERMODE, Allison R. **Enzyme enhancement therapeutics for lysosomal storage diseases: Current status and perspective**. [S. l.: s. n.], 2019.

TILLEY, Stephen L.; COFFMAN, Thomas M.; KOLLER, Beverly H. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. **The Journal of clinical investigation**, [s. l.], v. 108, n. 1, p. 15–23, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11435451/>. Acesso em: 23 jun. 2022.

- TOMASETTI, Marco; ALLEVA, Renata; COLLINS, Andrew R. In vivo supplementation with coenzyme Q 10 enhances the recovery of human lymphocytes from oxidative DNA damage. **The FASEB Journal**, [s. l.], v. 15, n. 8, p. 1425–1427, 2001. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1096/fj.00-0694fje>.
- TORRES, Sandra *et al.* Mitochondrial GSH replenishment as a potential therapeutic approach for Niemann Pick type C disease. **Redox Biology**, [s. l.], 2017.
- TRARES, Kira *et al.* Associations of urinary 8-iso-prostaglandin F2 α levels with all-cause dementia, Alzheimer's disease, and vascular dementia incidence: results from a prospective cohort study. **Alzheimer's & Dementia**, [s. l.], v. 16, n. 5, p. 804–813, 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/alz.12081>. Acesso em: 29 mar. 2022.
- VAIRO, Filippo *et al.* Brain-derived neurotrophic factor expression increases after enzyme replacement therapy in Gaucher disease. **Journal of neuroimmunology**, [s. l.], v. 278, p. 190–193, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25468270/>. Acesso em: 2 jun. 2022.
- VALLDEPERAS, Maria *et al.* Sponge Phases and Nanoparticle Dispersions in Aqueous Mixtures of Mono- and Diglycerides. **Langmuir**, [s. l.], v. 32, n. 34, 2016.
- VANIER, Marie T. Complex lipid trafficking in Niemann-Pick disease type C. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, [s. l.], v. 38, n. 1, p. 187–199, 2014.
- VANIER, Marie T. Complex lipid trafficking in Niemann-Pick disease type C. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, [s. l.], v. 38, n. 1, 2015.
- VANIER, Marie T. Niemann–Pick diseases. *Em: HANDBOOK OF CLINICAL NEUROLOGY*. [S. l.: s. n.], 2013. p. 1717–1721. *E-book*. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444595652000411>.
- VANIER, Marie T.; LATOUR, Philippe. **Laboratory diagnosis of Niemann-Pick disease type C: The filipin staining test**. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2015-. ISSN 0091679X.v. 126 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.mcb.2014.10.028>.
- VANIER, MT; MILLAT, G. Niemann-Pick disease type C. **Clinical Genetics**, [s. l.], v. 64, n. 4, p. 269–281, 2003. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1034/j.1399-0004.2003.00147.x>.
- VÁZQUEZ, Mary C. *et al.* Alteration of gene expression profile in niemann-pick type C mice correlates with tissue damage and oxidative stress. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 6, n. 12, 2011.
- VÁZQUEZ, Mary Carmen *et al.* Oxidative stress: A pathogenic mechanism for Niemann-Pick type C disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2012, 2012.
- VEJUX, Anne; LIZARD, Gérard. Cytotoxic effects of oxysterols associated with human diseases: Induction of cell death (apoptosis and/or oncosis), oxidative and inflammatory activities, and phospholipidosis. **Molecular Aspects of Medicine**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 153–170, 2009. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S009829970900003X>.
- VITE, Charles H. *et al.* Intracisternal cyclodextrin prevents cerebellar dysfunction and Purkinje cell death in feline Niemann-Pick type C1 disease. **Science Translational Medicine**, [s. l.], v. 7, n. 276, p. 276ra26-276ra26, 2015.

- VITNER, Einat B.; FUTERMAN, Anthony H.; PLATT, Nick. Innate immune responses in the brain of sphingolipid lysosomal storage diseases. **Biological Chemistry**, [s. l.], v. 396, n. 6–7, p. 659–667, 2015. Disponível em: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/hsz-2014-0301/html>.
- VÖLKNER, Christin *et al.* Assessment of FDA-Approved Drugs as a Therapeutic Approach for Niemann-Pick Disease Type C1 Using Patient-Specific iPSC-Based Model Systems. **Cells**, [s. l.], v. 11, n. 3, 2022.
- VÖLKNER, Christin *et al.* Patient-specific iPSC-derived neural differentiated and hepatocyte-like cells, carrying the compound heterozygous mutation p.V1023sfs*15/p.G992R, present the “variant” biochemical phenotype of niemann-pick type C1 disease. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 22, 2021.
- WABER, Lewis. Inborn Errors of Metabolism. **Pediatric Annals**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 105–118, 1990.
- WAJNER, M *et al.* The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidurias: insights from animal studies. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 427–448, 2004.
- WARD, Sarah *et al.* 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin raises hearing threshold in normal cats and in cats with niemann-pick type C disease. **Pediatric Research**, [s. l.], v. 68, n. 1, 2010.
- WASSIF, Christopher A. *et al.* High incidence of unrecognized visceral/neurological late-onset Niemann-Pick disease, type C1, predicted by analysis of massively parallel sequencing data sets. **Genetics in Medicine**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 41–48, 2016. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/gim201525>.
- WAYHS, Carlos Alberto Yasin *et al.* Diabetic encephalopathy-related depression: Experimental evidence that insulin and clonazepam restore antioxidant status in rat brain. **Cell Biochemistry and Function**, [s. l.], 2014.
- WEBER, Christine; BYSTED, Anette; HØLMER, Gunhild. Coenzyme q10 in the diet--daily intake and relative bioavailability. *Em:* , 1997. **Molecular Aspects of Medicine**. [S. l.: s. n.], 1997.
- WEHRMANN, Zachary T. *et al.* Quantitative Comparison of the Efficacy of Various Compounds in Lowering Intracellular Cholesterol Levels in Niemann-Pick Type C Fibroblasts. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 10, 2012.
- WHEELER, Simon; SILLENCE, Dan J. Niemann–Pick type C disease: cellular pathology and pharmacotherapy. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 153, n. 6, p. 674–692, 2020. Disponível em: Acesso em: 25 maio 2022.
- WILLIAMS, Ian M. *et al.* Improved neuroprotection using miglustat, curcumin and ibuprofen as a triple combination therapy in Niemann–Pick disease type C1 mice. **Neurobiology of Disease**, [s. l.], v. 67, p. 9–17, 2014.
- WOŚ, Marcin *et al.* Mitochondrial dysfunction in fibroblasts derived from patients with Niemann-Pick type C disease. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 593, p. 50–59, 2016. Disponível em: <https://www->

sciencedirect.ez45.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0003986116300315?via%3Dihub. Acesso em: 27 nov. 2018.

XU, S *et al.* Defects of synaptic vesicle turnover at excitatory and inhibitory synapses in Niemann–Pick C1-deficient neurons. **Neuroscience**, [s. l.], v. 167, n. 3, p. 608–620, 2010. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306452210002290>.

YAMADA, Atsuko *et al.* Progressive neuronal loss in the ventral posterior lateral and medial nuclei of thalamus in Niemann-Pick disease type C mouse brain. **Brain and Development**, [s. l.], 2001.

YANG, Xifei *et al.* Coenzyme Q10 attenuates β -amyloid pathology in the aged transgenic mice with Alzheimer presenilin 1 mutation. **Journal of Molecular Neuroscience**, [s. l.], v. 34, n. 2, 2008.

YOUNG J., WOODSIDE, I. Antioxidants in health and disease. **Journal of Clinical Pathology**, [s. l.], v. 54, p. 176–186, 2001.

YU, Wenxin *et al.* Altered cholesterol metabolism in Niemann-Pick type C1 mouse brains affects mitochondrial function. **The Journal of biological chemistry**, [s. l.], v. 280, n. 12, p. 11731–11739, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15644330/>. Acesso em: 3 maio 2022.

YU, Ting; LIEBERMAN, Andrew P. Npc1 Acting in Neurons and Glia Is Essential for the Formation and Maintenance of CNS Myelin. **PLoS Genetics**, [s. l.], 2013.

ZAIDI, Awais Ali *et al.* Lauric acid: Its role in behavioral modulation, neuro-inflammatory and oxidative stress markers in haloperidol induced Parkinson’s disease. **Pakistan journal of pharmaceutical sciences**, Pakistan, v. 33, n. 2(Supplementary), p. 755–763, 2020.

ZAMPIERI, Stefania *et al.* Oxidative stress in NPC1 deficient cells: Protective effect of allopregnanolone. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, [s. l.], v. 13, n. 9 B, p. 3786–3796, 2009.

ZHANG, Ye *et al.* An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 34, n. 36, 2014.

ZHANG, Yan Hui *et al.* α -Lipoic acid improves abnormal behavior by mitigation of oxidative stress, inflammation, ferroptosis, and tauopathy in P301S Tau transgenic mice. **Redox Biology**, [s. l.], v. 14, 2018.

ZUCCATO, Chiara; CATTANEO, Elena. Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases. **Nature reviews. Neurology**, [s. l.], v. 5, n. 6, p. 311–322, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19498435/>. Acesso em: 2 jun. 2022.

8 ANEXOS

8.1 Anexo 1: Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DOS MECANISMOS INFLAMATÓRIOS E DE DANO OXIDATIVO EM PACIENTES PORTADORES DE NIEMANN-PICK TIPO C: EFEITO IN VIVO DO MIGLUSTAT E IN VITRO DE ANTIOXIDANTES

Pesquisador: CARMEN REGLA VARGAS

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 95636618.2.0000.5327

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.968.204

Apresentação do Projeto:

Projeto de doutorado do PPG Ciências Farmacêuticas. Niemann-Pick tipo C (NP-C) é uma doença lisossômica de depósito, causada por disfunção nas proteínas de transporte NPC1 ou 2 que são responsáveis pelo tráfego de lipídeos intracelular, que leva ao acúmulo de colesterol não-esterificado e de glicoesfingolipídeos. Embora se tenha indícios de que o estresse oxidativo e o mecanismo de inflamação estejam envolvidos a fisiopatologia dessa doença, existem poucos estudos que comprovam esse envolvimento em pacientes, bem como que investigam como funcionam esses mecanismos deletérios. Além disso, pouco se sabe sobre o efeito do tratamento com miglustat sob o estresse oxidativo e inflamação, além da correlação com a melhora no dano neurológico observado nesses pacientes. O objetivo deste trabalho é, portanto, analisar e relacionar diferentes marcadores de dano oxidativo, inflamação e neurológicos em pacientes com NP-C antes e durante o tratamento com miglustat. Serão analisados parâmetros de dano ao DNA, de genotoxicidade, do metabolismo da glutatona, da produção de citocinas, da expressão de fatores de transcrição e enzimas diretamente relacionadas com inflamação e estresse oxidativo, assim como marcadores plasmáticos de dano neurológico. Além disso, serão investigados os efeitos in vitro de antioxidantes sobre o dano oxidativo a produção de citocinas.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral: investigar os mecanismos de estresse oxidativo, inflamação e neurodegeneração

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília CEP: 90.035-903
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 Fax: (51)3359-7640 E-mail: cep@hcpa.edu.br

Continuação do Parecer: 2.968.204

em pacientes portadores de NP-C antes e durante o tratamento com miglustat, bem como avaliar o efeito in vitro de diferentes antioxidantes.

Objetivos específicos são: a) avaliar o dano oxidativo ao DNA em pacientes através: a1) do ensaio cometa com as enzimas de reparo endonuclease III e formamidopirimidina-DNA-glicosilase em leucócitos de pacientes; a2) do estudo da capacidade de reparo do dano ao DNA induzido por peróxido de hidrogênio em leucócitos de pacientes; a3) da dosagem de 8-hidróxi-2'-desoxiguanosina em urina de pacientes; b) avaliar os níveis de citocinas pró- e anti-inflamatórias, nomeadamente interleucinas (IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10), interferon-gama (IFN-), fator de necrose tumoral alfa (TNF-) e fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) em plasma e fibroblastos de pacientes; c) avaliar a regulação do estresse oxidativo e da inflamação, através da análise da expressão gênica do Nrf-2, do NF-B, da HO-1 e da iNOS2 a partir de amostras de sangue periférico; d) avaliar a oxidação lipídica em plasma, fibroblastos e urina de pacientes, através da medida de malondialdeído (MDA), e isoprostanos; e) avaliar o metabolismo da glutatona, através da medida da atividade da glutatona peroxidase, glutatona redutase, glutamato-cisteína ligase e glutatona-S-transferase, bem como dos níveis de glutatona reduzida e glutatona oxidada em eritrócitos de pacientes; f) avaliar o efeito in vitro de antioxidantes (N-acetilcisteína e resveratrol) sobre o dano ao DNA em leucócitos de pacientes e sobre a produção de citocinas em fibroblastos de pacientes, bem como sobre a produção de oxisteróis (colestano-3,5,6-triol); g) avaliar os níveis de colestano-3,5,6-triol em plasma de pacientes, antes e ao longo do tratamento com miglustat e em indivíduos controle; h) avaliar o acúmulo de colesterol em fibroblastos de pacientes antes e durante o tratamento com miglustat e antioxidantes através da coloração de Filipin; i) avaliar o dano neurológico em pacientes através da determinação dos marcadores plasmáticos de neurodegeneração, como fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), catepsina D, molécula de adesão celular neuronal (NCAM), inibidor do ativador de plasminogênio tipo I total (PAI-1 total) e fator de crescimento derivado de plaquetas AA (PDGF-AA e PDGF-AB/BB) antes e após tratamento com miglustat; j) e correlacionar biomarcadores de estresse oxidativo e inflamação com os níveis de colestano-3,5,6-triol.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Possíveis Riscos: Não são conhecidos outros riscos aos participantes, além daqueles relacionados à coleta de sangue periférico e coleta de fibroblastos. Complicações de coleta de sangue são raras e geralmente são simples. No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor em decorrência da punção da pele. Se houver vazamento de sangue da veia no local da punção

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.360 sala 2229
Bairro: Santa Cecília CEP: 90.035-903
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7840 Fax: (51)3359-7840 E-mail: cep@hcpa.edu.br

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL



Continuação do Parecer: 2.968.204

geralmente há uma mancha roxa (hematoma) e um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias. O procedimento de coleta de fibroblastos se dá através da retirada de um pequeníssimo fragmento de pele através de uma biópsia, onde o paciente receberá uma anestesia tópica no local. As coletas de sangue e fibroblastos serão realizadas por profissionais especialmente treinados para este fim, o que diminui as chances de complicações. Possíveis Benefícios: Não haverá benefícios diretos aos participantes.

Os benefícios, se houver, serão generalizáveis a todos os portadores da doença de Niemann-Pick tipo C. Se as hipóteses forem confirmadas, espera-se esclarecer alguns mecanismos fisiopatológicos relacionados ao estresse oxidativo nesta doença e com isso ter um melhor entendimento tanto desta enfermidade quanto da sua terapêutica, bem como sugerir o estabelecimento de outras terapêuticas medicamentosas para essa doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto interessante e relevante. Os pesquisadores propõe avaliar mecanismos bioquímicos em pacientes portadores de NP-C antes e durante o tratamento com miglustat, bem como avaliar o efeito in vitro de diferentes antioxidantes.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de rosto e delegação de funções apresentados e adequados. São apresentados dois TCLEs, um para indivíduos controles e outro para indivíduos portadores de doença Niemann-Pick tipo C.

Recomendações:

Recomenda-se que durante o processo de consentimento seja explicado com maior clareza a coleta de "urina ocasional".

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências emitidas para o projeto no parecer 2.886.920 foram adequadamente respondidas pelos pesquisadores, conforme carta de respostas adicionada em 01/10/2018. Não apresenta novas pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Lembramos que a presente aprovação (versão projeto 01/10/2018 TCLE 01/10/2018 e demais documentos que atendem às solicitações do CEP) refere-se apenas aos aspectos éticos e metodológicos do projeto.

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília CEP: 90.035-903
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3350-7640 Fax: (51)3350-7640 E-mail: cep@hcpa.edu.br

Continuação do Parecer: 2.968.204

Os pesquisadores devem atentar ao cumprimento dos seguintes itens:

- a) Este projeto está aprovado para inclusão de 30 participantes no Centro HCPA, de acordo com as informações do projeto apresentado. Qualquer alteração deste número deverá ser comunicada ao CEP e ao Serviço de Gestão em Pesquisa para autorizações e atualizações cabíveis.
- b) O projeto deverá ser cadastrado no sistema AGHUse Pesquisa para fins de avaliação logística e financeira e somente poderá ser iniciado após aprovação final do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação.
- c) Qualquer alteração nestes documentos deverá ser encaminhada para avaliação do CEP. Informamos que obrigatoriamente a versão do TCLE a ser utilizada deverá corresponder na íntegra à versão vigente aprovada.
- d) Deverão ser encaminhados ao CEP relatórios semestrais e um relatório final do projeto.
- e) A comunicação de eventos adversos classificados como sérios e inesperados, ocorridos com pacientes incluídos no centro HCPA, assim como os desvios de protocolo quando envolver diretamente estes pacientes, deverá ser realizada através do Sistema GEO (Gestão Estratégica Operacional) disponível na intranet do HCPA.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1132005.pdf	01/10/2018 16:04:08		Aceito
Outros	carta_ao_CEP.docx	01/10/2018 16:03:37	TATIANE GRAZIELI HAMMERSCHMIDT	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Tatiane_corrigido.doc	01/10/2018 16:03:19	TATIANE GRAZIELI HAMMERSCHMIDT	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Tatiane_controles.doc	01/10/2018 16:03:09	TATIANE GRAZIELI HAMMERSCHMIDT	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_doutorado_Tatiane_com_equipe.docx	01/10/2018 16:02:50	TATIANE GRAZIELI HAMMERSCHMIDT	Aceito
Outros	formulario_delegacao_funcoes.pdf	08/08/2018 14:46:42	TATIANE GRAZIELI HAMMERSCHMIDT	Aceito

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília CEP: 90.035-903
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 Fax: (51)3359-7640 E-mail: cep@hcpa.edu.br

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL



Continuação do Parecer: 2.968.204

Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	12/06/2018 14:46:10	TATIANE GRAZIELI HAMMERSCHMIDT	Aceito
----------------	--------------------	------------------------	-----------------------------------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 18 de Outubro de 2018

Assinado por:
Marcia Mocellin Raymundo
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília CEP: 90.035-903
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3350-7640 Fax: (51)3350-7640 E-mail: cep@hopa.edu.br

8.2 Anexo 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Indivíduos saudáveis)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Grupo Controle)

Nº do projeto GPPG ou CAAE: 95636618.2.0000.5327

Título do Projeto: ESTUDO DOS MECANISMOS INFLAMATÓRIOS E DE DANO OXIDATIVO EM PACIENTES PORTADORES DE NIEMANN-PICK TIPO C: EFEITO *IN VIVO* DO MIGLUSTATE E *IN VITRO* DE ANTIOXIDANTES

Você, ou a pessoa pela qual você é responsável, está sendo convidado a participar de uma pesquisa cujo objetivo é relacionar marcadores moleculares (tanto marcadores inflamatórios como radicais livres) em pacientes com Niemann-Pick tipo C (NPC). Você está sendo convidado a participar como grupo controle, ou seja, porque não possui o diagnóstico da condição em estudo, NPC. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Serviço de Genética Médica (SGM) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Se você aceitar participar da pesquisa, os procedimentos envolvidos em sua participação são os seguintes: serão perguntados alguns dados como nome, idade, uso de medicação, se você é fumante e se possui doença prévia. Serão coletadas amostras de sangue periférico e urina. Será necessário coletar 5 mL de sangue (equivalente a 1 colher de chá).

Os riscos envolvidos na sua participação são relativos à coleta de sangue, que será realizada por profissional treinado e habilitado. Poderá haver alguma dor em decorrência da punção da pele. Se houver vazamento de sangue da veia no local da punção geralmente há uma mancha roxa (hematoma) e um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias. A coleta de sangue será realizada por profissionais especialmente treinados para este fim, o que diminui as chances de complicações. A coleta de urina será feita pelo próprio participante com a orientação de profissionais treinados. Após o término do estudo os materiais biológicos que ainda estiverem armazenados poderão ser descartados ou mantidos para futuras pesquisas dentro do mesmo objetivo deste estudo, de acordo com a sua decisão de autorizar o uso futuro. Se autorizado, você poderá ser chamado para consentir novamente com a utilização.

Com relação ao uso dos materiais biológicos, ao final do estudo, você (marque com um X):

- autoriza o armazenamento.
- não autoriza o armazenamento, solicitando que sejam descartados.

A participação na pesquisa não trará benefícios diretos aos participantes, porém, contribuirá para o aumento do conhecimento sobre o assunto estudado, e poderá beneficiar futuros pacientes.

Você tem direito à privacidade. Os resultados deste estudo poderão ser publicados em revistas científicas, mas o seu nome (e/ou do seu responsável) não será revelado. Por meio deste termo, você autoriza que os pesquisadores envolvidos neste estudo pesquisem os seus registros médicos a fim de obter as informações clínicas necessárias para a realização desta pesquisa. Sua participação no estudo é voluntária. Se você decidir não participar do estudo, isto não afetará em nada o seu tratamento no hospital. A participação pode também ser interrompida a qualquer momento por você mesmo (a).

É importante ressaltar que nem você, nem o seu responsável, receberão algum tipo de pagamento pela participação no estudo e que todas as despesas relacionadas ao custo dos exames laboratoriais exclusivos da pesquisa serão cobertas por verbas do próprio projeto de pesquisa.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável Profa. Dra. Carmen Regla Vargas ou com a Pesquisadora Tatiane Hammerschmidt pelo telefone (51) 3359.8011, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

Nome do participante da pesquisa

Assinatura

Nome do responsável (se aplicável)

Assinatura do responsável (se aplicável)

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

Local e Data:

8.3 Anexo 3: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Pacientes NP-C)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Grupo NPC)

Nº do projeto GPPG ou CAAE: 95636618.2.0000.5327

Título do Projeto: ESTUDO DOS MECANISMOS INFLAMATÓRIOS E DE DANO OXIDATIVO EM PACIENTES PORTADORES DE NIEMANN-PICK TIPO C: EFEITO *IN VIVO* DO MIGLUSTATE E *IN VITRO* DE ANTIOXIDANTES

Você, ou a pessoa pela qual você é responsável, está sendo convidado a participar de uma pesquisa cujo objetivo é relacionar marcadores moleculares (tanto marcadores inflamatórios como radicais livres) com a evolução da doença e o tratamento que você realiza. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Serviço de Genética Médica (SGM) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Você está sendo convidado porque já possui o diagnóstico de Niemann-Pick tipo C (NPC) e realiza acompanhamento nesta Instituição.

Se você aceitar participar da pesquisa, os procedimentos envolvidos em sua participação são os seguintes:

- Coleta de alíquota adicional de sangue (5 mL, equivalente a uma colher de chá) quando da realização do exame de rotina;
- Coleta de urina ocasional;
- Autorizar utilização do material da biópsia realizada conforme indicação assistencial, ou realizar uma nova coleta caso este não seja possível;
- Autorizar consulta de prontuário de dados (sociodemográficos, clínicos e resultados de exames).

Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação na pesquisa são os mesmos da coleta de sangue para os exames assistenciais, ou seja, será coletado um pouco de sangue a mais durante a realização do exame que você já iria fazer. No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor em decorrência da punção da pele. Complicações de coleta de sangue são raras e geralmente simples. Se houver vazamento de sangue da veia no local da punção poderá se formar uma mancha roxa (hematoma) e um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias. Para a coleta de fibroblastos, você receberá uma anestesia tópica (cremes anestésicos) e o procedimento se dará através da retirada de um pequeníssimo fragmento (3 mm, equivalente ao tamanho de uma cabeça de fósforo) de pele através de uma biópsia. As coletas de sangue e fibroblastos serão realizadas por profissionais especialmente treinados para este fim, o que diminui as chances de complicações. As coletas de urina serão feitas pelo próprio paciente ou com o auxílio de profissionais treinados.

A participação na pesquisa não trará benefícios diretos aos participantes, porém, contribuirá para o aumento do conhecimento sobre o assunto estudado, e poderá beneficiar futuros pacientes com Niemann-Pick tipo C.

Após o término do estudo os materiais biológicos que ainda estiverem armazenados poderão ser descartados ou mantidos para futuras pesquisas dentro do mesmo objetivo deste estudo, de acordo com a sua decisão de autorizar o uso futuro. Se autorizado, você poderá ser chamado para consentir novamente com a utilização.

Com relação ao uso dos materiais biológicos, ao final do estudo, você (marque com um X):

- autoriza o armazenamento.
 não autoriza o armazenamento, solicitando que sejam descartados.

Você tem direito à privacidade. Os resultados deste estudo poderão ser publicados em revistas científicas, mas o seu nome (e/ou do seu responsável) não será revelado. Por meio deste termo, você autoriza que os pesquisadores envolvidos neste estudo pesquisem os seus registros médicos a fim de obter as informações clínicas necessárias para a realização desta pesquisa. Sua participação no estudo é voluntária. Se você decidir não participar do estudo, isto não afetará em nada o seu tratamento no hospital. A participação pode também ser interrompida a qualquer momento por você mesmo (a).

É importante ressaltar que nem você, nem o seu responsável, receberão algum tipo de pagamento pela participação no estudo e que todas as despesas relacionadas ao custo dos exames laboratoriais exclusivos da pesquisa serão cobertas por verbas do próprio projeto de pesquisa.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável Profa. Dra. Carmen Regla Vargas ou com a Pesquisadora Tatiane Hammerschmidt pelo telefone (51) 3359.8011, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Este documento será elaborado em duas vias, sendo que uma delas será entregue a você, participante da pesquisa, e a outra será mantida com o nosso grupo de pesquisa.

Nome do participante da pesquisa

Assinatura

Nome do responsável (se aplicável)

Assinatura do responsável (se aplicável)

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

Local e Data: _____

8.4 *Comprovativo de submissão de artigo no periódico Metabolic Brain Disease*

De: Metabolic Brain Disease em@editorialmanager.com 
Assunto: MEBR-D-22-00255 - Submission Confirmation for Evidence of redox imbalance and mitochondrial dysfunction in Niemann-Pick type C 1 patients: in vitro effect of combined therapy with antioxidants and β -cyclodextrin nanoparticles - [EMID:0560ee626f695ae2]
Data: 14 de maio de 2022, 11:46
Para: Tatiane Grazieli Hammerschmidt tatiane.hammerschmidt@gmail.com

Dear Mrs Hammerschmidt,

Your submission entitled "Evidence of redox imbalance and mitochondrial dysfunction in Niemann-Pick type C 1 patients: in vitro effect of combined therapy with antioxidants and β -cyclodextrin nanoparticles" has been received by Metabolic Brain Disease

The submission ID is: MEBR-D-22-00255

Please refer to this number in any future correspondence.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <https://www.editorialmanager.com/mebr/>.

Thank you for submitting your work to our journal.

Kind regards,

Editorial Office
Metabolic Brain Disease

Now that your article will undergo the editorial and peer review process, it is the right time to think about publishing your article as open access. With open access your article will become freely available to anyone worldwide and you will easily comply with open access mandates. Springer's open access offering for this journal is called Open Choice (find more information on www.springer.com/openchoice). Once your article is accepted, you will be offered the option to publish through open access. So you might want to talk to your institution and funder now to see how payment could be organized; for an overview of available open access funding please go to www.springer.com/oafunding. Although for now you don't have to do anything, we would like to let you know about your upcoming options.

This letter contains confidential information, is for your own use, and should not be forwarded to third parties.

Recipients of this email are registered users within the Editorial Manager database for this journal. We will keep your information on file to use in the process of submitting, evaluating and publishing a manuscript. For more information on how we use your personal details please see our privacy policy at <https://www.springernature.com/production-privacy-policy>. If you no longer wish to receive messages from this journal or you have questions regarding database management, please contact the Publication Office at the link below.

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/mebr/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.

8.5 *Comprovativo de submissão de artigo no periódico Clinica Chimica Acta*

De: Clinica Chimica Acta em@editorialmanager.com
Assunto: Thank you for your submission to Clinica Chimica Acta
Data: 2 de agosto de 2022, 19:26
Para: Tatiane Grazieli Hammerschmidt tatiane.hammerschmidt@gmail.com



Dear Ms Hammerschmidt,

Thank you for sending your manuscript Plasmatic neurodegeneration markers in Niemann-Pick type C1 patients: beneficial effects of miglustat treatment for consideration to Clinica Chimica Acta. Please accept this message as confirmation of your submission.

When should I expect to receive the Editor's decision?
 For Clinica Chimica Acta, the average editorial time (in weeks) from submission to first decision is: 2.93 and from submission to final decision is: 6.14.

What happens next?
 Here are the steps that you can expect as your manuscript progresses through the editorial process in the Editorial Manager (EM).

1. First, your manuscript will be assigned to an Editor and you will be sent a unique reference number that you can use to track it throughout the process. During this stage, the status in EM will be "With Editor".
2. If your manuscript matches the scope and satisfies the criteria of Clinica Chimica Acta, the Editor will identify and contact reviewers who are acknowledged experts in the field. Since peer-review is a voluntary service, it can take some time but please be assured that the Editor will regularly remind reviewers if they do not reply in a timely manner. During this stage, the status will appear as "Under Review".

Once the Editor has received the minimum number of expert reviews, the status will change to "Required Reviews Complete".

3. It is also possible that the Editor may decide that your manuscript does not meet the journal criteria or scope and that it should not be considered further. In this case, the Editor will immediately notify you that the manuscript has been rejected and may recommend a more suitable journal.

For a more detailed description of the editorial process, please see Paper Lifecycle from Submission to Publication:
http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/160/p/8045/

How can I track the progress of my submission?
 You can track the status of your submission at any time at <https://www.editorialmanager.com/CCAATA>

Once there, simply:

1. Enter your username: Your username is: TatianeHammerschmidt

If you need to retrieve password details, please go to: <https://www.editorialmanager.com/ccacta/l.asp?i=448102&l=X8LO78FD>

2. Click on [Author Login]. This will take you to the Author Main Menu
3. Click on [Submissions Being Processed]

Many thanks again for your interest in Clinica Chimica Acta.

Kind regards,

Professor Joris Delanghe

For further assistance, please visit our customer support site at <https://service.elsevier.com/app/home/support/publishing/>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EM via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

This journal uses the Elsevier Article Transfer Service. This means that if an editor feels your manuscript is more suitable for an alternative journal, then you might be asked to consider transferring the manuscript to such a journal. The recommendation might be provided by a Journal Editor, a dedicated Scientific Managing Editor, a tool assisted recommendation, or a combination. For more details see the journal guide for authors.

#AU_CCAATA#

To ensure this email reaches the intended recipient, please do not delete the above code

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/ccacta/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.

8.6 Comprovativo de submissão de artigo no periódico *International Journal of Developmental Neuroscience*

International Journal of Developmental Neuroscience - Manuscript ID IJDN-2022-07-0121 [email ref: SE-6-a]



De International Journal of Developmental Neuroscience <onbehalf@manuscriptcentral.com>
Para <tatiane.hammerschmidt@ufrgs.br>
Cópia <tatiane.hammerschmidt@ufrgs.br>, <gilian_guerreiro@hotmail.com>, <donida.bruna@gmail.com>, <marcorah@gmail.com>, <kessler@hcpa.edu.br>, <bernardesferro@gmail.com>, <dinjamoura@gmail.com>, <rgiugliani@hcpa.edu.br>, <cvargas@hcpa.edu.br>
Responder p... <IJDNoffice@wiley.com>
Data 2022-07-29 06:59

29-Jul-2022

Dear Tatiane Hammerschmidt G:

Your manuscript entitled "Beneficial in vitro effect of antioxidants on DNA damage in fibroblasts from Niemann-Pick type C 1 patients" by G, Tatiane Hammerschmidt; Guerreiro, Gilian; Donida, Bruna; Raabe, Marco; G, Rejane Kessler; B, Matheus Ferro; Moura, Dinara ; Giugliani, Roberto; Vargas, Carmen, has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in International Journal of Developmental Neuroscience.

Co-authors: Please contact the Editor-in-Chief Office as soon as possible if you disagree with being listed as a co-author for this manuscript.

Your manuscript ID is IJDN-2022-07-0121.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc.manuscriptcentral.com/ijdn> and edit your user information as appropriate.

Our journal is currently transitioning to Wiley's Research Exchange submission portal.

If you submitted this manuscript through our Research Exchange site, you can view the status of your manuscript by logging into the submission site at wiley.atyponrex.com/journal/ijdn

If you submitted this manuscript through ScholarOne, you can view the status of your manuscript by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/ijdn>.

Thank you for submitting your manuscript to International Journal of Developmental Neuroscience.

Sincerely,
 International Journal of Developmental Neuroscience Editorial Office