

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências

**IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS BIOMARCADORES E POTENCIAIS ALVOS TERAPÊUTICOS PARA A DOENÇA DE
GAUCHER: UM ESTUDO COM ÊNFASE NA β_2 -MICROGLOBULINA, FERRITINA E HEPICIDINA**

Tiago de Bone Koppe

Porto Alegre

2017

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências

Tiago de Bone Koppe

**IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS BIOMARCADORES E POTENCIAIS ALVOS DE TERAPÊUTICOS PARA A DOENÇA
DE GAUCHER: UM ESTUDO COM ÊNFASE NA β_2 -MICROGLOBULINA, FERRITINA E HEPCIDINA**

Tese de doutoramento submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Ida Vanessa D. Schwartz

Co-orientadora: Profa. Dra. Liane Esteves Daudt

Porto Alegre, maio de 2017

Este trabalho foi parcialmente desenvolvido no Serviço de Genética Médica e no Laboratório BRAIN (*Basic Research and Advanced Investigations in Neurosciences*), ambos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre/Universidade Federal do Rio Grande do Sul, complementado com período sanduíche no *Center for Life Sciences* e no *Beth Israel Deaconess Medical Center*, ambos na Universidade Harvard/*Harvard Medical School* e subvencionado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES).

Este trabalho é inteiramente dedicado à memória dos meus pais, Raimundo da Silva Koppe e Eloisa de Bone Koppe.

Agradecimentos

Agradecimentos são devidos a muitos. Difícil de mencionar em poucas linhas todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esse texto tomasse forma e chegasse a cabo. Verdadeiramente, cumprimento e agradeço todo o corpo discente e docente do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular desta Universidade que, por meio de gestos, palavras e atitudes, sempre me influenciaram positivamente. Faço um agradecimento especial à minha orientadora, professora Ida Schwartz. Sem dúvida, seus ensinamentos e jeito característico de orientar – com liberdade plena, mas com exigência máxima – aliados ao seu lado humano e engajado, formaram um espelho a ser seguido em minha vida futura e, ao mesmo tempo, foram determinantes para que minha vida acadêmica tivesse tido o salto de produtividade que teve. Minhas demais coorientadoras também foram vitais durante o meu período de doutoramento. Sou grato à professora Liane Daudt por emprestar-me todo o seu conhecimento científico em hematologia (indispensável a essa tese) e à professora Paula Fraenkel por oportunizar-me um ano inesquecível de aprendizado na Harvard Medical School. O grupo Gaucher do qual faço parte também merece todo meu carinho, tendo sido todos (ou todas!) muito importantes no decorrer do meu período de doutoramento. Agradeço em particular minhas colegas Marina Siebert e Suelen Basgalupp pela ajuda direta e essencial nas análises de hepcidina. Não posso não abraçar também o nosso Elmo Cardoso, uma pessoa ímpar dentro deste programa de pós-graduação, que, por essas felizes coincidências do destino, foi colega do meu querido pai nesta Universidade Federal na década de 1970, e que (embora colorado!) aprendi a respeitar muito. Não poderia deixar de expressar aqui todo o meu carinho a meus pais, avós, irmãos, tios, primos e demais familiares, os quais foram essenciais nesses anos de luta, provendo-me todo suporte e amor de que eu necessitava para seguir em frente. Dentre esses, há um trio elegantemente elegante (e na moda) com quem convivo diariamente e que merece beijos todos especiais: minha titia, madrinha e mãe emprestada Valkiria Koppe, meu jogador de videogame predileto, pupilo e aprendiz Teodoro Koppe e a minha querida companheira de quase uma década Taiane Feiten. Encerro estes agradecimentos com 10^{100} beijos anos-luz, soprados por entre o infinito das estrelas, àqueles cujos laços nunca se desatara(m)/(ão): – inseparáveis de mim desde o meu genoma até o misterioso éter que permeia o desconhecido de toda a existência.

Lista de Figuras

Figura 1. Capa da tese de doutoramento de Philippe Gaucher.

Figura 2. Localização cromossômica do gene *GBA1*.

Figura 3. Estrutura tridimensional da enzima β -glicosidase ácida (ou glicosilceramidase).

Figura 4. Rota metabólica afetada na Doença de Gaucher.

Figura 5. Fotomicrografia de uma Célula de Gaucher

Figura 6. Célula de Gaucher com coloração para ferro.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Características clínicas presentes na Doença de Gaucher.

Resumo

INTRODUÇÃO: A Doença de Gaucher (DG) é uma esfingolipidose causada pela deficiência de β -glicosidase. Ela apresenta alterações multissistêmicas, que não são completamente tratadas com as modalidades atuais de tratamento. Mediadores humorais alterados, nesse sentido, têm contribuído tanto para o avanço da elucidação fisiopatológica e proposição de novos alvos terapêuticos quanto para a descoberta de novos biomarcadores. Entre tais, há sugestões na literatura de prejuízo à homeostase do ferro, fato relevante devido ao seu potencial de gerar estresse oxidativo e poder atuar como fator modificador da doença. **OBJETIVOS:** 1) propor, para a DG, hepcidina e β 2-microglobulina como novos biomarcadores e avaliar a utilidade da ferritina (total e glicosilada) em pacientes brasileiros; 2) sugerir tanto o ferro como fator modificador quanto o mecanismo etiológico da anemia na DG e 3) identificar novos fármacos moduladores de hepcidina *in vitro* e *in vivo*. **METODOLOGIA:** Para os objetivos 1) e 2), a amostra foi proveniente do Centro de Referência para Doença de Gaucher do Rio Grande do Sul, os dados clínicos obtidos por meio de revisão dos prontuários e a quantificação de hepcidina, ferritina glicosilada e IL-6 realizadas por técnica de ELISA. Em relação ao objetivo 3), hepatócitos humanos com sistema *reporter* para hepcidina foram tratados com fármacos específicos e tiveram os efeitos *in vitro* aferidos espectrofotometricamente e com *Real-Time* PCR e *Western Blot* para genes e proteínas de interesse. Os efeitos *in vivo* foram testados em camundongos *wild type* ou $Hbb^{Th3+/-}$. **RESULTADOS:** Objetivo 1): avaliou-se β 2-microglobulina em 31 pacientes com mediana de 2180 [1880-2919] ng/mL e correlação com quitotriosidase ($\rho=0,65$; $p<0,01$) e plaquetas ($\rho=-0,42$; $p=0,02$). Ainda, os escores de gravidade foram mais elevados em pacientes com elevação de β 2-microglobulina do que nos sem elevação (4 [3–6,5] vs. 2,5 [1–4,2]; $p=0,04$). Comparações pré- e pós-tratamento revelaram redução da β 2-microglobulina (2931 vs. 1970 ng/mL; $p<0,01$; $n=8$). Avaliou-se a hepcidina em 34 pacientes, nos quais a mediana foi 106,3 [72,1-194] ng/mL (referência 65,8 ng/mL) e correlacionada, em modelo de regressão múltipla, com quitotriosidase e ALT. Comparações pré- e pós-tratamento mostraram redução da hepcidina 101,2 [67,2-225] vs 57,3 [24,5-113,5] ng/mL ($p=0,026$; $n=19$). Não houve correlação com a forma glicosilada de ferritina, bem como não houve diferença dela com sua forma total. Ainda, avaliamos em 18 pacientes virgens de tratamento o efeito da terapia-padrão sobre a concentração sérica de ferritina total. Nesses, inicialmente havia hiperferritinemia, revertida após o tratamento (756 [318-1441] vs. 521 [227-626] ng/mL; $p=0,025$) e acompanhado de melhora clínica global. Não houve

correlação com gravidade. Objetivo 2) a hepcidina se correlacionou com IL-6 ($\rho=0,36$; $p=0,038$; $n=34$) e VCM ($\rho=-0,37$; $p=0,035$; $n=33$). Após um período de observação, juntamente com a redução dos níveis de hepcidina, houve incremento na saturação de transferrina (24 [17,6-27,6] vs. 31,6 [24,3-35,9]%; $p=0,023$; $n=23$), no ferro sérico (78 [57-90] vs. 86 [76,5-102] $\mu\text{g/mL}$; $p=0,037$; $n=25$) e VCM (84,6 [79,7-90,3] vs. 87,7 [82,3-93,1] fL; $p<0,001$; $n=33$). Objetivo 3) identificamos 13 fármacos com efeito na expressão hepcidina. Mostramos também que a ipriflavona reduz o ferro hepático e a expressão intestinal de ferroportina, bem como aumenta os transcritos e a concentração sérica de hepcidina em camundongos *wild type*. **CONCLUSÃO:** Propomos a hepcidina e a β_2 -microglobulina como novos biomarcadores e comprovamos a utilidade da ferritina total como biomarcador de resposta ao tratamento em pacientes brasileiros com DG. Heparidina e IL-6 elevados e hipoferremia com microcitose, revertidos após um período sob tratamento, sugerem a anemia inflamatória como a etiologia na DG e sugerem que pode haver sobrecarga tecidual de ferro paradoxal. Por fim, os fármacos identificados, além de representarem potenciais medicamentos moduladores do metabolismo do ferro, forneceram as bases para que estratégias similares sejam testadas em modelos de DG, resultando em novas terapias para a DG.

Palavras-chave: Doença de Gaucher; biomarcadores; hepcidina; ferritina; β_2 -microglobulina

Abstract

INTRODUCTION: Gaucher disease (GD) is a sphingolipidosis caused by β -glucosidase deficiency. It presents multisystemic changes, which are not completely treated with current treatment modalities. In this sense, altered humoral mediators have contributed both to the advancement of pathophysiological comprehension and the proposition of new therapeutic targets and discovery of new biomarkers. Accordingly, there are suggestions in the literature of iron dishomeostasis, fact due that is relevant because of its potential to generate oxidative stress and to potentially act as a disease modifying factor. **OBJECTIVES:** 1) to propose, for GD, hepcidin and β 2-microglobulin as new biomarkers and to evaluate the utility of ferritin (total and glycosylated) in Brazilian patients; 2) suggest both iron as modifying factor and the etiological mechanism of anemia in GD and 3) identify new synthetic hepcidin modulators *in vitro* and *in vivo*. **METHODOLOGY:** For the purposes 1) and 2), the sample was obtained from the Reference Center for Gaucher Disease of Rio Grande do Sul, the clinical data obtained through chart review and quantification of hepcidin, glycosylated ferritin and IL-6 were performed by ELISA approaches. In relation to objective 3), human hepatocytes with reporter system for hepcidin were treated with specific drugs and had their *in vitro* effects measured spectrophotometrically and subsequently confirmed with Real-Time PCR and Western Blot for genes and proteins of interest. *In vivo* effects were tested on wild type or Hbb^{Th3 +/-} mice. **RESULTS:** Objective 1): β 2-microglobulin was evaluated in 31 patients with a median of 2180 [1880-2919] ng/mL. Correlation was observed with chitotriosidase ($\rho=0.65$, $p<0.01$) and platelets ($\rho=0.42$, $p=0.02$). Furthermore, severity scores were higher in patients with β 2-microglobulin elevation than in patients without elevation (4 [3-6.5] vs. 2.5 [1-4.2], $p=0.04$). Pre- and post-treatment comparisons revealed a reduction of β 2-microglobulin (2931 vs. 1970 ng/mL, $p<0.01$, $n=8$). Hepcidin was evaluated in 34 patients, in which the median was 106.3 [72.1-194] ng/mL (reference 65.8 ng/mL) and correlated in a multiple regression model with chitotriosidase and ALT. Pre- and post-treatment comparisons showed reduction of hepcidin levels 101.2 [67.2-225] vs 57.3 [24.5-113.5] ng/mL ($p=0.026$; $n=19$). There was no correlation with the glycosylated form of ferritin, nor was there any difference with its total form. Furthermore, we evaluated the effect of standard therapy on total ferritin serum concentration in 18 treatment-naive patients. In these patients, hyperferritinemia was reversed after treatment (756 [318-1441] vs. 521 [227-626] ng/mL, $p=0.025$) and accompanied by overall clinical improvement. There was no correlation with severity. Objective 2), hepcidin correlated with IL-6 ($\rho=0.36$, $p=0.038$, $n=34$) and

MCV ($p=0.037$, $p=0.035$, $n=33$). After the interval of the study, together with the reduction of hepcidin levels, there was an increase in transferrin saturation (24 [17.6-27.6] vs. 31.6 [24.3-35.9] %, $p=0.037$, $n=23$), serum iron (78 [57-90] vs. 86 [76.5-102] $\mu\text{g/mL}$, $p=0.037$, $n=25$) and VCM (84.6 [79.7- 90.3] vs. 87.7 [82.3-93.1] fL; $p<0.001$; $n=33$). Objective 3) we identified 13 drugs showing effect on hepcidin expression. We have also shown that ipriflavone reduces hepatic iron and the intestinal expression of ferroportin, as well as increases the hepatic transcripts and the serum concentration of hepcidin in wild type mice. **CONCLUSION:** We propose hepcidin and β_2 -microglobulin as new biomarkers and we prove the usefulness of total ferritin as a biomarker of response to treatment in Brazilian patients with GD. Hepcidin and elevated IL-6 and hypoferrremia with microcytosis, reversed after a period under treatment, suggest inflammatory anemia as the etiology in GD and suggest that paradoxical iron overload can occur in certain tissues contributing to the pathophysiology. Finally, the drugs identified, besides representing potential drugs modulating iron metabolism, provided the basis for similar strategies to be tested in GD models, resulting in new therapies for the disease.

Keywords: Gaucher Disease; biomarkers; hepcidin; ferritina; β_2 -microglobulin.

Sumário

1. Introdução – Doença de Gaucher.....	13
1.1. Doença de Gaucher – Histórico e Definição.....	13
1.2. Doença de Gaucher – Caracterização Molecular e Bioquímica	16
1.3. Doença de Gaucher – Caracterização Fisiopatogênica.....	20
1.4. Doença de Gaucher – Caracterização Clínica.....	22
1.5. Doença de Gaucher e Biomarcadores	25
1.5.1. Doença de Gaucher e Biomarcadores – β_2 -microglobulina.....	26
1.5.2. Doença de Gaucher e Biomarcadores – Ferritina Sérica	27
1.5.3. Doença de Gaucher e Biomarcadores – Hpcidina.....	30
2. Introdução – Metabolismo do Ferro	30
2.1. Metabolismo do Ferro – Estado Fisiológico.....	30
2.2. Metabolismo do Ferro – Estado Patológico.....	34
2.3. Metabolismo do Ferro – Estado Patológico de Sobrecarga.....	37
3. Justificativas.....	42
4. Objetivos.....	44
5. Artigos Científicos	46
5.1. Artigo 1: Serum β_2 -microglobulin is frequently elevated in type 1 Gaucher patients	46
5.2. Artigo 2: The prognostic value of the serum ferritin in a southern Brazilian cohort of patients with Gaucher disease	49
5.3. Artigo 3 (manuscrito em preparação): Gaucher disease patients show elevated serum hepcidin levels	54
5.4. Artigo 4: Dietary supplementation with ipriflavone decreases hepatic iron stores in wild type mice.....	73
6. Conclusões	81
7. Perspectivas Futuras.....	87
8. Referências.....	89

1. Introdução – Doença de Gaucher

1.1. Doença de Gaucher – Histórico e Definição

A construção conceitual da Doença de Gaucher (DG) iniciou-se em 1882, a partir da publicação de um relato de caso fornecido pelo dermatologista francês Philippe Charles Ernest Gaucher (Desnick, 1982). No relato – objeto da sua tese de doutoramento (Figura 1) – Gaucher descreveu o curso clínico de uma mulher adulta que se mostrava com hepatoesplenomegalia e com histórico de múltiplas internações: motivadas tanto por episódios de sangramento quanto por dores abdominais. Gaucher empreendeu análises *post-mortem* em diversos órgãos. Em síntese, essas análises revelaram que: 1) nos esfregaços de sangue periférico, não havia qualquer evidência de proliferação branca; 2) no fígado, histologicamente havia fibrose intersticial ampla, com perda da microestrutura lobular e, 3) no baço, à microscopia óptica, havia completa desestruturação do parênquima esplênico, o qual se apresentava com proliferação de “células epiteliais” – algumas delas maiores que as outras, com núcleo excêntrico e citoplasma irregular (Gaucher, 1882).

Seguindo Gaucher, houve mais publicações de casos similares, as quais serviram não só para cunhar e perpetuar os epônimos Célula de Gaucher (CG) (às células grandes) e DG (ao quadro clinicopatológico) como também para acrescentar e aprimorar o entendimento sobre essa condição. Por exemplo, Brill (1901) e Brill *et al.* (1905) trouxeram a noção de hereditariedade ao relatarem os diagnósticos post-mortem de três irmãos, em cujo desdobramento houve o primeiro diagnóstico *pre-mortem* descrito, justamente num quarto probando dessa família. Nos anos seguintes, análises de extratos esplênicos de indivíduos com DG revelaram o acúmulo anômalo de uma substância hialina, bioquimicamente caracterizada como glicosilceramida, um glicosfingolipídio conhecido desde o final do século XIX (Aghion, 1934).

Essa caracterização foi central na construção do conceito de DG, visto que permitiu a Roscoe O. Brady sublinhar o porquê do acúmulo: um defeito enzimático (Brady *et al.*, 1965b): que não estava na síntese exagerada (Trams & Brady, 1960), mas sim na degradação ineficiente de glicosilceramida (Brady *et al.*, 1965a; 1966a).

Tal avanço permitiu que Brady (1966) teorizasse uma intervenção médica baseada na reposição exógena da enzima alterada – estratégia com potencial de mudar a história natural da DG e das outras esfingolipidoses catalogadas à época. Além disso, permitiu que se desenvolvessem protocolos de quantificação da atividade enzimática (Kampine *et al.*, 1967), que rapidamente se

aperfeiçoaram para incorporar técnicas colorimétricas (Ockerman, 1968) extremamente seguras, metodologicamente simples, padronizadas em leucócitos (Beutler & Kuhl, 1970) e que facilitaram sobremaneira o diagnóstico, o aconselhamento genético e a pesquisa.

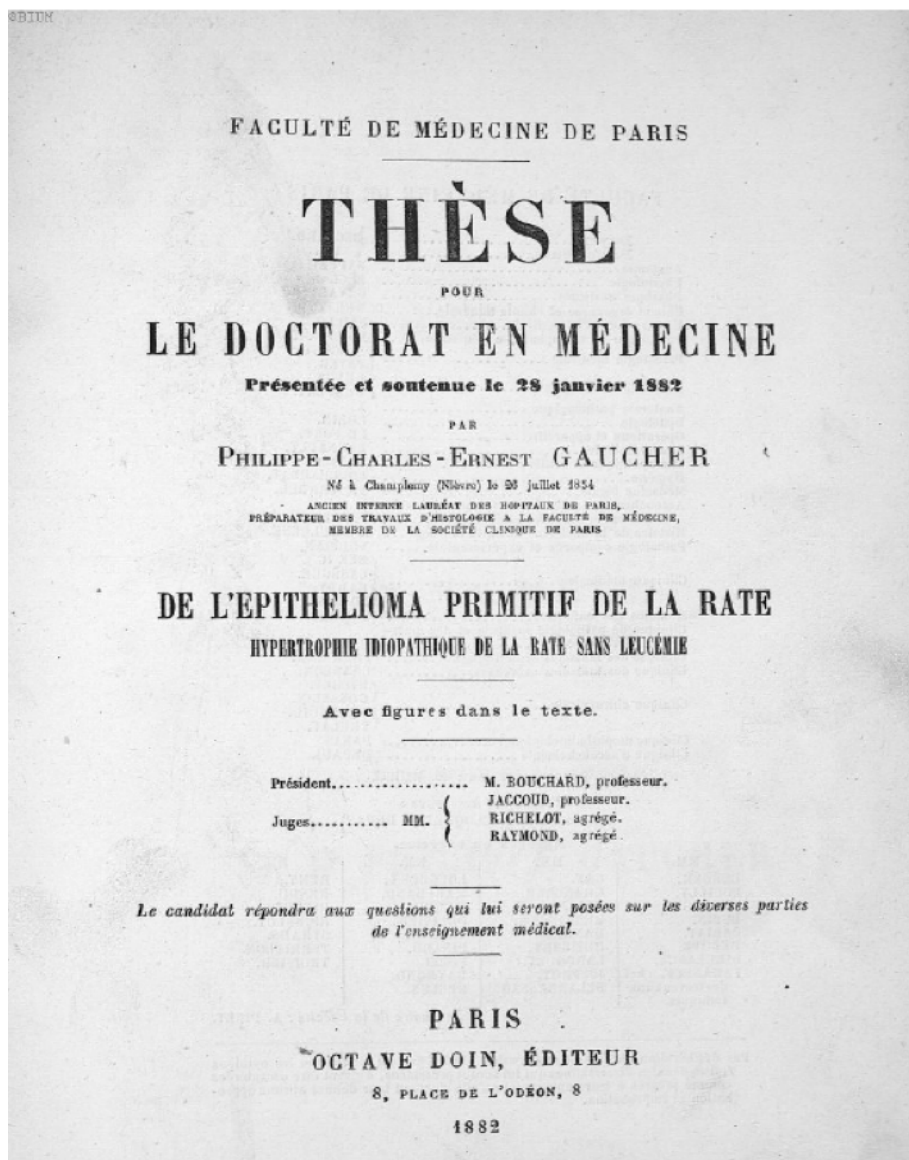


Figura 1. Capa da tese de doutoramento de Philippe Gaucher, onde descreve-se o primeiro caso da doença. **Fonte:** Gaucher, 1882.

Tão importante quanto a descrição da enzima foi a determinação da sua colocalização lisossômica, após estudos de centrifugação diferencial (Weinreb *et al.*, 1968) – técnica pela qual, anos antes, Christian de Duve pôde descobrir a existência dessas organelas (Appelmans *et al.*,

1955; De Duve *et al.*, 1955) e lançar o fundamento para que, dez anos mais tarde, Hers (1965) cunhasse o termo “doenças inatas dos lisossomos”.

Tendo em mãos a reunião desses elementos conceituais e as emergentes técnicas modernas de biologia molecular, logo se vislumbrou a hipotetizada enzima exógena, isolada de extratos placentários humanos (Pentchev *et al.*, 1973) e testada, exitosamente, em dois pacientes com DG (Brady *et al.*, 1974). Sucedeu-se a isso o desenvolvimento de um método industrial de produção de glicosilceramidase em larga escala (Furbish *et al.*, 1977), aprimorado posteriormente por meio da manipulação do segmento glicídico (Furbish *et al.*, 1981) com o intuito de direcionar – farmacodinamicamente – a captação da enzima exógena para os macrófagos, uma vez que a enzimopenia repercute mormente nesse tipo celular, em cuja membrana se mostrara existir lectinas ligantes de manose (Stahl *et al.*, 1978).

Ainda que a proteína estivesse bem caracterizada, pouco se tinha sobre o gene da glicosilceramidase. O primeiro evento concreto nesse sentido foi realizado por Ginns *et al.* (1984). Eles isolaram-no, parcialmente, valendo-se de bibliotecas de cDNA, o que viabilizou a confecção de mapas de restrição, essenciais para a descrição de mutações no nível cistrônico (Sorge *et al.* 1985a; Tsuji *et al.*, 1987; 1988) e para a dedução da sequência nucleotídica completa, alcançada com a clonagem do gene da glicosilceramidase (Sorge *et al.*, 1985b). Nesse ínterim, empreendeu-se o mapeamento do gene (Barneveld *et al.* 1983; Ginns *et al.*, 1985), o reconhecimento da sua estrutura exônica – além de um pseudogene nas adjacências – (Horowitz *et al.*, 1989) e a produção de glicosilceramidase por intermédio da tecnologia de DNA recombinante (Choudary *et al.*, 1986; Sorge *et al.* 1987).

Por essa época, as bases teóricas da DG e das Doenças Lisossômicas já estavam bem consolidadas, assim como a noção de Terapia de Reposição Enzimática (TRE) direcionada a macrófagos. Toda a teoria pôde ser testada, então, no primeiro estudo clínico robusto em DG (Barton *et al.*, 1991), o qual apresentou resultados indeléveis de efetividade da TRE com alglucerase (enzima com resíduos terminais de manose produzida em larga escala em tecidos de placenta humana). Houve aprovação dessa droga pelo *Food and Drug Administration* (FDA), instituição que também aprovou a congênere imiglucerase (produzida por tecnologia de DNA recombinante) após outro ensaio clínico, que demonstrou equivalência entre os dois fármacos (Grabowski *et al.*, 1995). Embora apresente limitações que motivam o desenvolvimento de outras estratégias farmacológicas: Terapia Inibidora de Síntese (Platt & Cox, 2007) e Terapia de Reforço

Enzimático (ou Terapia de Chaperonas Farmacológicas) (Desnick & Fan, 2007) – a TRE hoje continua sendo a primeira opção de tratamento, muito em função da sua eficácia clínica, que continua se evidenciando após anos de seguimento (Weinreb *et al.*, 2013).

Portanto, atualmente, enquadra-se a DG como uma doença autossômica recessiva rara da classe das esfingolipidoses (WHO, 2010). Nela, entende-se que alterações estruturais, predominantemente encontradas no gene *GBAI* (acrônimo de “*glucosidase, beta, acid*”; GeneID:2629), conduzem à hipoatividade da hidrolase lisossômica glicosilceramidase (EC 3.2.1.45.; também nomeada como β -glicosidase ácida ou glicocerebrosidase). Secundariamente a isso, alguns tipos celulares tornam-se ingurgitados com glicoesfingolipídios, o que altera a sinalização intra e intercelular, ocasionando, no nível clínico, manifestações multissistêmicas (Beutler & Grabowsk, 2001; Grabowski *et al.*, 2010a; Nyhan *et al.*, 2012; Pastores & Hughes, 2017; Schulze *et al.*, 2009).

1.2. Doença de Gaucher – Caracterização Molecular e Bioquímica

Alterações estruturais na sequência nucleotídica do gene *GBAI* são, sem dúvida, os principais determinantes da hipoatividade de glicosilceramidase observada na DG (Grabowski *et al.*, 2010a; 2010b; Grabowski, 2012; Hruska *et al.*, 2007; Sorge *et al.*, 1985b). Estruturalmente íntegro, o gene *GBAI* apresenta 11 éxons e 10 íntrons, localizados ao longo de uma região genômica de 7,6 kb no segmento cromossômico 1q21-22 (Figura 2). No mesmo *locus*, imediatamente 16 kb *downstream* (Sorge *et al.*, 1990), há um pseudogene, representando 5,7 kb do genoma e tendo 96% de identidade ao *GBAI*, que contribuiu – principalmente por eventos de recombinação – para a existência da grande diversidade de polimorfismos e mutações descritos atualmente (Barneveld *et al.* 1983; Ginns *et al.* 1984; 1985; Horowitz *et al.*, 1989; Hruska *et al.*, 2007).

Havia, catalogadas no *The Human Gene Mutation Database* (HGMD; Stenson *et al.* 2009), aproximadamente 335 mutações patogênicas no gene *GBAI*, em abril de 2017. Dessas, incluíam-se mutações de ponto *missense* e *nonsense*, mutações de sítio de *splicing*, inserções e deleções, além de alelos complexos resultantes de eventos de recombinação ou conversão com o referido pseudogene.

Em relação às mutações, a grande maioria delas restringe-se a pouquíssimos indivíduos (Hruska *et al.*, 2008). Contudo, há cinco mutações que são extremamente comuns: p.N370S,

p.L444P, p.R463C, 84insG, Ivs2+1g>a e p.V394L. Em média, esses cinco alelos são identificados em até 60% dos indivíduos com DG, podendo chegar, em alguns grupos populacionais (i.e., com ancestralidade Ashkenazi), em até 90% dos casos (Grabowski *et al.*, 2010a; Pastores & Hughes, 2017).

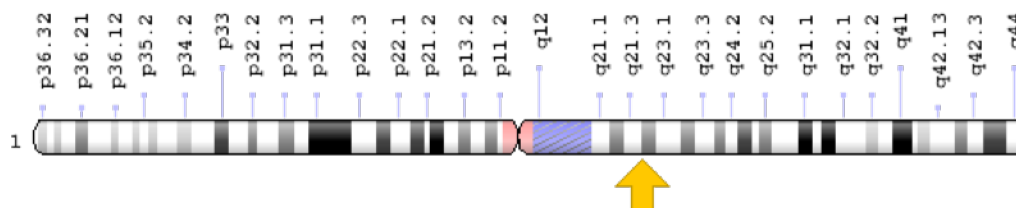


Figura 2. Localização cromossômica do gene *GBA1*.

Fonte: Reproduzido a partir do *US National Library of Medicine*, 2017.

As duas primeiras mutações descritas foram a c.1448T>C (p.L444P) e a c.1226A>G (p.N370S) (Tsuji *et al.*, 1987; 1988). Além de terem sido os primeiros, esses dois alelos são, de longe, os mais frequentes e amplamente distribuídos em diferentes grupos étnicos, embora o p.N370S dificilmente seja encontrado em populações orientais. Isso, de certa forma, contrasta com outros alelos, populacionalmente mais restritos – possivelmente em função da baixa frequência com que ocorrem (Hruska *et al.*, 2007; 2008). No Brasil, Sobreira *et al.*, (2007) registraram, em 139 indivíduos com DG, as seguintes frequências: 88,4% tinham pelo menos um alelo p.N370S (7,2% homocigotos); 54,6% pelo menos um alelo p.L444P (0,7% homocigotos); e 46,8% eram heterocigotos compostos para o genótipo p.N370S/p.L444P.

Embora haja preponderância dos alelos p.N370S e p.L444P, o elevado número de alterações descritas assinala a intensa heterogeneidade alélica dessa condição. Isto associado a outros fatores tem dificultado a associação genótipo-fenótipo e limitado o uso da caracterização molecular como instrumento prognóstico. No entanto, algumas generalizações podem ser feitas: a mutação p.N370S tem, em geral, um efeito leve sobre o fenótipo, geralmente “protegendo” os indivíduos da forma neuronopática (Grabowski *et al.*, 2010a; Monfort *et al.*, 2004; Pastores & Hughes, 2017). Em homocigose, via de regra, mostra um amplo espectro clínico, que varia desde ausência total de manifestações (a maioria dos casos) até presença de doença agressiva multissistêmica (Grabowski, 2012; Horowitz *et al.*, 1994). Por outro lado, o alelo p.L444P parece

ter efeito grave, expressando uma enzima instável de baixa atividade catalítica, sendo quase patognômica das formas neuronopáticas de DG, quando presente em homozigose (Grabowski *et al.*, 2010a; Grabowski, 2012; Monfort *et al.*, 2004; Pastores & Hughes, 2017), assim como o alelo p.D409H, em homozigose, é quase patognômico de um “subtipo cardiovascular” (Bohlega *et al.*, 2000).

Todavia, tem se registrado situações que maculam a clareza dessas associações, como, por exemplo, a observação de que diferentes indivíduos homozigotos apresentam quadros clínicos diversos e a de que as cinco mutações mais comuns são descritas em indivíduos com e sem doença neuronopática (Hruska *et al.*, 2008). Esses fenômenos sugerem que pacientes com o mesmo genótipo podem exibir considerável heterogeneidade clínica (Sidransky *et al.*, 1994), dificultando ainda mais predições fenotípicas a partir do genótipo. Tornam-se compreensíveis essas dificuldades, no momento em que se entende o contexto biológico em que se encontra o produto do gene *GBA*. Embora a considerando como uma doença monogênica, a DG tem muito fatores modificadores do fenótipo: alelos complexos, substratos alternativos, genes contíguos (inclusive o pseudogene) e uma miríade de outros modificadores genéticos e ambientais – conhecidos ou não (Hruska *et al.*, 2007; Sidransky, 2004).

O contexto biológico do *GBA* envolve desde o núcleo celular onde ocorre a transcrição até os lisossomos, onde a hidrolase exerce sua função catabólica.

O transcrito emergente do núcleo aproxima-se dos 2 kb de comprimento, contudo, após modificações pós-transcricionais, pode apresentar tamanhos e propriedades distintos, dependendo do tipo celular (Bergmann & Grabowski, 1989; Hruska *et al.*, 2007). O transcrito maduro, com dois sítios ATG de iniciação *in-frame* (encontrados nos éxons 1 e 2) chega a polissomos no Retículo Endoplasmático Rugoso (RER) onde são submetidos à tradução e à glicosilação cotraducional em quatro de cinco sequências consenso distintas de glicosilação (Grabowski, 2012; Grabowski *et al.*, 2010a; Neufeld, 1991; Pastores & Hughes, 2017). Devido aos dois sítios ATG, os peptídeo-sinais proporcionados tem tamanhos diferentes, todavia a enzima madura apresenta, invariavelmente, 497 aminoácidos e massa molecular de 60-80 kDa, dependente do conteúdo glicídico (Grabowski *et al.*, 2007; Hruska *et al.*, 2007; 2008).

Após a tradução de uma proteína de três domínios não contíguos (Domínio I: duas folhas- β antiparalelas flanqueadas por uma alça e uma folha- β N-terminal; Domínio II: duas folhas- β , similares à arquitetura imunoglobulínica; Domínio III: uma formação TIM barrel (β/α)₈ contendo

os resíduos catalíticos), mantidos tridimensionalmente por três pontes dissulfeto (Dvir *et al.*, 2003; Premkumar *et al.*, 2007) (Figura 3), a célula deve dispor de mecanismos que direcionem a hidrolase para os lisossomos (Neufeld, 1991).

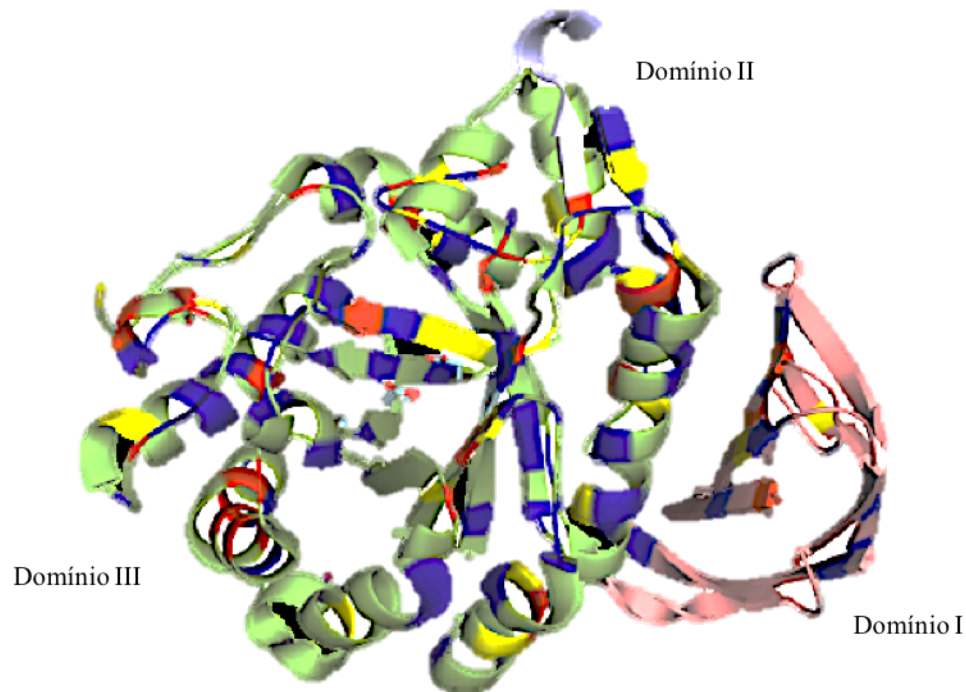


Figura 3. Estrutura tridimensional da enzima β -glicosidase ácida (ou glicosilceramidase). Sítios catalíticos estão coloridos de azul. Regiões em vermelho e amarelo representam zonas onde mutações podem potencialmente causar fenótipo severo e moderado, respectivamente. **Fonte:** Adaptado de **Futerman & Platt, 2017.**

No aparato de Golgi, o peptídeo sinal da glicosilceramidase interage com a *lysosomal integral membrane protein 2* (LIMP-2) (Eskelinen, 2006; Whitfield *et al.*, 2002). O decréscimo do pH na Rede Trans-Golgi favorece a dissociação do complexo e transloca a glicosilceramidase para o lisossomo nascente, onde ela se torna “membrana-associada” (Reczek *et al.*, 2007). Esse mecanismo de direcionamento é diferente do da maioria das hidrolases lisossômicas solúveis, que são endereçadas aos lisossomos de maneira dependente do receptor de manose 6-fosfato (M6PR). Portanto, o direcionamento da glicosilceramidase aos lisossomos utiliza a via independente do M6PR (Coutinho *et al.*, 2012a; b).

Ainda que existam condições raras, nas quais o acúmulo de glicosilceramida não está associado à atividade deficitária de glicosilceramidase: deficiência de Saposina-C (Christomanou

et al., 1986; Ho & O'Brien, 1971; Schnabel *et al.*, 1991) – e ainda que existam isoenzimas citoplasmáticas com atividade de β -glicosidase (van Weely *et al.*, 1993), é a glicosilceramidase, no ambiente ácido endolisossômico, a principal responsável pelo processamento de glicosilceramídeos (especificamente, glicosilceramida) – macromoléculas ubiquamente expressas em membranas celulares que, por sua natureza hidrofóbica, não conseguem abandonar o compartimento lisossômico sem a clivagem da ligação β -glicosídica entre o resíduo de glicose e o de ceramida (Figura 4) (Kolter, 2011; Kolter *et al.* 2002; Merrill 2002 ; Schulze *et al.*, 2009; van Meer & Lisman 2002).

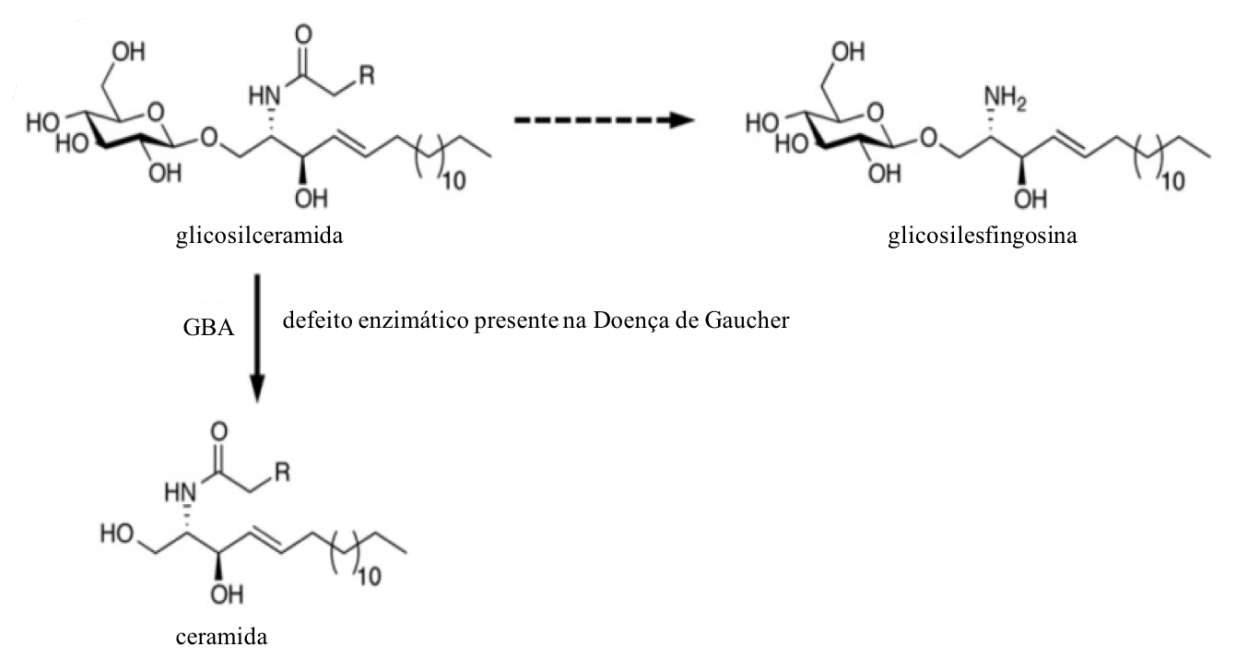


Figura 4. Rota metabólica afetada na Doença de Gaucher. GBA (glicosilceramidase) é a enzima responsável pela hidrólise do resíduo de glicose da molécula de glicosilceramida, formando ceramida. Na Doença de Gaucher, o acúmulo de glicosilceramida ainda favorece a via metabólica de síntese de glicosil esfingosina, um biomarcador da doença (ver seção sobre biomarcadores). **Fonte:** Adaptado de Ferraz *et al.*, 2014.

1.3. Doença de Gaucher – Caracterização Fisiopatológica

Muito se sabe sobre a estrutura e a variação do gene *GBA*, assim como se sabe muito sobre a estrutura, função e localização da glicosilceramidase (Grabowski, 2012). No entanto, a fisiopatologia da DG tem permanecido largamente não compreendida, assim como a de diversas doenças lisossômicas (Futerman, 2007; Futerman & van Meer, 2004).

Mesmo assim, sabe-se que os macrófagos – e, adicionalmente, os neurônios nas formas neuronopáticas (Futerman, 2007) – são os tipos celulares mais afetados (Grabowski *et al.*, 2010a;

Schulze *et al.*, 2009). Como o defeito é herdado de maneira autossômica recessiva, obviamente todas as células podem potencialmente expressar o fenótipo, porém são os macrófagos as células mais sensíveis ao defeito enzimático, devido à grande quantidade de glicosfingolipídios que precisam catabolizar em função do intenso processo de fagocitose que executam, especialmente na remoção de eritrócitos senescentes (Beutler & Grabowski, 2001; Beutler, 2010; Grabowski *et al.*, 2010a; Nyhan *et al.*, 2012; Pastores & Hughes, 2017; Schulze *et al.*, 2009). Esses macrófagos disfuncionantes ficam ingurgitados com glicosfingolipídios (Demarsh & Kautz, 1957; Lee 1968) e ferro (Lee *et al.*, 1967; Lorber, 1960; Lorber, 1970; Lorber & Nemes, 1967; Weisberger *et al.*, 2004), tornando-se conhecidas como CG (Figura 5 e 6).

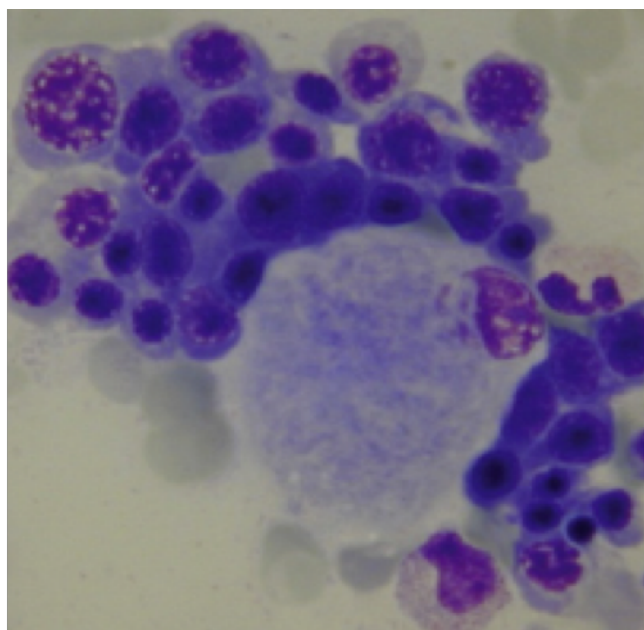


Figura 5. Aspirado de medula óssea, corado com hematoxilina e eosina, evidenciando Células de Gaucher (macrófagos ingurgitados com glicosfingolipídios) **Fonte:** Extraído de Ferraz *et al.*, 2014.

As CG apresentam um perfil de expressão peculiar, que se assemelha ao perfil dos macrófagos alternativamente ativados. Por exemplo, por técnicas de imunohistoquímica, evidencia-se que as CG expressam fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), CD68, CD14, CCL18, HLA classe II e o antagonista do receptor de IL1, mas não CD11b, CD40, TNF- α ou marcadores de células dendríticas (Boven *et al.*, 2004). Sericamente, além disso, uma infinidade de citocinas inflamatórias tem sido detectadas nos pacientes com DG (Barak *et al.*, 1999).

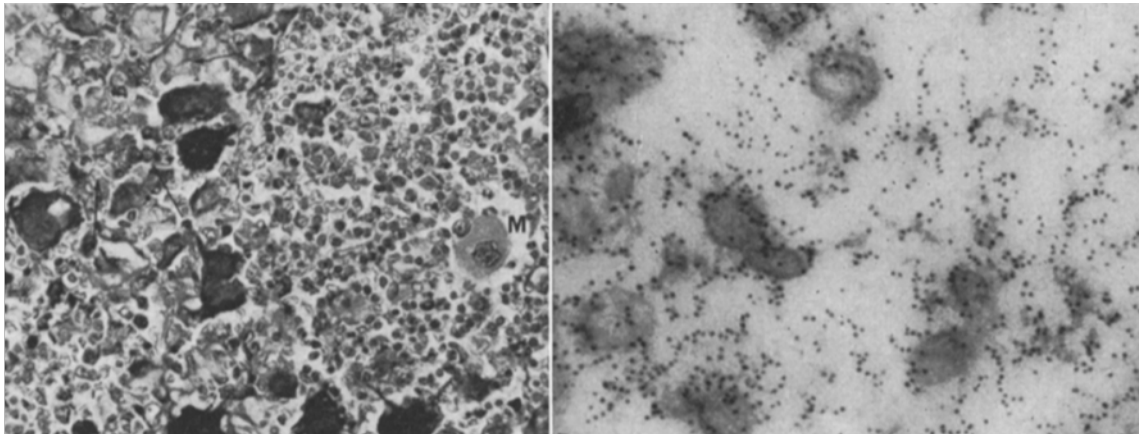


Figura 6. Aspirado de medula óssea, com coloração para ferro. Fotomicrografia óptica (esq.) (x270) evidenciando células grandes intensamente escuras, que correspondem a Células de Gaucher ingurgitadas com ferro. M: megacariócito isolado. Microscopia eletrônica (dir.) (x80.000) mostrando o citoplasma de uma Célula de Gaucher repleta de grânulos elétrôn-densos de ferro. **Fonte:** Extraído de **Lee et al., 1967.**

Acredita-se que seja o somatório dessa multitude de alterações no perfil de expressão de mediadores do sistema imunológico/inflamatório que decorra a expressão clínica multissistêmica da doença (Thomas *et al.*, 2013). Tais mediadores humorais e de superfície, embora tornem a interpretação e a elucidação dos mecanismos patofisiológicos complexa, vêm fornecendo pistas valiosas para o quebra-cabeça patofisiológico (Aerts *et al.*, 2005; Boven *et al.*, 2004). Nesse contexto, a pesquisa com biomarcadores séricos em diferentes coortes de pacientes com DG tem sido de grande utilidade na elucidação da fisiopatogenia e, conseqüentemente, na proposição de novas alternativas terapêuticas (Stirnemann *et al.*, 2017).

1.4. Doença de Gaucher – Caracterização Clínica

A DG representa um espectro de manifestações clínicas que variam desde uma forma perinatal letal até uma forma adulta assintomática (Grabowski *et al.*, 2010a; Nyhan *et al.*, 2012; Pastores & Hughes, 2017).

Em geral, estudos epidemiológicos sobre a DG e as doenças lisossômicas são escassos em função das dificuldades metodológicas impostas pela heterogeneidade clínica, que ocasiona confusão diagnóstica, subestima a prevalência e enviesam os dados epidemiológicos (Fuller *et al.*, 2006). Inexistem dados sobre a prevalência da DG no Brasil. Contudo, há três estudos clássicos

que têm sido utilizados para estimar e extrapolar mundialmente a prevalência de DG como 1/40 mil–200 mil pessoas (Meikle *et al.*, 1999; Pinto *et al.*, 2004; Poorthuis *et al.*, 1999). Em indivíduos com ancestralidade Ashkenazi, a prevalência mostra-se incrivelmente aumentada, provavelmente em consequência de deriva genética ou de vantagem dos heterozigotos (Slatkin *et al.*, 2004), estimando-se um valor de 1/400 indivíduos (Beutler *et al.*, 2001; Beutler *et al.*, 1993; Zimran *et al.*, 1991).

Essas dificuldades na obtenção de dados epidemiológicos têm sido superadas, em certa medida, com o delineamento e a implementação de registros de pacientes com doenças raras (Cole *et al.*, 2011) que, para a DG, iniciou-se em 1991: *International Collaborative Gaucher Group Gaucher Registry* (ICGGGR) (Charrow *et al.*, 2000), facilitando muito o reconhecimento do espectro clínico da doença (Kaplan *et al.*, 2006; Weinreb *et al.*, 2013).

Classicamente, a nosologia da DG reconhece três tipos clínicos principais que, embora sejam categorias artificiais, continuam apresentando utilidade prognóstica (Grabowski *et al.*, 2010a; Nyhan *et al.*, 2012; Pastores & Hughes, 2017), sendo a distinção primordial o envolvimento (DG tipo 2 e 3) do não envolvimento neurológico (DG tipo 1) (Pastores & Hughes, 2017; Rosenbloom & Weinreb, 2013) (Tabela 1).

A DG Tipo 1 (DG1) (forma não neuronopática; MIM3230800) representa mais de 90% de todos os casos de DG (Nyhan *et al.*, 2012; Rosenbloom & Weinreb, 2013) e constitui-se no tipo com melhor prognóstico (Grabowski *et al.*, 2010a; Pastores & Hughes, 2017). Mesmo assim, há elevada morbidade aos indivíduos, imposta especialmente pelo envolvimento ósseo, e há reduzida expectativa de vida, como atestou o estudo Weinreb *et al.* (2008), calculando nove anos a menos de sobrevida média nos pacientes com DG1 em relação a uma população de referência. Ainda, a DG1 pode afetar crianças e adultos, sendo a idade de início da sintomatologia muito variável. A progressão do quadro é, em geral, lenta ou variável e a apresentação clínica típica emerge com hepatomegalia, esplenomegalia, conduzindo ao hiperesplenismo, com progressiva anemia, trombocitopenia e leucopenia. O quadro ainda se associa a fadiga, cansaço e plenitude pós-prandial (Grabowski, 2012). Dados do ICGGGR informam as seguintes manifestações como as mais frequentemente encontradas nesses pacientes: esplenomegalia 85%, hepatomegalia 63%, anemia 34%, trombocitopenia (com ou sem manifestações hemorrágicas) 68%, osteopenia 55%, fraturas 7%, crises ósseas 7%, osteoalgia 33% e retardo no crescimento 36% (Charrow *et al.*, 2000).

Em relação à doença óssea na DG1, convém pô-la em destaque, em virtude do seu impacto

na qualidade de vida dos pacientes. Postula-se que, virtualmente, 100% dos doentes terão doença óssea, aduzida tanto por evidências do exame clínico quanto por dos exames de imagem (Wenstrup *et al.*, 2002). A doença óssea, assim encarada, traduz-se por: infiltração medular, deformidade em frasco de *Erlenmeyer* (alargamento do fêmur distal), osteopenia, osteoporose, infarto ósseo, necrose avascular, lesões líticas ou escleróticas e fraturas patológicas. Todas essas, dentre outras, podem conduzir a quadros álgicos importantes (“crises ósseas”) que, muitas vezes, requerem intervenção com opiáceos (Kaplan *et al.*, 2006; Nyhan *et al.*, 2012; Pastores & Hughes, 2017).

Além desses, pode haver distúrbios da coagulação (Deghady *et al.*, 2006), doença pulmonar e transtornos mentais (Pastores & Hughes, 2017). Da mesma forma, a DG1 constitui-se como fator de risco importante para desenvolvimento de certas neoplasias e/ou certas alterações imunológicas (Rosenbloom & Weinreb, 2013), como mieloma múltiplo (Rosenbloom *et al.*, 2005); carcinoma hepatocelular (de Fost *et al.*, 2006); linfomas (Landgren *et al.*, 2007) e gamopatia monoclonal (Wine *et al.*, 2007).

A DG tipo 2 (DG2) (forma neuropática aguda; MIM3230900) contribui com 1% dos casos e geralmente afeta lactentes entre os 4-5 meses de idade. Pode apresentar toda a semiologia da DG1, com o acréscimo da sua principal característica: o envolvimento do Sistema Nervoso Central (SNC) (Nyhan *et al.*, 2012). O quadro neurológico apresentado, via de regra, é grave, rapidamente progressivo, com múltiplas convulsões, hipertonia, apneia e progressivo retardo mental, que culmina na morte antes dos dois anos de vida (Nyhan *et al.*, 2012; Pastores & Hughes, 2017). Há um subtipo da DG2 chamado de forma perinatal letal que, além de apresentar as manifestações da DG1, apresenta alterações cutâneas (desproporção entre glicosilceramida/ceramida no estrato córneo da epiderme), face dismórfica e hidropisia fetal não imune (Mignot *et al.*, 2003).

A DG tipo 3 (DG3) (forma neuropática crônica; MIM231000) afeta crianças e adolescentes, sendo a idade de início variável (geralmente pré-escolar). Compromete SNC, baço, fígado e ossos. A evolução do quadro neurológico é também variável, porém menos grave que a DG2. A sobrevivência se dá até a segunda ou terceira década de vida (Nyhan *et al.*, 2012). Aqui também há um subtipo, chamado de cardiovascular, o qual se associa com calcificação das valvas mitral e aórtica, oftalmoplegia supranuclear e opacificação das córneas (Pastores & Hughes, 2017).

Clinicamente, os pacientes com DG são tratados com medidas de suporte (bisfosfonados, cálcio, vitamina D, analgésicos, infusão de hemoderivados, esplenectomia etc.) e/ou com medidas preventivas: TRE (e/ou alternativas à TRE – redução de substrato e chaperonas) (Pastores &

Hughes, 2017). A TRE apresenta eficácia clínica (Weinreb *et al.*, 2013), aferida por diferentes instrumentos, como, por exemplo, escores de severidade (Weinreb *et al.*, 2010; Zimran *et al.*, 1989) e escores de qualidade de vida (Weinreb *et al.*, 2007). Tem se tentado, no entanto, utilizar métodos mais sensíveis para se aferir a eficácia da TRE. Sendo assim, os chamados biomarcadores, como já comentado na seção anterior, têm ganhado destaque na pesquisa clínica, representando desfechos substitutos, que são alternativas aos desfechos primordiais, mais trabalhosos de se medir.

Tabela 1. Características clínicas presentes na Doença de Gaucher.

	DG - tipo 1	DG - tipo 2	DG - tipo 3
idade de apresentação	qualquer	neonatal a lactância	primeira infância a adolescência
características sistêmicas	pode ser assintomático em casos leves; hepatoesplenomegalia; sangramentos; citopenias; gamopatia; dor óssea; necrose avascular; osteopenia; risco aumentado de mieloma	ictiose congênita; hidropisia fetal não-imune; mínimo envolvimento sistêmico	hepatoesplenomegalia; citopenias; doença óssea; retardo do crescimento; calcificação das valvas cardíacas; cifoses e outras anormalidades da caixa torácica
envolvimento do sistema nervoso	incidência aumentada de Parkinson	declínio neurológico agudo; espasticidade e estrabismo	paralisia horizontal do olhar; declínio cognitivo; epilepsia mioclônica
expectativa de vida	próxima ao normal ou normal	<2 anos de idade	até infância tardia ou adulto jovem
opções terapêuticas	Terapia de Reposição Enzimática; Terapia de Redução de Substrato; intervenções ortopédicas; bisfosfonados para osteopenia	ausente; suporte e conforto	Terapia de Reposição Enzimática para os sintomas sistêmicos (acometimento neurológico não tratável); transplante de medula óssea em casos selecionados

Fonte: Tabela traduzida e montada a partir de Thomaz *et al.*, 2014 e Pastores & Hughes, 2017.

1.5. Doença de Gaucher e Biomarcadores

Biomarcadores têm sido muito utilizados em pesquisa biomédica e no manejo clínico de condições diversas (tanto para fins diagnósticos como para fins monitoramento da evolução de

doença ou da resposta a tratamentos). Eventualmente, biomarcadores podem ter, inclusive, relevância prognóstica (ver seção sobre β_2 -microglobulina). De maneira ideal, um biomarcador deve ser um analito acessível (preferencialmente sérico), de fácil aferição, sensível, específico e que reflita mínimas mudanças no padrão da doença, de modo que permita ajustes finos, por exemplo, na terapêutica implementada (Strimbu & Tavel, 2010).

No caso de doenças genéticas, a busca por biomarcadores torna-se ainda mais imperativa devido à necessidade de otimização das terapias já estabelecidas (em função do alto custo que elas representam) e à necessidade de estabelecimento de terapias mais efetivas. Nesse sentido, é notório o papel que os biomarcadores têm no processo de desenvolvimento/licenciamento de novas drogas por parte da indústria farmacêutica, pois são condições com pequeno número de pacientes para a realização de ensaios clínicos, tornando extremamente difícil a detecção de diferenças entre tratamentos com tamanho de efeito relevante (Cox, 2006).

O processo de validação de um analito candidato como biomarcador envolve uma rigorosa validação operacional, por meio da correlação estatística inequívoca com desfechos duros/primordiais, desfechos substitutos já estabelecidos para a condição em estudo e com intervenções terapêuticas implementadas, entre outros (ver Cox, 2006 para uma revisão detalhada sobre biomarcadores). Ao mesmo tempo, como já foi dito, ao se estabelecer a utilidade clínica de um dado biomarcador, também se fornece valiosas pistas para a elucidação da fisiopatologia molecular da doença em questão (Froissart, 2006).

Na DG, a pesquisa por biomarcadores é intensa. Os biomarcadores mais bem consolidados até o momento são: glicosilesfingosina (Murugesan *et al.*, 2016), Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) (Lieberman & Beutler, 1976), quitotriosidase (ou quitinase-1 humana) (Hollak *et al.*, 1994), ferritina sérica (Morgan *et al.*, 1983), *Tartrate-Resistant Alkaline Phosphatase* (TRAP) (Tuchman *et al.*, 1956) e CCL18 (Boot *et al.*, 2004). Além desses, existem diversos outros potenciais biomarcadores em processo de validação como hepcidina (Medrano-Engay *et al.*, 2014; Lorenz *et al.*, 2016) e β_2 -microglobulina (Deibener *et al.*, 1998).

1.5.1. Doença de Gaucher e Biomarcadores – β_2 -microglobulina

O indício de que a β_2 -microglobulina (beta2) poderia ser um biomarcador na DG surgiu do relato de caso de Debeiner *et al.* (1997). Tratava-se de um paciente com DG apresentando redução dos níveis séricos de imunoglobulinas e beta2 após 24 meses de tratamento com

alglucerase[®]. Após esse relato de caso, nenhum grupo se debruçou a investigar os níveis de beta2 em coortes de paciente com DG.

A beta2 é um componente das moléculas de HLA classe I – uma estrutura expressa na superfície de virtualmente todas as células nucleadas e na de algumas não nucleadas, como plaquetas (Güssow *et al.*, 1987; Germain & Margulies, 1993). Estruturalmente, as moléculas de HLA classe I são compostas por heterodímeros de cadeias α (subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$) e pelo polipeptídeo beta2. A subunidade $\alpha 3$ é o domínio transmembrana que ancora a estrutura na superfície celular. As cadeias α são expressas pelos genes do complexo MHC e são altamente polimórficas. Por outro lado, a beta2 é expressa por um gene diferente (gene *B2M*), que não se notabiliza por ser polimórfico (Güssow *et al.*, 1987). Uma vez expressa, a proteína beta2 migra para a membrana celular e interage não-covalentemente com as subunidades α , sendo indispensável para a estabilização da estrutura na superfície celular (Germain & Margulies, 1993).

A relevância clínica da beta2 decorre do fato de que existem diversas condições associadas com seus níveis séricos elevados, como linfocitose hemofagocítica (Jiang *et al.*, 2016), doença renal crônica dialítica (Wong *et al.*, 2016), hepatite C (Ouda *et al.*, 2015), neoplasias diversas como câncer de mama (Li *et al.*, 2014) e linfoma não-Hodgkin (Atesoglu *et al.*, 2015). No entanto, a beta2 tem especial relevância no estadiamento do mieloma múltiplo. O nível sérico de beta2 faz parte, portanto, do *International Staging System* e seus níveis elevados estão fortemente correlacionados com mortalidade (Greipp *et al.*, 2005). Curiosamente, o mieloma múltiplo é uma das neoplasias mais prevalentes em coortes de pacientes com DG, tendo um risco relativo estimado de 5,9 [IC95%: 2,8–10,8] a partir de levantamento de feito no Gaucher Registry (Rosenbloom *et al.*, 2005).

1.5.2. Doença de Gaucher e Biomarcadores – Ferritina Sérica

Diferentemente da beta2, a ferritina sérica vem sendo bastante explorada na pesquisa de biomarcadores na DG. Relatada primeiramente por Morgan *et al.* (1983), a hiperferritinemia, desde então, tem sido sistematicamente observada em diferentes coortes de pacientes com DG (Beutler *et al.*, 1995; Grosbois *et al.*, 2009; Mekinian *et al.*, 2012; Poll *et al.*, 2002; Saadi *et al.*, 2010; Stein *et al.*, 2010; Stirnemann *et al.*, 2010; Stirnemann *et al.*, 2011; Thomas *et al.*, 2013).

No estudo pioneiro de Morgan *et al.* (1983), analisou-se a concentração de ferritina sérica em sete pacientes com DG. Entre esses, seis apresentaram hiperferritinemia. Além disso, as

glicofornas de ferritina foram quantificadas (glicosilada: 38%-55%) e diversas variáveis clínicas foram aferidas, mas nenhuma inferência pôde ser feita; exceto pela conclusão a que os autores chegaram de que a hiperferritinemia não era resultado de sobrecarga de ferro.

Logo após, em outro trabalho, que teve o intuito de avaliar o curso clínico dos indivíduos com DG, fez-se o registro de elevada frequência de hiperferritinemia entre 45 pacientes, a qual tendeu a ser revertida pela TRE (Beutler *et al.*, 1995). Da mesma forma, Poll *et al.* (2002) fizeram observação similar de que havia um número elevado de indivíduos com DG hiperferritinêmicos e que esses, após 36 meses de tratamento, apresentavam resposta medular apropriada (com incremento dos parâmetros hematimétricos) e apresentavam uma significativa redução nos níveis séricos de ferritina, quitotriosidase, ECA e TRAP.

Com esses trabalhos, construiu-se o conceito de que a ferritina sérica teria utilidade como marcador tanto de resposta ao tratamento quanto de severidade da doença (Froissart, 2006). Isso motivou seu uso na prática clínica, juntamente com alguns outros estudos, tentando consolidar a ferritina sérica como biomarcador fidedigno e tentando entender o contexto patofisiológico no qual ocorre (Hughes *et al.*, 2007).

Dando seguimento ao interesse pela hiperferritinemia na DG, Grosbois *et al.* (2009) publicaram um relato de caso de um indivíduo severamente hiperferritinêmico, que não apresentava sobrecarga de ferro. Num relato posterior, Saadi *et al.* (2010) corroboraram as observações de hiperferritinemia e comentaram os potenciais prejuízos diagnósticos, uma vez que o quadro de hiperferritinemia, associado a outras alterações imunológicas, mimetiza doenças inflamatórias, o que retarda o diagnóstico e propicia o aparecimento de manifestações clínicas graves. Ainda em 2010, Stirnemann *et al.* analisando retrospectivamente sua coorte de pacientes com DG, pode sugerir que a concentração de ferritina sérica e a contagem de trombócitos são os únicos, dentre os biomarcadores, que podem ter valor prognóstico em relação à doença óssea, estando a hiperferritinemia pré-TRE associada a elevada frequência de “eventos ósseos”. Em estudo posterior, a ferritina sérica, a ECA, a quitotriosidase, a CCL18 e a TRAP apresentaram-se como os marcadores mais frequentemente alterados no momento do diagnóstico da DG (Thomas *et al.*, 2013).

Outro estudo de vital importância foi o conduzido por Stein *et al.* (2010). Nesse trabalho, os autores pontuaram a ferritina sérica como inferior à quitotriosidase e à CCL18, no que tange a severidade da doença. No entanto, como biomarcador do efeito da TRE, a ferritina sérica, como

os trabalhos anteriores já haviam assinalado, mostrou-se também útil (reduz sua concentração após 12-36 meses de TRE). Além disso, dos 114 pacientes, apenas três apresentaram evidência de sobrecarga de ferro, cuja posterior genotipagem das mutações p.C282Y e p.H63D do gene *HFE* (hemocromatose) revelou dois indivíduos heterozigotos e um homozigoto para essas mutações. Biópsias hepáticas confirmaram o diagnóstico de hemocromatose, especialmente pelo padrão de distribuição da siderose, a qual tendeu a ocorrer predominantemente nos hepatócitos e células de Kupffer. Flebotomia foi indicada nesses indivíduos, a qual logrou sucesso ao eficientemente diminuir os níveis de ferritina sérica.

Em outro, Mekinian *et al.* (2012) avaliaram 72 pacientes provenientes de um registro de Gaucher na França, sendo 87% deles hiperferritinêmicos. Com efeito, eles replicaram o achado de Stein *et al.* (2010) de ausência de correlação entre a ferritina sérica e os escores de severidade de doença. Adicionalmente, verificaram que a concentração de ferritina sérica diminuiu após o início da TRE (também corroborando achados anteriores) e que os outros parâmetros do metabolismo do ferro, aferidos rotineiramente: saturação de transferrina, concentração de ferro sérico e capacidade ferropéxica, não se modificaram. Também, a exemplo de Stein *et al.*, encontraram 13 indivíduos heterozigotos para mutações no *HFE*, mas nenhum deles apresentou evidência de sobrecarga de ferro.

Talvez o estudo mais revelador tenha sido o de Stirnemann *et al.* (2011), pois, curiosamente, após Morgan *et al.* (1983), nenhum trabalho incluiu a análise das glicofomas de ferritina. Com base na habilidade de se ligar na concavina A, é possível diferenciar dois tipos de ferritina: uma glicosilada e uma não glicosilada (Vignes *et al.*, 2000). Usando esse tipo de abordagem, Stirnemann *et al.* (2011) evidenciaram que, em indivíduos não tratados, a fração de ferritina glicosilada está diminuída, em função da elevada concentração de ferritina não glicosilada. Após a TRE, a concentração de ferritina não glicosilada caiu drasticamente, ocasionando o aumento proporcional da ferritina glicosilada. Os autores colocam que esse achado é consistente com o de outras doenças inflamatórias, que também cursam com diminuição da proporção de ferritina glicosilada. Sendo assim, os autores colocam que a porcentagem de ferritina glicosilada e/ou concentração de ferritina não glicosilada são as formas que devem ser utilizadas como biomarcador da resposta ao tratamento.

Esse achado é muito importante porque a glicosilação de proteínas reflete, dentre outras coisas, um mecanismo fisiológico de secreção, que aparentemente está prejudicado na DG, tendo

em vista a redução na fração glicosilada de ferritina circulante. O aumento da forma não glicosilada poderia refletir um defeito na glicosilação e/ou extravasamento de ferritina citoplasmática (não glicosilada) após lise celular.

Recentemente se demonstrou que a origem da ferritina sérica são macrófagos alternativamente ativados (Cohen *et al.*, 2010). Isso abre precedente para especulações sobre a etiologia da ferritina sérica na DG. Seria resultado de um processo inflamatório, influenciada por citocinas, abundantemente presentes na DG (Barak *et al.*, 1999)? Seria motivada por sobrecarga de ferro nos macrófagos, que há muito já se demonstrou apresentarem sobrecarga de ferro (Lee *et al.*, 1967; Lorber, 1960; Lorber, 1970; Lorber & Nemes, 1967; Weisberger *et al.*, 2004)? Seria decorrente de uma etiologia compartilhada? Porém, é de suma importância que o metabolismo do ferro seja analisado como um todo, especialmente em relação ao peptídeo hepcidina, que exerce papel central na homeostase do ferro.

1.5.3. Doença de Gaucher e Biomarcadores – Hecpidina

A hepcidina praticamente não foi estudada na DG. Apenas dois estudos recentes avaliaram os níveis séricos de hepcidina em coortes pequenas de pacientes com DG (Medrano-Engay *et al.*, 2014; Lorenz *et al.*, 2016) mostrando resultados conflitantes. A hepcidina será abordada com maiores detalhes na seção a seguir sobre o metabolismo do ferro.

2. Introdução – Metabolismo do Ferro

2.1. Metabolismo do Ferro – Estado Fisiológico

O ferro é um elemento versátil e altamente reativo. Ele existe naturalmente em duas valências – ferroso (+2) e férrico (+3) – e esta propriedade delinea seu papel biológico essencial no transporte de oxigênio e nas reações redox, particularmente na respiração celular (Griffiths *et al.*, 1999).

O ferro é essencial para uma variedade de funções biológicas, tanto em nível celular quanto em nível sistêmico, como transporte de oxigênio e atividade catalítica de muitas enzimas. No entanto, as propriedades químicas específicas do ferro como um metal de transição também o tornam tóxico para células e tecidos. Na presença de espécies reativas de oxigênio (EROs), o ferro catalisa a geração de radicais hidroxil altamente reativos (via reação de Fenton/Harber-Weiis) que

danificam lipídios de membrana, proteínas e ácidos nucleicos. Considerando que EROs são produtos inevitáveis da anaerobiose, os organismos devem controlar finamente as concentrações de ferro de modo a satisfazer as necessidades metabólicas e evitar os danos causados por sua toxicidade. Uma rede de regulação complexa evoluiu nos mamíferos para assegurar um tráfico seguro e balanceado de ferro (Heeney & Andrews, 2004).

A absorção de ferro é controlada por uma rede complexa de influência tanto sistêmica quanto local (Fuqua, 2012). Sob condições fisiológicas normais, o ferro entra no corpo humano, em quantidades significativas, de duas maneiras: através da placenta, durante a vida fetal, e através da parede do intestino delgado na vida pós-natal (Fuqua, 2012).

Uma dieta normal contém 13-18 mg de ferro, dos quais apenas 1-2 mg serão absorvidos na forma inorgânica ou na forma heme (Grotto, 2008). O ferro proveniente da dieta é encontrado em diversas formas, mas é tipicamente classificado como ferro heme e não-heme (Fuqua, 2012). O ferro heme é encontrado de forma abundante na carne, como parte das hemoproteínas hemoglobina e mioglobina (Fuqua, 2012). A maior parte do ferro inorgânico (não-heme) está presente na forma Fe^{+3} e é fornecida por vegetais e cereais (Grotto, 2008).

O ferro inorgânico proveniente da dieta é absorvido na borda em escova dos enterócitos duodenais através do transportador de metal divalente-1 (DMT-1/ SLC11A2, *solute carrier family 11, member 2*) (Hentze *et al.*, 2010). SLC11A2 (DMT-1) é o único transportador transmembrana de ferro não-heme (Gunshin *et al.*, 2005) e é expresso ubiquamente (Shawki *et al.*, 2012). A DMT-1 é também conhecida como Nramp2 (*natural-resistance-associated macrophage protein 2*), é composta por 12 segmentos transmembrana e, além do ferro, transporta outros íons metálicos como Mn^{+2} , Co^{+2} , Cu^{+2} e Zn^{+2} (Grotto, 2008; Montalbeti *et al.*, 2013). Para exercer sua função, a DMT-1 necessita que o Fe^{+3} seja reduzido a Fe^{+2} , processo que é mediado pela citocromo redutase b duodenal (Dcytb/Cybrd1) (Hentze *et al.*, 2010; Grotto, 2008) ou outra redutase similar na superfície apical (Garrik *et al.*, 2003).

O gene da Nramp2 (*SLC11A2*) (MIM600523), compreende 17 éxons em aproximadamente 36kb (Lee *et al.*, 1998). Já foram descritas pelo menos quatro isoformas de DMT-1, as quais provêm de variações na transcrição do gene *SCL11A2* (Shawki *et al.*, 2012). Um elemento responsivo ao ferro (IRE) na região 3'UTR do mRNA permite a regulação de algumas isoformas através da resposta ao *status* de ferro, e mecanismos adicionais pelos quais DMT-1 é regulada têm emergido (Shawki *et al.*, 2012).

O ferro heme é absorvido de maneira independente, por mecanismos ainda incertos, porque o transportador proposto SLC46A1 (HCP1) parece transportar principalmente folato (Hentze *et al.*, 2010). O ferro heme é liberado intracelularmente pela hemoxygenase 1 (HOX1) (Hentze *et al.*, 2010). A internalização do ferro heme da dieta é feita pela proteína transportadora do heme-1 (HCP1) (*heme carrier protein 1*), recentemente descrita (Shayehi *et al.* 2005) e posicionada na membrana apical das células do duodeno (Grotto, 2008). O heme liga-se à membrana da borda em escova dos enterócitos duodenais e a proteína transportadora, de 50-kDa com nove domínios transmembrana, atravessa intacta a membrana plasmática, importando o heme extracelular (Grotto, 2008). A seguir, o heme apresenta-se ligado à membrana de vesículas no citoplasma da célula. A HCP1 também é expressa em outros locais como o fígado e rins e sua regulação é feita de acordo com o nível de ferro intracelular: havendo deficiência de ferro, a HCP1 se redistribui do citoplasma para a membrana plasmática das células duodenais, enquanto em condições de excesso de ferro a redistribuição se dá a partir da borda em escova da célula para o seu citoplasma. Esse mecanismo regulador pós-tradução da proteína é interessante porque, de um lado, aproveita o heme da dieta antes que ele seja eliminado pelo peristaltismo do intestino e, no outro extremo, evita a captação desnecessária de ferro e o seu provável acúmulo. A hipóxia também induz a síntese da HCP1, facilitando a captação de heme quando há maior necessidade do organismo (Grotto, 2008).

No interior da célula, o ferro é liberado da protoporfirina pela heme-oxigenase. Após o ferro ser liberado, fará parte do mesmo *pool* de ferro não-heme, sendo armazenado na forma de ferritina ou liberado do enterócito para a circulação (Grotto, 2008).

A ferritina é a principal proteína intracelular de armazenamento de ferro em todos os organismos (Shi *et al.*, 2008). Desempenha um papel chave no metabolismo do ferro com sua habilidade de sequestrá-lo e armazená-lo lhe conferindo uma função dupla na detoxificação e na reserva de ferro (Orino *et al.*, 2008). O armazenamento de ferro na ferritina é um processo reversível, e em períodos de privação de ferro, a ferritina prontamente libera o ferro aonde ele é necessário (Millonig *et al.*, 2010). Em humanos, a ferritina possui 24 subunidades arranjadas de forma a criar uma cavidade capaz de abrigar até 4500 átomos de Fe (III), e possui dois tipos de subunidades: L-ferritina (leve, 19kDa, 174 resíduos de aminoácidos) e H-ferritina (pesada, 21kDa, 182 resíduos de aminoácidos), codificadas por genes localizados nos cromossomos 11 e 19, respectivamente (Knovich *et al.*, 2009; Worwood *et al.*, 1985). A L-ferritina em humanos é

codificada pelo gene *FTL* (MIM134790), o qual é constituído de 4 éxons (Santoro *et al.*, 1986) e está localizado no cromossomo 13q13.33 (Gasparini *et al.*, 1997).

A proporção de H- e L-ferritina é variável (depende do tipo de tecido), e as duas subunidades diferem em termos de função, enquanto H-ferritina é responsável pelo armazenamento e possui atividade de ferro-oxidase necessária para sequestrar ferro, é a L-ferritina que exerce uma função regulatória, devido à presença de grupamentos acídicos que facilitam a oxidação e hidrólise de ferro (Millonig *et al.*, 2010). Células reticuloendoteliais (macrófagos) e hepatócitos são os dois sítios principais de armazenamento de ferro em humanos, e os dois tipos celulares contribuem para o *pool* de ferritina circulante (Gkouvatsos *et al.*, 2012).

O ferro citosólico é liberado para a circulação pela ferroportina (FPT/IREG1/SLC40A1-*Solute Carrier family*, member 1), localizada na extremidade basolateral dos enterócitos (McKie *et al.*, 2000). A ferroportina também está presente na extremidade basolateral de outros tipos celulares incluindo sinciciotrofoblastos placentários, hepatócitos e macrófagos (Grotto, 2008). Haile *et al.* (2000) mapeou o gene *SLC40A1* (MIM604653) no cromossomo humano 2q32. O gene possui 1713 nucleotídeos e possui 8 éxons. Mutações já foram descritas nos éxons 1, 3, 5, 6 e 7 (Kasvosve, 2013; Mayr *et al.* 2010). A proteína possui 571 resíduos de aminoácidos e é predito que tenha doze domínios transmembrana e que ambas as extremidades, tanto C- quanto N-terminal, sejam citosólicas (Kasvosve, 2013; Rice *et al.*, 2009).

Assim como a DMT-1, a FPT também é seletiva para ferro na forma Fe^{+2} (Grotto, 2008). O mRNA e a expressão de proteínas encontram-se aumentados sob condições em que há aumento da absorção de ferro, e a extremidade 5'UTR do mRNA contém um IRE funcional (McKie *et al.* 2000). Nemeth *et al.* (2004) reportou que a hepcidina liga-se à ferroportina, levando a sua internalização e posterior degradação, e conseqüentemente a uma diminuição no efluxo de ferro. Com tal observação foi sugerido que a hepcidina controla pós-traducionalmente a ferroportina, regulando os níveis plasmáticos de ferro e a sua distribuição nos tecidos (Nemeth *et al.* 2004).

O transporte de ferro pelos enterócitos através da ferroportina requer hefestina, uma oxidase homóloga a ceruloplasmina sérica, localizada na superfície basolateral dos enterócitos e que oxida Fe^{+2} a Fe^{+3} para se ligar à transferrina sérica, esta conversão é necessária, pois a transferrina sérica tem alta afinidade pelo ferro na forma férrica (Hentze *et al.*, 2010; Grotto, 2008). A hefestina humana é codificada pelo gene *HEPH* (MIM300167), localizado no cromossomo Xq11-q12 (Vulpe *et al.*, 1999) constituído de 20 éxons em aproximadamente 100kb (Petra

&Vyoral, 2005; Syed *et al.*, 2002). Até o momento não há descrição na literatura de mutações em humanos que levem a defeitos na hefestina, algumas mutações foram descritas em camundongos *sla* (*sex-linked anemia*) (Petraak &Vyoral, 2005; Saad, 2010).

A ceruloplasmina é uma α -2glicoproteína que carrega 95% do cobre plasmático e desempenha um papel essencial na mobilização de ferro dos tecidos devido a sua atividade de ferro-oxidase (McNeill *et al.*, 2009). Codificada, em humanos, pelo gene *CP* (MIM117700), localizado no cromossomo 3q21-q24 (Royle *et al.*, 1987), o qual possui 19 éxons e 18 íntrons em aproximadamente 50 Kb (Daimon *et al.*, 1995). A ceruloplasmina humana é composta por uma única cadeia polipeptídica de 1046 aminoácidos com um peso molecular de 132 kDa (Takahashi *et al.*, 1984) e catalisa a oxidação do ferro ferroso para o férrico, processo necessário para a ligação do ferro à transferrina (Saad, 2010).

A maior parte do requerimento diário de ferro é suprido pela recuperação de ferro dos eritrócitos, através da fagocitose dos eritrócitos senescentes por macrófagos do sistema reticuloendotelial e pela degradação da hemoglobina. Este ferro reciclado é então disponibilizado para os precursores eritróides em desenvolvimento na medula óssea (Groto, 2008).

Uma vez que os humanos não são capazes de secretar o ferro em excesso, uma homeostase sistêmica é mantida através da regulação coordenada da absorção duodenal pela dieta, reciclagem do ferro dos eritrócitos senescentes nos macrófagos, e mobilização do ferro estocado no fígado (Enns *et al.*, 2012).

2.2. Metabolismo do Ferro – Estado Patológico

Transtornos na homeostase de ferro, devido à deficiência ou ao acúmulo, são a causa de algumas das doenças humanas mais comuns. A chave para um suprimento sistêmico e para a homeostase de ferro está na regulação adequada dos níveis plasmáticos deste elemento (Hentze *et al.*, 2010).

O metabolismo do ferro é balanceado por dois sistemas regulatórios, um que funciona de modo sistêmico e conta com o hormônio hepcidina e com a proteína transportadora de ferro ferroportina, e outro que controla predominantemente o metabolismo celular de ferro através de proteínas regulatórias do ferro (IRPs) que se ligam aos elementos responsivos do ferro (IREs) em mRNAs (Hentze *et al.*, 2010).

O ferro circula no plasma ligado à glicoproteína transferrina a qual tem dois sítios de ligação de alta afinidade ao Fe^{+3} . A ligação à transferrina mantém o ferro na forma solúvel, serve como o veículo principal de entrega às células (via receptor de transferrina, TfR1), e limita a geração de radicais tóxicos (Hentze *et al.*, 2010). A transferrina humana possui uma sequência de 678 resíduos de aminoácidos com uma massa molecular de aproximadamente 80 kDa (Hershberger *et al.*, 1991). O gene *TF* (MIM190000) localiza-se no cromossomo 3q21 (Baranov *et al.*, 1987), contém 12 éxons em 24 kb (Park *et al.*, 1985).

A saturação de transferrina é um indicador do armazenamento de ferro no corpo, mas também reflete o balanço entre a liberação reticuloendotelial de ferro e a absorção na medula óssea (Gkouvatsos *et al.*, 2012). Nos humanos a transferrina plasmática é normalmente em torno de 30% saturada com ferro. Uma saturação de transferrina inferior a 16% indica deficiência de ferro e uma saturação superior a 45% é sinal de acúmulo de ferro. Quando a saturação excede 60% o ferro não ligado à transferrina começa a se acumular na circulação e a danificar células parenquimatosas (Hentze *et al.*, 2010).

Os hepatócitos desempenham um papel duplo no metabolismo sistêmico do ferro: eles são o principal sítio de armazenamento de ferro, e eles secretam o principal hormônio regulatório da homeostase do ferro, a hepcidina (Hamp, LEAP1) (Hentze *et al.*, 2010). A hepcidina controla pós-traducionalmente a ferroportina, regulando os níveis plasmáticos de ferro e a sua distribuição nos tecidos (Nemeth *et al.*, 2004). A hepcidina humana é codificada pelo gene *HAMP* (MIM606464), constituído por 3 éxons e localizado no cromossomo 19q13.12. A forma biologicamente ativa da hepcidina contém 25 aminoácidos (Park *et al.*, 2001), e a hepcidina madura é secretada no plasma e circula ligada a alfa-2-macroglobulina (MIM103950) (Gkouvatsos *et al.* 2012; Peslova *et al.*, 2009). A expressão de hepcidina é coordenada por diferentes estímulos regulatórios: depósitos hepáticos de ferro, disponibilidade sistêmica de ferro (bem como de transferrina diférrica), atividade eritropoiética, estados infecciosos/inflamatórios e hipóxia (Zhao *et al.*, 2013; Hentze *et al.*, 2010). A regulação da hepcidina pelo ferro é um processo complexo que requer a coordenação de múltiplas proteínas, incluindo: hemojuvelina (HJV), BMP6 (*bone morphogenetic protein 6*), proteína da hemocromatose (HFE), receptor de transferrina 2 (TfR2), matriptase-2 (MT2), neogenina, receptores de BMP e transferrina (Zhao *et al.*, 2013). Desordens herdadas ou adquiridas que perturbam a produção de hepcidina conseqüentemente causam deficiência de ferro (altos níveis de hepcidina) ou acúmulo de ferro (baixos níveis de hepcidina) (Hentze *et al.*, 2010). A má

regulação da hepcidina é encontrada em diferentes doenças como a anemia de doença crônica, IRIDA (*iron refractory iron deficiency anemia*), câncer, hemocromatose hereditária e na eritropoiese inefetiva como β -talassemia (Zhao *et al.*, 2013).

A ferritina é a proteína responsável pelo armazenamento e pela distribuição intracelular de ferro (Arosio *et al.*, 2009). Em condições fisiológicas, a ferritina plasmática correlaciona com o ferro acumulado (Crook, 2012). Níveis elevados de ferritina sérica são encontrados em um amplo espectro de condições, associadas ou não com sobrecarga de ferro (Camaschela *et al.*, 2009). Devido a isso, um diagnóstico preciso de hiperferritinemia requer uma estratégia que inclua o histórico pessoal e familiar, testes bioquímicos e eventualmente, testes genéticos, ou outros testes que estejam relacionados à medida de ferro nos tecidos (Camaschela *et al.* 2009).

Além disso, o ferro é um cofator essencial para muitas proteínas envolvidas na função normal dos neurônios, como a síntese de mielina e de neurotransmissores. No cérebro normal, o ferro aparece distribuído heterogeneamente por região e tipo celular, e se acumula progressivamente durante os processos de envelhecimento e doenças neurodegenerativas (Dexter *et al.*, 1993; Duyn *et al.*, 2011). Com o envelhecimento neuronal, o ferro se acumula nas regiões que exibem características patológicas da doença de Alzheimer, doença de Parkinson e/ou doença de Huntington. Em indivíduos jovens, as maiores quantidades de ferro estão nos oligodendrócitos, enquanto que em indivíduos com mais de 60 anos, a maior parte do ferro é encontrado na micróglia e astrócitos do córtex, cerebelo, hipocampo, gânglios da base e amígdala (Rouault, 2006). A concentração elevada de ferro, além de contribuir para o aumento do estresse oxidativo, também aumenta agregados α -sinucleína visto em cérebros de pacientes com a doença de Parkinson e com demência por corpos de Lewy (Hashimoto *et al.*, 1999; Baraibar *et al.*, 2012). Tem sido largamente aceito que as altas concentrações de ferro contribuem para processos neurodegenerativos. No entanto, não se sabe ainda se a deposição excessiva de ferro no cérebro é um evento inicial, que inicia a neurodegeneração, ou se é uma consequência do processo de neurodegeneração (Baraibar *et al.*, 2008).

Mutações em heterozigose no gene *GBA* foram recentemente identificadas como o fator genético de risco mais comum para a doença de Parkinson e demência com corpos de Lewy (Clark *et al.*, 2009; Sidransky *et al.*, 2009). Uma das hipóteses aceitas postula que a acumulação de glicosilceramida e glicosilesfingosina poderia afetar o metabolismo da α -sinucleína (Cullen *et al.*, 2009). A TRE não atravessa a barreira hematoencefálica, pelo menos na dose habitual para os

pacientes. Sendo assim, esta intervenção teoricamente não alteraria os níveis de ferro no cérebro de pacientes com DG, o que poderia desempenhar um papel no desenvolvimento da forma neuropática da doença ou no desenvolvimento de parkinsonismo associado à DG.

2.3. Metabolismo do Ferro – Estado Patológico de Sobrecarga

Existem muitas doenças de sobrecarga de ferro, algumas adquiridas (secundárias) e outras hereditárias (Beutler, 2007). Devido à incapacidade do corpo de excretar ferro, a sobrecarga pode se desenvolver como um resultado de uma hiper-absorção prolongada de ferro da dieta, por administração excessiva pela via parenteral (transfusões de sangue), ou por uma combinação dos dois (Sheftel *et al.*, 2012). Pacientes com sobrecarga de ferro acumulam quantidades excessivas em diversos órgãos, como fígado, pâncreas e coração, e em consequência sofrem de disfunções que incluem cirrose, diabetes e disfunção cardíaca, que sem tratamento levam à morte (Sheftel *et al.*, 2012).

A hemocromatose hereditária é uma doença de acúmulo de ferro causada por defeitos na regulação celular e sistêmica de ferro (Pietrangelo, 2007). Existem diferentes formas da doença, sendo que todas as formas de hemocromatose já descritas resultam de mutações em genes envolvidos na regulação da expressão de hepcidina ou no eixo hepcidina/ferroportina (McDonald *et al.*, 2013).

Das doenças hereditárias, a hemocromatose associada ao HFE (tipo 1) é a mais comum (Beutler, 2007). A doença é causada por uma mutação no gene *HFE* (MIM613609), o qual codifica uma proteína similar a MHC de classe I (Aisen, 2004; Feder *et al.*, 1996) e consiste de 7 éxons em 12 kb (Feder *et al.*, 1996). Uma função importante da HFE é moderar a absorção de ferro via Tf-TfR1 (Aisen, 2004; Roy *et al.*, 1999). A mutação mais comum no gene *HFE* associada à hemocromatose hereditária é a mutação c.845G>A (localizada no éxon 4; p.C282Y), a qual, em homozigose, é a causa mais comum de hemocromatose hereditária (Silva *et al.*, 2012; Pietrangelo, 2007). Esta mutação desfaz as pontes dissulfeto no domínio $\alpha 3$ da proteína impedindo sua ligação com B2M (β -2-macroglobulina), e levando assim a um tráfico intracelular anormal da proteína e prejudicando sua apresentação na superfície celular (Silva *et al.*, 2012). Outras duas mutações em *HFE* foram descritas como responsáveis pelo fenótipo de hemocromatose quando em heterozigose

composta com C282Y: c.187C>G (p.H63D) e c.193A>T (p.S65C) (Silva *et al.*, 2012; Feder *et al.*, 1997).

Apesar de a função molecular de HFE não ter sido ainda completamente definida, sugere-se que esta proteína desempenha um papel direto na detecção do grau de saturação da transferrina através de interação com Tfr2 (Sheftel *et al.* 2012). De acordo com esse modelo, mutações em Tfr2 delineiam a hemocromatose hereditária tipo 3, a qual exibe uma patofisiologia similar ao tipo 1. As mutações descritas em Tfr2 associadas com hemocromatose hereditária são todas recessivas e podem ser separadas em três categorias: deleção de aminoácidos, substituição de um único aminoácido e mutações sem sentido que produzem uma proteína truncada (Chen *et al.*, 2012).

Na hemocromatose juvenil (hemocromatose hereditária tipo 2), os níveis de hepcidina são diretamente afetados. A hemocromatose juvenil é a forma mais severa de hemocromatose hereditária, onde os sintomas se estabelecem dentro das primeiras três décadas de vida (McDonald *et al.* 2013; de Lima Santos *et al.* 2012). Existem duas formas de hemocromatose juvenil, tipos 2A e 2B, causadas por mutações nos genes *HFE2* (hemojuvelina) (MIM602390) e *HAMP* (hepcidina), respectivamente, sendo que mutações no gene *HFE2* respondem por 90% dos casos de hemocromatose juvenil (McDonald *et al.* 2013), e mutações no gene *HAMP* são mais raras (McDonald *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2011). Em ambas, a herança é autossômica recessiva, onde homens e mulheres são igualmente afetados (McDonald *et al.*, 2013; de Lima Santos *et al.*, 2012), sendo ambas associadas, em sua patofisiologia com a regulação de hepcidina (de Lima Santos *et al.*, 2012).

A hemojuvelina (HJV), um co-receptor para BMPs (*bone morphogenetic proteins*) (Babitt *et al.*, 2006), é o regulador mais importante da expressão de hepcidina (Pietrangelo, 2007), pois forma complexos com receptores BMP tipo I e II, reforçando o sinal de transdução BMP/SMAD e aumentando assim os níveis de hepcidina (Gkouvatsos *et al.*, 2012). HJV e seu papel na regulação da hepcidina podem ser modulados especificamente pela atividade proteolítica da matriptase-2 (MT2), uma serina protease codificada pelo gene *TMPRSS6* (MIM609862), a qual cliva a HJV tornando-a incapaz de atuar como um co-receptor de BMPs (McDonald *et al.*, 2013).

Até o momento, cerca de 50 mutações não-sinônimas, sem sentido, ou de mudança de fase foram identificadas no gene *HFE2* (McDonald *et al.*, 2013). A maioria delas tem sido relatada tanto em homozigose ou heterozigose composta, em pacientes com acometimento precoce, e

acúmulo severo de ferro, a mutação p.G320V é considerada a mais comum (McDonald *et al.*, 2013).

A Hemocromatose tipo 4 (ou Doença da Ferroportina) (MIM606069) é a única forma de hemocromatose hereditária que apresenta um padrão de herança dominante (Sheftel *et al.*, 2012) e é causada por mutações sem sentido no gene codificante da ferroportina (*SLC40A1*) (Kasvosve, 2013; Rice *et al.*, 2009, Montosi *et al.*, 2001).

Mutações na ferroportina afetam tanto a função da proteína quanto sua regulação pela hepcidina (Sheftel *et al.*, 2012). Na maioria dos casos de hemocromatose hereditária, os níveis de hepcidina circulante são baixos, no entanto no tipo 4 encontram-se altos níveis de hepcidina (Sheftel *et al.*, 2012). Este fato suporta a visão de que o fenótipo de acúmulo de ferro nos tecidos parenquimatosos, encontrado na hemocromatose hereditária, pode ser causado tanto por deficiência quanto por resistência ao efeito de hepcidina, mas até o momento, não há um modelo satisfatório correlacionando os níveis plasmáticos de ferro (e sua regulação) com a secreção de hepcidina (Sheftel *et al.*, 2012). Até o momento 45 mutações no gene *SLC40A1* foram descritas em pessoas de diferentes etnias (Kasvosve, 2013).

Existem outras doenças hereditárias de sobrecarga de ferro não relacionadas à hemocromatose. A Atransferrinemia foi descrita pela primeira vez por Heilmeyer *et al.* (1961) em uma paciente jovem com anemia hipocrômica e acúmulo generalizado de ferro (Pietrangelo *et al.*, 2011). Desde então, poucos casos de Atransferrinemia foram descritos na literatura (Pietrangelo *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2009; Shamsian *et al.*, 2009; Aslan *et al.*, 2007; Knisely *et al.*, 2004; Beutler *et al.*, 2000). Mutações severas no gene da transferrina (*TF*) levam à esta doença rara de herança autossômica recessiva (Pietrangelo *et al.*, 2011), caracterizada por anemia microcítica acompanhada por acúmulo generalizado de ferro em humanos (Pietrangelo *et al.*, 2011). Outras apresentações clínicas incluem palidez e fadiga, elevação na ferritina sérica e no ferro, e diminuição na capacidade total de ligação do ferro à transferrina (TIBC) (Pietrangelo *et al.*, 2011).

Em 1995 Harris *et al.* publicaram um estudo o qual demonstrou o papel essencial da ceruloplasmina no metabolismo do ferro e identificou a Aceruloplasminemia como uma doença autossômica recessiva. A Aceruloplasminemia congênita caracteriza-se por anemia leve a moderada, sobrecarga de ferro e neurodegeneração (Saad, 2010). Pacientes com Aceruloplasminemia não conseguem mobilizar o ferro dos tecidos (Syed *et al.*, 2002; Harris *et al.*, 1995; Yoshida *et al.*, 1995), sofrem com deposição de ferro no fígado, pâncreas e e nos gânglios

da base do encéfalo (Syed *et al.*, 2002; Morita *et al.*, 1995) que podem levar ao diabetes mellitus e a sintomas neurológicos (Syed *et al.*, 2002; Klomp & Gitlin, 1996; Takahashi *et al.*, 1996) como ataxia e demência (Saad, 2010). Observa-se também a diminuição do ferro sérico e aumento dos níveis de ferritina e degeneração retiniana (Saad, 2010). Até o momento cerca de 40 mutações já foram descritas para o gene da ceruloplasmina (*CP*) em humanos (Rusticeanu *et al.*, 2013; Suzuki *et al.*, 2013), o que torna a detecção de mutações difícil na prática clínica, e além disso não há evidências claras da associação entre genótipo e fenótipo, visto que já foi observada variabilidade fenotípica em irmãos portadores da mesma mutação (Rusticeanu *et al.*, 2013; Fasano *et al.*, 2008). A maioria das mutações descritas proporcionam a formação de um códon de parada prematuro, e uma proteína truncada em que os sítios de ligação ao cobre estão ausentes (Suzuki *et al.*, 2013). A atividade de ferro-oxidase da ceruloplasmina é dependente da ligação ao cobre, e o ligante é codificado pelo éxon 18 (Suzuki *et al.* 2013; Vachette *et al.* 2002) e portanto, presume-se que a atividade da enzima dependa destes sítios de ligação (Suzuki *et al.*, 2013).

Mutações autossômicas recessivas têm sido relatadas no gene da DMT-1 (*SLC11A2*) responsáveis por uma diminuição da utilização de ferro pelos eritroblastos, embora os estoques de ferro hepático estejam aumentados, e por anemia hipocrômica microcítica, além de elevada saturação de transferrina e aumento de ferritina (Pietrangelo *et al.*, 2011; Saad 2010). Até o momento mutações no gene *SLC11A2* foram relatadas em pacientes de cinco famílias não relacionadas (Bardou-Jaquet *et al.*, 2011; Blanco *et al.*, 2009; Beaumont *et al.*, 2006; Iolascon *et al.*, 2006; Mims *et al.*, 2005) sendo que em todos casos relatados os pacientes apresentaram acúmulo severo de ferro no fígado.

Outra forma rara de sobrecarga de ferro de herança autossômica dominante deve-se a mutações no IRE do mRNA da H-Ferritina. A mutação A49U (c.-164A>T) foi relatada em uma única família japonesa em 2001 (Kato *et al.*, 2001), desde então outras mutações responsáveis por acúmulo de ferro não foram descritas (McDonald *et al.*, 2013).

Hiperferritinemia moderada é uma característica comum encontrada na população adulta e pode ser atribuída a diferentes fatores incluindo doença metabólica, disfunção hepática, resistência à insulina, neoplasia, infecção e inflamação (Crook, 2012). Nos últimos anos, novas formas de hiperferritinemia herdada não associadas com sobrecarga de ferro, tem sido descritas, o que adiciona elementos novos para um diagnóstico diferencial (Camaschela, 2009). A Hiperferritinemia Benigna (Kannengiesser *et al.*, 2009) é associada com uma mutação sem sentido

na L-ferritina (p.Thr30Ile), sem o acúmulo de ferro e geralmente demonstra uma saturação normal de transferrina (Crook, 2012). A Síndrome Hereditária da Hiperferritinemia com Catarata (HHCS) (MIM600886), descrita pela primeira vez em 1995, é uma desordem autossômica dominante caracterizada por elevação da ferritina sérica, acometimento precoce de catarata bilateral, e ausência de sobrecarga de ferro (Luscieti *et al.*, 2013, Girelli *et al.*, 1995; Beaumont *et al.*, 1995). A catarata se desenvolve devido a depósitos de L-ferritina no cristalino e seu aspecto pulverulento é patognomônico (Millonig *et al.*, 2010). A síndrome é causada por mutações no IRE localizado na região 5'UTR do mRNA da L-ferritina, o qual regula a expressão da ferritina pós-transcricionalmente, tais mutações reduzem a ligação das IRPs e levam ao aumento da síntese de ferritina nesta desordem. A ligação das IRPs ao IREs ocorre sob condições de deficiência de ferro e resulta na repressão traducional dos dois tipos de ferritina (Luscieti *et al.*, 2013). Até o momento cerca de 37 mutações já foram descritas, sendo 31 mutações de ponto e 6 deleções de diferentes tamanhos (Luscieti *et al.*, 2013). Mutações em homozigose são muito raras e até o momento foram relatadas em dois pacientes não relacionados (Luscieti *et al.*, 2013; Gonzalez *et al.*, 2010). O diagnóstico diferencial com hemocromatose hereditária é realizado pela análise genética e medidas bioquímicas do ferro sérico e da saturação de transferrina, os quais não estão elevados na HHCS (Luscieti *et al.*, 2013) e é importante para se evitar que os pacientes sejam submetidos ao diagnóstico invasivo (biópsia hepática) e a flebotomia (Luscieti *et al.*, 2013; Millonig *et al.*, 2010) este último procedimento pode levar ao desenvolvimento de anemia (Crook, 2012). A prevalência global da HHCS ainda não foi bem definida (Luscieti *et al.*, 2013), há relatos de casos no mundo inteiro, embora a maioria dos casos tenha sido identificado nos EUA e Europa, provavelmente devido à localização de laboratórios especializados (Luscieti *et al.*, 2013; Millonig *et al.*, 2010). Não há sobrecarga de ferro na HB e nem na HHCS porque a concentração elevada de ferritina no plasma deve-se ao aumento na produção de L-ferritina, a qual não está envolvida no acúmulo de ferro (Crook, 2012).

A Neuroferritinopatia é uma desordem autossômica dominante, que faz parte de um grupo de condições conhecidas como neurodegeneração por acúmulo de ferro cerebral que ocorre devido a mutações no gene da L-ferritina (*FTL*) (Keogh *et al.*, 2012), cujos sintomas estabelecem-se na vida adulta (Lehn *et al.*, 2012). Sete mutações patogênicas já foram descritas, seis delas são mutações de troca de sentido, as quais alteram a fase de leitura e a outra é uma mutação sem sentido (Keogh *et al.*, 2012). As mutações resultam em acúmulo de ferritina e de ferro nos neurônios

centrais, em particular nos gânglios da base (Keogh *et al.*, 2012), no cerebelo e no córtex motor (Lehn *et al.*, 2012) levando ao estresse oxidativo e por fim à neurodegeneração (Keogh *et al.*, 2012). Exames de sangue de rotina, incluindo os parâmetros de hemoglobina são normais, no entanto, os níveis de ferritina sérica são geralmente baixos na neuroferritinopatia (Lehn *et al.*, 2012), e são acompanhados de níveis normais de ferro sérico e capacidade total de ligação ao ferro (TIBC) (Crompton *et al.*, 2002).

Hiperferritinemia extrema ($> 1000 \mu\text{g/L}$) não é uma condição usual e é encontrada na Doença de Still, onde a ferritina plasmática é um marcador da atividade da doença (Crook, 2012).

3. Justificativas

Embora a TRE seja, em certa medida, uma excelente estratégia terapêutica, há diferenças interpessoais na resposta clinicolaboratorial aos fármacos. Nesse passo, deve haver o aprimoramento das intervenções médicas na DG. Diversas são as maneiras de aprimorar o diagnóstico e a resposta ao tratamento. Por exemplo, identificar novos biomarcadores séricos sensíveis e específicos para a severidade da doença e para o efeito do tratamento, que possam ser encarados como desfechos substitutos de eventos clínicos primordiais – via de regra, mais difíceis de quantificar –, representa uma maneira de melhorar a efetividade da terapêutica. Da mesma maneira, desenvolver novas modalidades de tratamento que possam ser adjuvantes da TRE e/ou alternativas a ela, também representa uma maneira de aprimorar e otimizar o manejo desses pacientes.

Todavia, para que se possa oferecer a otimização da terapêutica, antes de tudo é necessário ter um amplo conhecimento dos mecanismos fisiopatogênicos envolvidos na doença, matéria extremamente pobre na DG, a despeito do enorme conhecimento acumulado sobre o gene *GBA1* e o seu produto.

Cada vez mais tem crescido a noção de que as doenças mendelianas são na verdade o produto da interação de inúmeros fatores: e não monogenicamente determinadas. Conhecer os mecanismos fisiopatogênicos da DG representa apontar os outros, ainda desconhecidos, determinantes do fenótipo.

Especificamente em relação ao metabolismo do ferro, desde 1961 sabe-se do acúmulo de ferro nas CG e desde 1983 sabe-se da elevação da ferritina sérica. Entretanto, o mecanismo

ligando essas observações restam por esclarecer. Isso salienta a importância da hepcidina, um hormônio cada vez mais importante na compreensão de processos fisiopatológicos diversos, e que ainda não foi avaliado de maneira abrangente na DG. Da mesma forma, o mieloma múltiplo é uma neoplasia muito prevalente entre pacientes com a DG e a β_2 -microglobulina é o biomarcador mais importante no estadiamento do mieloma, porém resta por ser verificado na DG.

Um conhecimento aprimorado sobre a biologia dos macrófagos e da DG repercute em outras áreas do conhecimento também e pode ser útil para o entendimento de diversas doenças complexas de prevalência elevada e de relevância para a saúde pública, como câncer, doenças infecciosas e doenças hematológicas. Sem dúvida, conhecimento, na DG, sobre a sinalização dos macrófagos (e/ou diferentes tipos celulares) por meio da hepcidina e da ferritina possibilitará que se faça a extrapolação dos seus resultados como um mecanismo universal de regulação do metabolismo do ferro.

Na própria DG, sabendo que há acúmulo de ferro no interior das CG na forma de ferritina não glicosilada. Sabendo que a CG é um macrófago disfuncionante, que secreta inadequadamente diversas substâncias. Supondo que o ferro fica retido no interior das CG devido a secreção de hepcidina, a qual inibe a absorção intestinal de ferro e a mobilização de ferro a partir das reservas corporais. Supondo que, apesar da sobrecarga relativa, há mobilização e utilização ineficiente de ferro, o que conduz a uma eritropoiese ineficiente, sendo, portanto, mais um mecanismo para explicar a anemia na DG. Esse exemplo hipotético, pode imediatamente suscitar uma intervenção baseada no antagonismo farmacológico da hepcidina, o que poderia contribuir para incrementar os níveis de hemoglobina por uma via adicional. Além dessa, muitas outras intervenções podem ser hipotetizadas na medida em que se conhecem os mecanismos fisiopatogênicos das doenças.

Além das justificativas biológicas, temos outras maneiras de justificar o presente trabalho. A noção de medicina translacional é outro conceito em voga atualmente. Isso nos impõe a obrigação de tentar aplicar os mais recentes avanços científicos a serviço da sociedade.

4. Objetivos

Gerais:

- 1) Propor a β_2 -microglobulina e a hepcidina séricas como novos biomarcadores na DG e consolidar a utilidade da ferritina sérica como biomarcador em pacientes brasileiros com a DG.
- 2) Fornecer um escopo de evidência clínica que suporte a noção do ferro como fator modificador da DG.
- 3) Desenvolver e utilizar modelos *in vitro* e *in vivo* para a triagem de moduladores farmacológicos de hepcidina, identificando drogas que possam vir a ser testadas em modelos de DG, com o intuito de lançar os fundamentos para o desenvolvimento de novas terapias para a doença.

Específicos:

- 1) Registrar os valores de ferritina sérica em uma coorte de pacientes brasileiros com a DG, correlacionando-os com variáveis clinicolaboratoriais de relevância para o manejo da doença.
- 2) Quantificar a concentração sérica da fração glicosilada da ferritina, correlacionando-a com sua contrapartida não-glicosilada e com variáveis clinicolaboratoriais de relevância, de maneira a refinar o entendimento da sua utilidade como biomarcador.
- 3) Registrar os valores de β_2 -microglobulina sérica em uma coorte de pacientes com a DG, correlacionando-os com variáveis clinicolaboratoriais de relevância para o manejo da doença, no intuito de apontar o seu papel como biomarcador na DG.

- 4) Quantificar a concentração sérica de hepcidina, correlacionando os seus níveis com variáveis clinicolaboratoriais de relevância e estabelecendo-a, assim, como biomarcador da DG.
- 5) Quantificar a concentração sérica de IL-6, correlacionando-a com os valores obtidos de hepcidina, ferro sérico, saturação de transferrina, ferritina sérica e índices hematimétricos, de modo a sugerir o mecanismo etiológico da anemia observada na DG e a sugerir o ferro como fator modificador relevante na DG.
- 6) Realizar um *screening in vitro* para moléculas pequenas que possam atuar como moduladores farmacológicos da expressão de hepcidina, utilizando hepatócitos humanos.
- 7) Testar os efeitos *in vivo* de uma molécula pequena candidata a moduladora farmacológica da expressão de hepcidina.

5. Artigos Científicos

5.1. Artigo 1: Serum β_2 -microglobulin is frequently elevated in type 1 Gaucher patients

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



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular Genetics and Metabolism Reports

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



Short Communication

Serum β_2 -microglobulin is frequently elevated in type 1 Gaucher patients



Tiago Koppe^{a,b}, Filippo Vairo^{b,c}, Matheus Camargo^a, Livia Paskulin^a,
Liane Daudt^{d,e}, Ida V. Schwartz^{b,c,f,g,*}

^a School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, Brazil

^b Postgraduate Program in Genetics and Molecular Biology, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

^c Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA, Porto Alegre, Brazil

^d Department of Pediatrics and Puericulture, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

^e Clinical Hematology Service, HCPA, Porto Alegre, Brazil

^f Department of Genetics, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

^g BRAIN (Basic Research and Advanced Investigations in Neurosciences) Laboratory, Porto Alegre, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 September 2014

Received in revised form 28 November 2014

Accepted 28 November 2014

Available online xxxx

Keywords:

Serum β_2 -microglobulin
Gaucher disease
Multiple myeloma
Chitotriosidase
Biomarkers

ABSTRACT

β_2 -Microglobulin is the major prognostic factor in multiple myeloma, a known comorbidity of Gaucher disease. We evaluated herein serum β_2 -microglobulin levels of 31 type 1 Gaucher patients; for 8/31 patients, pre- and post-treatment comparisons were made. Thirteen patients (on treatment = 6) had high levels of β_2 -microglobulin, and showed higher chitotriosidase activity and Severity Score Index, and lower concentration of platelets, than patients with normal levels. Levels of β_2 -microglobulin correlated with chitotriosidase activity ($\rho = 0.65$; $p < 0.01$), platelets ($\rho = -0.42$; $p = 0.02$) and α_1 - ($\rho = 0.43$; $p = 0.02$) and α_2 -protein bands ($\rho = -0.40$; $p = 0.03$). Regarding pre- and post-treatment values, median β_2 -microglobulin levels decreased after treatment (pre- = 2931 ng/mL; post- = 1970 ng/mL; $p < 0.01$). Our data suggest that levels of serum β_2 -microglobulin are frequently elevated in type 1 Gaucher patients, correlate with severity of the disease and decrease after treatment.

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

1. Introduction

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

β_2 -Microglobulin (beta2) is a non-covalently attached-component of class I HLA (human leukocyte antigen) molecules, which is required for the proper functioning of this entire structure on the cell surface [3] and is released on extracellular fluid [1]. Beta2 is the core of the International Staging System for MM [4], being higher levels associated

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

2. Methods

In order to prove such hypothesis we enrolled type 1 GD patients followed at the local Reference Center for GD (Rio Grande do Sul state – Brazil) who had no evidence of malignancy (e.g., MM) in a prospective study. For patients who were receiving any kind of specific treatment for GD at inclusion (enzyme replacement therapy – ERT, or substrate reduction therapy – SRT; group 1) only one measurement of beta2 was performed. For patients receiving no treatment at inclusion (group 2), beta2 levels were evaluated just before the onset of treatment and after a mean of 20 months, or just at inclusion if the patient remained untreated. Beta2 values at inclusion were correlated with age at inclusion, age at onset of treatment, time on treatment, ERT dosage, chitotriosidase activity, Severity Score Index (SSI) [10], hemoglobin, serum ferritin, platelets, immunoglobulins (IgA, IgE, IgG, and IgM), and concentrations of α_1 , α_2 , β and γ

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

E-mail address: ischwartz@hcpa.ufrgs.br (I.V. Schwartz).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmgmr.2014.11.009>

2214-4269/© 2014 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>).

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

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

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

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

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

3. Results

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

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

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

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

Table 2
Comparison between type 1 Gaucher disease patients with elevated and normal serum β_2 -microglobulin at inclusion.

	Elevated (n = 13)	Normal (n = 18)	p-Value
Male:female	5:8	9:9	0.524
Age at inclusion (yrs)	32.5 [18–56.1]	29.4 [20.5–42.6]	0.779
Splenectomy	2	3	0.924
SSI	4 [3–6.5]	2.5 [1–4.2]	0.045*
Patients receiving treatment	6	15	0.029*
-Age at onset of treatment (yrs)	22.8 [7.6–35.4]	14.5 [10.4–34.7]	0.938
-Time on treatment (mo)	74.4 [30–134.4]	108 [26.4–124.8]	0.815
-Dosage of ERT (IU/kg/inf)	17.5 [15–33.8]	15 [15–30]	0.502
Chitotriosidase (nmol/h/mL)	6996 [5130–17,113]	3476 [2075.5–7038.7]	0.004*
Hemoglobin (g/dL)	12.7 [11.5–13.5]	13.3 [12–15]	0.128
Platelets ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	82 [62.5–143.5]	138.5 [111.5–172]	0.031*
Ferritin (ng/mL)	343.3 [207.3–1042.7]	349.7 [167–630.9]	0.401
Polyclonal gammopathy	3	2/16	0.347
Serum immunoglobulins (mg/dL)			
-IgG	1464 [1243–1722]	1262 [953.5–1635.5]	0.186
-IgA	240 [191–375.5]	295.5 [197.7–444]	0.337
-IgE	65 [28–213] (n = 11)	136.5 [33.5–334.7]	0.369
-IgM	244.5 [145–286.7] (n = 12)	162.5 [129.7–224.2] (n = 16)	0.228
Blood serum protein electrophoresis (g/dL)			
-Total protein	7.9 [7.3–8.2]	7.6 [7.3–8]	0.367
-Albumin	4.5 [4.1–4.9]	4.3 [4.1–4.6]	0.677
- $\alpha 1$	0.24 [0.22–0.31]	0.21 [0.16–0.25]	0.031*
- $\alpha 2$	0.66 [0.59–0.76]	0.77 [0.65–0.88]	0.032*
- β	0.7 [0.63–0.77]	0.76 [0.62–0.84]	0.334
- γ	1.61 [1.35–1.73]	1.48 [1.01–1.8]	0.525

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

* In bold, statistically significant results.

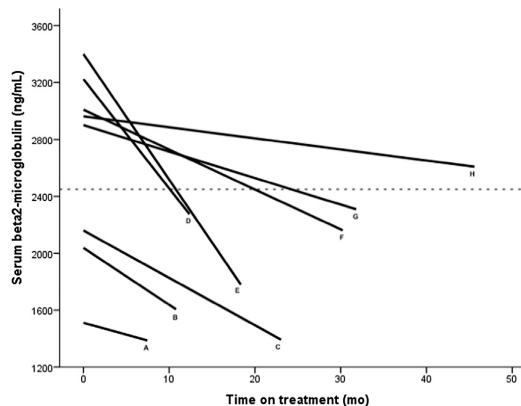


Fig. 1. Serum β_2 -microglobulin levels in eight type 1 Gaucher disease patients just before and after onset of treatment. Each line represents one patient. Dashed line represents the upper limit of normality (2450 ng/mL). Patients A and F are on miglustat; patients B, D and G are on imiglucerase 15 IU/kg/inf; patient E is on imiglucerase 30 IU/kg/inf; and patients C and H are on taliglucerase alpha 15 IU/kg/inf at follow-up. Patients A to G are treatment-naïve. Patient H has received ERT for a year and had ERT interrupted for 4 months before the inclusion in the study.

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

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

4. Discussion/conclusions

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

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

The moderate positive correlation found between beta2 and chitotriosidase values may reflect increased coexpression of both proteins in macrophages, or the chitotriosidase secreted by macrophages may stimulate other cells at distance, expressing MHC-1 molecules, and secondarily increasing beta2. Still, α serum proteins are a heterogeneous group of proteins secreted by different sources. Therefore, the true meaning of the correlation found between beta2 and these proteins needs to be further studied.

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

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

Acknowledgments

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

References

- [1] H. Broome, Plasma cell neoplasms: general considerations, in: M.A. Lichtman, T.J. Kipps, U. Seligsohn, K. Kaushansky, J.T. Prechal (Eds.), *Williams Hematology*, 8 ed. McGraw-Hill, New York, NY, 2010 (Retrieved July 20, 2014 from <http://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?bookid=3588&Sectionid=39835930>).
- [2] J. Deibener, P. Kaminsky, C. Jacob, B. Dousset, M. Klein, M. Duc, Enzyme replacement therapy decreases hypergammaglobulinemia in Gaucher's disease, *Haematologica* 83 (1998) 479–480.
- [3] R.N. Germain, D.H. Margulies, The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation, *Annu. Rev. Immunol.* 11 (1993) 403–450.
- [4] P.R. Greipp, J. San Miguel, B.G. Durie, et al., International staging system for multiple myeloma, *J. Clin. Oncol.* 23 (2005) 3412–3420.
- [5] M.S. Raab, K. Podar, I. Breitkreutz, P.G. Richardson, K.C. Anderson, Multiple myeloma, *Lancet* 374 (2009) 324–339.
- [6] B.E. Rosenbloom, N.J. Weinreb, A. Zimran, K.A. Kacena, J. Charrow, E. Ward, Gaucher disease and cancer incidence: a study from the Gaucher Registry, *Blood* 105 (2005) 4569–4572.
- [7] C. Shi, Y. Zhu, Y. Su, L.W. Chung, T. Cheng, Beta2-microglobulin: emerging as a promising cancer therapeutic target, *Drug Discov. Today* 14 (2009) 25–30.
- [8] Y. Shoenfeld, L.A. Gallant, M. Shaklai, E. Livni, M. Djaldetti, J. Pinkhas, Gaucher's disease: a disease with chronic stimulation of the immune system, *Arch. Pathol. Lab. Med.* 106 (1982) 388–391.
- [9] F. Vairo, P. Portela, P.H. Salim, et al., Human leukocyte antigens and Gaucher disease, *Blood Cells Mol. Dis.* 50 (2013) 202–205.
- [10] A. Zimran, J. Sorge, E. Gross, M. Kubitz, C. West, E. Beutler, Prediction of severity of Gaucher's disease by identification of mutations at DNA level, *Lancet* 334 (1989) 349–352.

5.2. Artigo 2: The prognostic value of the serum ferritin in a southern Brazilian cohort of patients with Gaucher disease



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

Research Article

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

Tiago Koppe^{1,2}; Divair Doneda³; Marina Siebert^{1,6,7}; Livia Paskulin^{1,2}; Matheus Camargo¹; Kristiane Michelin Tirelli⁴; Filippo Vairo⁴; Liane Daudt^{1,5} and Ida Vanessa D. Schwartz^{1,2,4,6}

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

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

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

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

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

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

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

Abstract

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

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

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

Introduction

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

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

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

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

Material and Methods

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

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

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

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

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

Results

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

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

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

	Pre-treatment (n = 18)	Post-treatment (n = 18)	<i>p</i>
Clinical findings:			
- Abdominal pain	11	5	0.070
- Bleeding*	10	2	0.008
- Bone involvement ¹	14	12	0.500
- Splenomegaly ²	14/n = 15	11/n = 15	0.250
- Hepatomegaly	11	6	0.125
- BMI ³ (kg/m ²)	23.8 [20.9-27.7]	24.6 [21.6-28.1]	0.170
Hemoglobin* (g/dL)	12.6 [10.1-13.9]	14 [11.6-15]	0.005
Leukocytes (x103/μL)*	4.15 [2.93-6.8]	4.9 [4.5-7]	0.050
Platelets* (x103/μL)	79 [63.7-146.7]	145.5 [116-171]	0.002
ALT (IU/L)	22.5 [15-35.7]	27 [18-43]/n = 17	0.093
LDH (IU/L)	317 [246-360]/n = 15	296 [238-368]/n = 17	0.778
Chitotriosidase* (x103 nmol/h/mL)	14 [7.9-14.7]	3.7 [1.7-5.5]	0.002
SSI⁴*	7 [4-12]/n = 15	2 [1-5.5]/n = 17	0.001
BMB score ⁵	8.5 [4.5-12]/n = 14	7 [4.25-10]/n = 12	0.180
Serum ferritin (ng/mL)*			
- Total*	756 [318-1441]	521 [227-626]	0.025
- Male*	811 [614-1544]/n = 9	528 [369-653]/n = 9	0.038
- Female	328 [190-1174]/n = 9	362 [123-624]/n = 9	0.374
Transferrin saturation (%)	19 [14-32]/n = 8	28 [23-34]/n = 13	0.138
Serum iron (μg/dL)	56 [46-89]/n = 10	91 [72-99]/n = 13	0.176

Values expressed as median [25th-75th percentiles] or absolute count, unless otherwise specified; **p* < 0.05 after McNemar or Wilcoxon signed-rank test; Reference values: serum ferritin (males: 22-322 ng/mL and females: 10-291 ng/mL); transferrin saturation (25-50%) and serum iron (50-170 μg/dL). ¹Bone involvement was considered whenever patients mentioned pain/pathological fractures without any other attributable cause, or in the presence of imaging evidence of bone disease (e.g., osteopenia on bone densitometry). ²Three patients had undergone splenectomy. ³Body Mass Index (Kg/m²): < 18.5 – underweight; 18.5-24.9 – normal weight; 25-29.9 – overweight and > 30 – obesity ⁴Clinical Severity Score Index: 0-9 – mild; 10-19 – moderate and > 20 – severe. ⁵Bone Marrow Burden score: 0-4 – mild; 5-8 – moderate and 9-16 – severe.

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

Discussion

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

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

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

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

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

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

Acknowledgments

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

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

References

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

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

Internet Resources

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

Associate Editor: Jeremy A. Squire

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

5.3. Artigo 3 (manuscrito em preparação): Gaucher disease patients show elevated serum hepcidin levels

Gaucher disease patients show elevated serum hepcidin levels

Tiago Koppe¹, Marina Siebert^{1,3}, Suélen Basgalupp^{1,3}, Filippo Vairo³, Amanda Quevedo³, Liane E. Daudt² and Ida Vanessa D. Schwartz^{1,3}

¹School of Medicine, Department of Genetics and Postgraduate Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

²Division of Hematology, Department of Internal Medicine, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

³Medical Genetics Service and BRAIN (Basic Research and Advanced Investigations in Neurosciences) Laboratory, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

Running title: Hpcidin and Gaucher

Keywords: hepcidin, oxidative stress, Gaucher disease, iron metabolism, biomarker.

Correspondence to:

Ida V. Doederlein Schwartz

Postgraduate Program in Genetics and Molecular Biology at Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Address: Ramiro Barcelos St., 2350, ZIP code 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil

Phone: 55-51-3359-8309

Fax: 55-51-3359-8010

E-mail: ischwartz@hcpa.edu.br

Abstract

Gaucher disease is a Mendelian-inherited pleiotropically-expressed lysosomal disease caused by low glucocerebrosidase activity. The basic element in the pathophysiology is an abnormal deposition of glucosylceramide in macrophages, which triggers the secretion of humoral mediators. Hepcidin, the master iron regulator, is a circulating molecule thought to be altered in Gaucher patients. Serum hepcidin is implicated in the pathophysiology of anemia of inflammation and intracellular iron retention, potentially damaging key cellular structures via Fenton reaction. So the purpose of this study was to investigate serum hepcidin levels in Gaucher patients in parallel with clinical variables of interest. Thirty-four Gaucher patients followed at the Reference Center for Gaucher Disease of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil were included in the study. Their clinical records were obtained through chart review and serum quantifications of hepcidin, IL-6 and glycosylated ferritin were made by ELISA techniques. Nineteen were treatment-naïve at the enrollment. For the whole sample, the median hepcidin levels were elevated (106.3 [71.1-194] ng/mL; upper limit of normality=65.8 ng/mL) and decreased after a median follow-up time of 3.81 [2.80-4.73] years to 51.7 [10.3-126] ng/mL ($p=0.04$). The same pattern was observed in the treatment-naïve subgroup 101.2 [67.2-225] vs 57.3 [24.5-113.5] ng/mL ($p=0.026$; $n=19$), denoting an effect of the therapy. During the same interval, IL-6 levels were reduced as well. Also, chitotriosidase and alanino-aminotransferase were predictors of serum hepcidin levels ($R^2=0.31$). In conclusion, this study presents evidence supporting the elevation of serum hepcidin in Gaucher patients, which suggests iron as a potential modifier factor of the disease.

Introduction

Gaucher disease (GD) is a Mendelian-inherited pleiotropically-expressed lysosomal disease caused by low glucocerebrosidase activity (EC 3.2.1.45) due to loss-of-function mutations in the *GBA1* gene (OMIM *606463) [Grabowski et al. 2014]. Clinically, the disease is characterized by the triad of hepatosplenomegaly, cytopenias, and skeletal abnormalities and subdivided into type 1 (nonneuronopathic; OMIM #230800), type 2 (acute neuronopathic; OMIM # 230900), and type 3 (chronic neuronopathic; OMIM # 231000) [Pastores and Hughes 2017]. However, GD also shows an intense phenotypical heterogeneity, with symptoms frequently overlapping categories and falling within broader spectra of presentation, which include forms as diverse as asymptomatic, indolent, neuronopathic, neurodegenerative, Parkinson- or Multiple Myeloma-susceptible, and perinatal-lethal [Grabowski et al. 2014; Böttcher et al. 2013]. Such a multitude of presentations is not adequately accounted for genotype [Hughes and Pastores 2013; Pastores and Hughes 2017] and much of the variation is believed to arise from modifier factors [Cox 2001 and 2006; Boven et al. 2004]. The basic element in the GD pathophysiology, the abnormal deposition of glucosylceramide in macrophages, has long been successfully targeted via both enzyme replacement and substrate reduction approaches (ERT and SRT, respectively) [Stirnemann et al. 2010; Mekinian et al. 2012; Poll et al 2002; Vigan et al. 2014]. However, there are subgroups of symptoms (e.g. neurologic) and patients that do not respond to them, despite high dosage ER [Pastores and Hughes 2017].

In recent years, several biomarkers such as glucosylsphingosine (lyso-GL1), chitotriosidase, and serum ferritin (SF) have accordingly entered into GD clinical practice and provided evidence for contributing pathways that potentially play roles as modifier factors of the disease [Murugesan et al. 2016; Stein et al. 2010; Koppe et al. 2016; Aerts et al. 2005; Boots et al. 2009; Fuller et al. 2015]. In accordance with that, two recent works [Medrano-Engay et al. 2014; Lorenz et al. 2016] have pointed out that serum hepcidin could be a biomarker implicated in the pathophysiology of GD.

Hepcidin is the master iron regulator, governing iron acquisition, distribution and utilization in humans and other mammals [Fraenkel 2014, 2015 and 2017; Patchen et al. 2016; King and Weiss 2014]. Although hepcidin has been detected in the kidney, heart, skeletal muscle, brain, and other tissues [Ding et al. 2011; Wang et al. 2010], its expression takes place predominantly in the liver, where it is transcriptionally down or upregulated by iron itself, hypoxia,

anemia, inflammation and infection [Ganz and Nemeth et al. 2012; Drakesmith et al. 2015]. The mechanism hepcidin controls the iron metabolism is by binding to ferroportin, the only known transmembrane iron exporter, which inhibits the efflux of iron from the intracellular compartment and in turn causes the decreasing of duodenal iron absorption and the increasing of iron in macrophages and other cell types [Ganz 2008]. Knowing the actual serum hepcidin levels in GD is of particular interest not only to eventually identify it as a GD biomarker but also to shed light on contributing mechanisms to hyperferritinemia and anemia, increased prevalence of some cancers, and neurodegeneration, since high hepcidin levels are associated with anemia of inflammation and with overstorage, which is known to be a major injury effector via Fenton reaction [Olynyk et al. 1999; Drakesmith et al. 2015; Poli et al. 2014].

The purpose of this study was to investigate serum hepcidin levels correlating it to inflammation status, iron profile and clinical variables.

Methodology

Patients and study design. This study was approved the local Ethics Committee. The individuals enrolled were all confirmed GD cases followed at the Reference Center for GD of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, who had consented to participate in it. For treatment naïve patients ($n=19$), a pre- and a post-treatment blood sample were collected (median time between collections= 3.62 [2.73-4.81] years). For patients on treatment at inclusion ($n=15$), two samples were collected (median time between collections= 3.86 [3.08-4.71] years).

Chart review. Serum hepcidin, IL-6 and glycosylated ferritin were prospectively analyzed (*baseline*= first sample; *follow-up*= latest sample). Data regarding the other variables were obtained retrospectively through review of the patients file. The matching of the retrospective and prospective data was set up by restricting the variables to be matched to an eight-month period around the reference dates.

Hepato and splenomegaly were defined as evidence of a liver mass 1.25 times greater than its normal 2.5% of the total body weight and a spleen mass greater than its normal 0.2% of the total body weight, using imaging techniques or physical examination. Severity Score Index (SSI) was calculated according to [Zimran et al. 1989].

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) procedures. Serum samples frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ were selected, and ELISAs for hepcidin, IL-6 and glycosylated ferritin were carried out in

duplicates to determine their levels. For this purpose, commercial 96-well ELISA kits for each separate analyte were acquired and run rigorously according to their manufacturer's instructions and read spectrophotometrically.

For hepcidin the kit was the Cusabio[®] Human Hepcidin-25 ELISA Kit – a sandwich ELISA very specific for hepcidin-25 and with a detection range of 4.69-300 ng/mL and absorbance readings at 450 and 540 nm.

For the analyte IL-6 the kit was the Human IL-6 ELISA Kit from Invitrogen[™]. It is also a sandwich ELISA, with range of detection between 0-500 pg/mL and best readings at 450 nm.

For glycoferritin, a competitive ELISA kit from USBiological Life Sciences[™] –catalog name: Glycosylated Ferritin (GF) Bioassay ELISA Kit (human) was used. Its detection range is 0-1000 ng/mL at 450 nm of wavelength.

Concentrations were eventually derived in GraphPad Prism[®] by generating a best curve-fit from the standards and interpolating all absorbances within the curve. Absorbances outside the boundaries of the best-fit curves had their concentrations considered as if they were the precise either lower or higher limit of the curve.

Statistics. With the exception of the multiple regression modeling and the Box-Cox equations, all analyses performed in this study were run in GraphPad Prism[®]. As most of our data were non-normal distributed, we opted to run non-parametric tests and present the results as median [p25-75] or counting, even losing statistical power.

In this sense, for comparing baseline and follow-up time points, we executed Wilcoxon tests for quantitative data and the McNemar's test for categorical data. On the other hand, in the subgroup comparisons we used Mann-Whitney tests. Spearman correlations were equally run in the pursuance of relationships among variables at baseline.

Subsequently we also aimed to run a multiple regression to find baseline predictors for serum hepcidin. To this end, we were compelled to transform to normality the variables planned to enter our regression model. We used therefore an online free software to estimate the best lambdas in a Box-Cox power transformation approach [Wessa, 2015]. Posteriorly we run simple linear regression on those variables in GraphPad Prism[®] and the slopes with $p < 0.20$ were passed to the next stage. In IBM[®] SPSS, we finally modeled our final multiple regression equation, by performing sequential multiple regressions using the same $p < 0.20$ criteria for the slopes until all variables entered in the model had Beta coefficients statistically significant.

Statistical significance assumed throughout the study was $p < 0.05$.

Results

Table 1 summarizes the demographic description of the thirty-four patients included in the study. At the baseline time point the non-treatment-naïve patients ($n=15$) had been treated for a median time of 5.9 [1.3-9.1] years (imiglucerase=14 and miglustat=1) and the median age at the onset of their treatments was 16.8 [7.9-52.1] years. In addition, when we compared baseline variables of the patients already on treatment at inclusion against ($n=15$) the treatment naïve patients ($n=19$), we did not find any difference between them regarding all variables tested (data available upon request).

Table 2 compare pre- and post-treatment data in the naïve patients and shows a significant burden of disease in several GD domains at baseline as well as their expected overall trend towards normalization during the interval analyzed.

Serum hepcidin

For the whole sample, median hepcidin at baseline was 1.61 times higher than the upper limit of normality for the general population (65.8 ng/mL – Galesloot et al. 2011) and, after the baseline-to-follow-up interval, it was reduced to below that cutoff. Moreover, there was a clear reduction of hepcidin of 51.4% at the follow-up time point ($p=0.0045$) (Figure 1A). Male and female median hepcidin did not differ each other statistically (data not shown). Additional subgrouping by splenectomy, splenomegaly or hepatomegaly status as well as by interruption or change of treatment proved no statistically relevant difference in terms of hepcidin (data available upon request).

For the treatment naïve patients ($n=19$), there was a clear effect of the therapy at the end of the follow-up: 101.2 [67.2-225] vs 57.3 [24.5-113.5] ng/mL ($p=0.026$; $n=19$) (Figure 2).

Inflammation and iron indices

Figure 1A shows hepcidin levels for the whole sample (as described in the section above) and 2B shows that IL-6 levels were considerably higher at baseline yielding a 25% reduction at the follow-up ($p=0.015$). Glycosylated ferritin levels on the other hand were not statistically changed by treatment (Fig. 2C) and total serum ferritin was likewise (Fig. 2D). Similar to hepcidin, no

statistical difference was found in IL-6 and in either ferritin forms by the approach of subgroup comparison, though splenectomized patients had a trend towards higher levels of IL-6 and glycosylated ferritin at baseline in comparison to the non-splenectomized individuals: median IL-6 = 2.9 vs 1.6 pg/mL and glycoferritin = 91.9 vs 62.3 ng/mL, $p=0.090$ and 0.097 by Mann-Whitney testing. Serum iron and transferrin saturation got a sample size of as few as 5 patients for Wilcoxon paired test, making impractical the testing. For the treatment naïve patients, there were no differences between the baseline and follow-up time points regarding glycoferritin, IL-6 and total ferritin (data available upon request).

Correlation of hepcidin with well-established GD activity indicators

IL-6 showed a moderate positive correlation with hepcidin ($\rho=0.36$; $p=0.038$; $n=34$). In the same way, mean corpuscular volume ($\rho=-0.37$; $p=0.035$; $n=33$), alanine aminotransferase ($\rho=0.37$; $p=0.033$; $n=34$), chitotriosidase ($\rho=0.45$; $p=0.009$; $n=32$) and time under treatment ($\rho=0.38$; $p=0.024$; $n=34$) were all statistically correlated with hepcidin. Treatment-naïve individuals were considered as time zero for the purpose of correlation and when suppressing them from calculations the coefficient and p -value were kept unaltered (data not shown). All other variables tested turn out to be not correlated with hepcidin, including red blood cell count ($p=0.08$; $n=16$) and transferrin saturation ($p=0.126$; $n=14$).

Multiple and simple linear regression analyses

In an effort to find independent predictors of hepcidin, we transform our variables to get them normally-distributed for attaining the assumptions of linear regression techniques. So by the agency of Box-Cox transformations, the derived equations were: (a) IL-6: $y=(y^{-0.08}-1)/-0.08$; (b) chitotriosidase: $y=y^{0.21}$; (c) MCV: $y=((y^{1.85}-1)/1.85)/2000$; (d) ALT: $y=(y^{-0.62}-1)/-0.62$; (e) time on treatment at baseline: $y=((0.001+y)^{0.67}-1)/0.67$; (f) age at baseline: $y=(y^{-0.1}-1)/-0.1$; (g) serum iron: $y=(y^{-0.26}-1)/-0.26$; (h) SSI: $y=((0.001+y)^{0.35}-1)/0.35$ and (i) hepcidin: $y=((y+0.001)^{0.38}-1)/0.38$ (Box-Cox normality plots estimating the optimal lambdas as well as the linked documentation are available upon request). With normal-transformed variables in hand, we went on first with running the individual linear regressions graphed in Figure 3. The Spearman coefficients and their p -values were of note rigorously the same as they were in the non-transformed variables. In addition to the calculated linear equations, Figure 3 also provides the Pearson coefficients and their p -values. After, by advancing in

our step-by-step modeling, we eventually got to our final multiple regression model for predicting serum hepcidin, which consisted only of ALT ($B=60.570$; $p=0.003$) and chitotriosidase ($B=2.069$; $p=0.007$) out of the eight starting variables. The model's adjusted R-squared is 0.31 for 32 observations ($F=8.073$; $p=0.002$).

Discussion

There has been increasingly recognition that the phenotype in GD is the summation of GBA-related disarrangements and apparently unrelated genetic and environmental factors. In this regard, iron has long been regarded as a putative modifier factor in GD, with elemental iron being already demonstrated to accumulate in Gaucher cells [Lee et al. 1967] and SF already found to be elevated and reduced after treatment [Koppe et al. 2016; Stein et al. 2010], which somehow has suggested hepcidin as being implicated in the GD pathophysiology. Two recent works have addressed the serum hepcidin levels in GD. [Medrano-Engay et al. 2014] studied eight GD patients and showed that serum hepcidin was elevated and reduced after 4 months of iron chelation therapy (from median 330 to 118.5 ng/mL). Subsequently, [Lorenz et al. 2016] studied 11 GD patients and intriguingly showed that hepcidin was within the reference range in those patients.

Herein, we were able to demonstrate that serum hepcidin was 1.61 times higher than the ULN in a substantially larger sample of GD patients. We also found that hepcidin correlates with IL-6 positively and MCV negatively. In addition, we showed that, after a 3.81-year interval of patients receiving ongoing or new-onset therapies, serum hepcidin was reduced nearly by half in conjunction with a significant decrease in serum IL-6 levels. Unfortunately, data regarding iron indices were scarce following our 8-month restriction matching. However, by relaxing the stringency, we were able to increase the sample size and run comparisons for serum iron and transferrin saturation. We picked the first data available in the records and the latest. We could see then that transferrin saturation increased after an interval of 2.8 [1.3-4] years (24.2 [17.6-27.6] vs 31.6 [24.3-35.9] percent; $p=0.023$; $n=23$) as well as serum iron after an interval of 3.2 [1.7-4] years (78 [57-90] vs 86 [76.5-102] $\mu\text{g/mL}$; $p=0.037$; $n=25$).

Taken together these findings could arguably suggest that the chronic inflammation in GD stimulates the IL-6-induced expression of hepcidin in the liver and that hepcidin is the mediator of the known accumulation of iron in Gaucher cells, which in turn could be a trigger for the hyperferritinemia seen in GD patients [Regenboog et al 2016]. Additionally, the increase in

intracellular iron is accompanied by hypoferrremia, which reduces the iron available for erythropoiesis, which is translated into anemia of inflammation [Fraenkel 2017].

The finding of elevated serum hepcidin levels in GD could be important in understanding the increased prevalence of Parkinson and other neurodegenerative diseases. Heparidin has been shown to be expressed in murine brains and increased with aging [Ding et al. 2011; Wang et al. 2010]. The intracerebroventricular injection of hepcidin decreases the expression of ferroportin in mouse cerebral cortex, hippocampus and striatum [Wang et al. 2010]. Additionally, treatment of primary cultured neurons with hepcidin has shown to cause a decrease in neuronal iron release and ferroportin protein levels [Wang et al. 2010; Vyoral and Petrak 2017]. These findings remain to be replicated in humans, but there is solid evidence that neurodegenerative disorders present neuronal iron overload implicated in their pathophysiology [Brar et al. 2009; Sternberg et al 2017; Stoll and Bendszus 2009; Mehta et al. 2013]. Recently, it was described a cell death mechanism called ferroptosis [Dixon et al 2012]. It is an iron-dependent cell death pathway that involves depletion of intracellular reduced-glutathione levels [Yang et al., 2014], which is the natural ligand for the non-ferritin-bound iron [Hider and Kong, 2011], which increases the cellular availability of iron as a catalyst for ferroptosis [Guiney et al. 2017]. In GD, neurologic symptoms are poorly treated with current therapies since ERT does not cross the blood-brain barrier and type 2 and 3 present the worst prognoses. In addition, even type 1-treated patients seem to not have neurodegeneration prevented by current approaches. In our cohort, we were able to show that serum hepcidin decreases with treatment. However, in terms of neurodegeneration time is crucial because neuronal plasticity is reduced. So, we hypothesized that pharmacologic modulation of hepcidin with small molecules that cross blood-brain barrier could be a topic to be considered in GD, at least until ERT/SRT could lower hepcidin levels.

In terms of assessment of hepcidin as biomarker, we demonstrate that hepcidin reduced over time with treatment in treatment-naïve patients. In addition to IL-6 and MCV, hepcidin was also correlated with ALT, chitotriosidase and time under treatment. There was no difference when subgrouping by hepatosplenomegaly, splenectomy, genotype and gender. When controlling the effects for the other variables in our regression model, ALT and chitotriosidase were found to be truly correlated with hepcidin with a *R*-squared of 0.31. Taken together, we suggest that hepcidin could be a biomarker for monitoring the treatment, with reduction reflecting better outcomes (see Table 2). Our data support that the reduction rather than the levels themselves should be the point

to be observed and observation of hepcidin in larger samples of treatment-naïve patients and its relationship with Lyso-GL1 would be useful to assess further to better appreciate its candidacy as biomarker in GD.

We could not replicate our previous finding of reduction of SF after treatment [Koppe et al. 2016]. That is possibly due to the fact that patients were on average on treatment by 9 years. As a consequence, glycosylated ferritin levels, known to increase after treatment [Stirnemann et al. 2011] and hepcidin-ferritin relationship, known to be strongly correlated in normal population [Galesloot et al. 2011], was not found in our cohort. In the treatment-naïve patients there was a trend, but due to the reduced sample size, we could not achieve statistical significance.

In conclusion, despite the shortcomings such as retrospective and missing data, and lacking of pre-treatment samples, this study presented evidence supporting the elevation of hepcidin along with IL-6 in GD patients, which suggests that serum hepcidin is an emerging hormone involved in the GD pathophysiology. Since iron overload increases the production of reactive species of oxygen via Fenton chemistry, cellular damage can ensue and contribute for neurodegeneration and even cancer susceptibility in GD patients. Therefore, in vitro determination of hepcidin, ferroportin and iron in Gaucher cells and neurons of GD patients in cell culture models would be the next logical step to provide support for this observation.

Acknowledgements

Financial support for this study was provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA), and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, RS, Brazil).

References

- Aerts JM, Hollak CE, van Breemen M, Maas M, Groener JE and Boot RG (2005) Identification and use of biomarkers in Gaucher disease and other lysosomal storage diseases. *Acta Paediatr Suppl* 2005 94:43-46.
- Boot RG, van Breemen MJ, Wegdam W, Sprenger RR, de Jong S, Speijer D, Hollak CE, van Dussen L, Hoefsloot HC, Smilde AK, et al. (2009) Gaucher disease: a model disorder for biomarker discovery. *Expert Rev Proteomics* 6:411-419.

Böttcher T, Rolfs A, Meyer B, Grossmann A, Berg D, Kropp P, Benecke R and Walter U (2013) Clinical, genetic, and brain sonographic features related to Parkinson's disease in Gaucher disease. *J Neurol* 260:2523-2531.

Boven LA, van Meurs M, Boot RG, Mehta A, Boon L, Aerts JM, Laman JD (2004) Gaucher cells demonstrate a distinct macrophage phenotype and resemble alternatively activated macrophages. *Am J Clin Pathol* 122:359-369.

Brar S, Henderson D, Schenck J, Zimmerman EA. (2009) Iron accumulation in the substantia nigra of patients with Alzheimer disease and parkinsonism. *Arch Neurol.* 66(3):371-4.

Cox TM (2001) Gaucher disease: understanding the molecular pathogenesis of sphingolipidoses. *J Inherit Metab Dis* 24 (Suppl 2):106-121.

Cox TM (2006) Biomarkers in lysosomal storage diseases. In: Mehta A, BeckMand Sunder-Plassmann G (eds) *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS*. Oxford PharmaGenesis, Oxford, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11586/> (accessed March, 2017)

Ding H, Yan C, Shi H, Zhao Y, Chang S, Yu P, Wu W, Zhao C, Chang Y, Duan X. (2001) Hepcidin is involved in iron regulation in the ischemic brain. *PLoS One.* 6(9):e25324.

Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, Patel DN, Bauer AJ, Cantley AM, Yang WS, Morrison B 3rd, Stockwell BR. (2012) Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell.* 149(5):1060-72.

Drakesmith H, Nemeth E, Ganz T. Ironing out Ferroportin. *Cell Metab.* 22(5):777-87.

Fraenkel P (2014) Critical models for the anemia of inflammation. *Blood.* 123(8):1124-5.

Fraenkel P. (2015) Understanding anemia of chronic disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2015:14-8.

Fraenkel P. (2017) Anemia of Inflammation: A Review. *Med Clin North Am.* 101(2):285-296.

Fuller M, Szer J, Stark S and Fletcher JM (2015) Rapid, single-phase extraction of glucosylsphingosine from plasma: a universal screening and monitoring tool. *Clin Chim Acta.* 29:6-10.

Galesloot TE, Vermeulen SH, Geurts-Moespot AJ, Klaver SM, Kroot JJ, van Tienoven D, Wetzels JF, Kiemeny LA, Sweep FC, den Heijer M and Swinkels DW (2011) Serum hepcidin: reference ranges and biochemical correlates in the general population. *Blood.* 117:e218-225.

Ganz T, Nemeth E. (2012) Hepcidin and iron homeostasis. *Biochim Biophys Acta.* 1823(9):1434-43.

Ganz T. (2008) Iron homeostasis: fitting the puzzle pieces together. *Cell Metab.* 7(4):288-90.

Grabowski GA, Petsko GA, Kolodny EH (2014). Gaucher Disease. In: Valle D, Beaudet AL, Vogelstein B, Kinzler KW, Antonarakis SE, Ballabio A, Gibson K and Mitchell G (eds), *OMMBID - The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*, <http://ommbid.mhmedical.com/content.aspx?bookid = 474&Sectionid = 45374148> (accessed March, 2017)

Guiney S, Adlard P, Bush A, Finkelstein D, Ayton S. (2017) Ferroptosis and cell death mechanisms in Parkinson's disease. *Neurochem Int.* 104:34-48.

Hider R, Kong X. (2011) Glutathione: a key component of the cytoplasmic labile iron pool. *Biometals.* 24(6):1179-87.

Hughes DA and Pastores GM (2013) Haematological manifestations and complications of Gaucher disease. *Curr Opin Hematol* 20:41-47.

King RL, and Weiss MJ (2014) Iron-laden macrophage in autoimmune disease. *Blood*. 123:469.

Koppe T, Doneda D, Siebert M, Paskulin L, Camargo M, Tirelli KM, et al. The prognostic value of the serum ferritin in a southern Brazilian cohort of patients with Gaucher disease. *Genet Mol Biol* 2016; 39:30-4.

Lee RE, Balcerzak SP, Westerman MP. (1967) Gaucher's disease. A morphologic study and measurements of iron metabolism. *Am J Med*. 42(6):891-8.

Lorenz F, Pawłowicz E, Klimkowska M, Beshara S, Bulanda Brustad A, Skotnicki A, Wahlin A, Machaczka M. (2016) Ferritinemia and serum inflammatory cytokines in Swedish adults with Gaucher disease type 1. *Blood Cells Mol Dis*. pii: S1079-9796(16)30206-6.

Medrano-Engay B, Irun P, Gervas-Arruga J, Andrade-Campos M, Andreu V, Alfonso P, et al. Iron homeostasis and inflammatory biomarker analysis in patients with type 1 Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis* 2014; 53:171-5.

Mehta V, Pei W, Yang G, Li S, Swamy E, Boster A, Schmalbrock P and Pitt D (2013) Iron is a sensitive biomarker for inflammation in multiple sclerosis lesions. *PLoS One* 8:e57573.

Mekinian A, Stirnemann J, Belmatoug N, Heraoui D, Fantin B, Fain O, Charpentier A and Rose C (2012) Ferritinemia during type 1 Gaucher disease: mechanisms and progression under treatment. *Blood Cells Mol Dis* 49:53-57.

Murugesan V, Chuang W, Liu J, Lischuk A, Kacena K, Lin H, Pastores G, Yang R, Keutzer J, Zhang K, Mistry P. (2016) Glucosylsphingosine is a key biomarker of Gaucher disease. *Am J Hematol*. 91(11):1082-1089

Olthof AW1, Sijens PE, Kreeftenberg HG, Kappert P, van der Jagt EJ, Oudkerk M. (2009) Non-invasive liver iron concentration measurement by MRI: comparison of two validated protocols. *Eur J Radiol*. 71(1):116-21.

Olynyk JK, Cullen DJ, Aquilia S, et al. A population-based study of the clinical expression of the hemochromatosis gene. *N Engl J Med* 1999;341:718– 724.

Pastores GM, and Hughes DA (2017) Gaucher Disease. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al. (eds), *GeneReviews*®, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1269/> (accessed March, 2017)

Patchen B, Koppe T, Cheng A, Seo Y, Wessling-Resnick M, Fraenkel P. (2016) Dietary supplementation with ipriflavone decreases hepatic iron stores in wild type mice. *Blood Cells Mol Dis*. 60:36-43.

Poli M, Asperti M, Ruzzenenti P, Regoni M, Arosio P. Hepcidin antagonists for potential treatments of disorders with hepcidin excess. *Front Pharmacol* 2014; 5:86.

Poll LW, Koch JA, Willers R, Aerts H, Scherer A, Häussinger D, Mödder U and vom Dahl S (2002) Correlation of bone marrow response with hematological, biochemical, and visceral responses to enzyme replacement therapy of nonneuronopathic (type 1) Gaucher disease in 30 adult patients. *Blood Cells Mol Dis*. 28:209-220.

Regenboog M1, van Kuilenburg AB2, Verheij J3, Swinkels DW4, Hollak CE5. (2016) Hyperferritinemia and iron metabolism in Gaucher disease: Potential pathophysiological implications. *Blood Rev.* 30(6):431-437.

Stein P, Yu H, Jain D and Mistry PK (2010) Hyperferritinemia and iron overload in type 1 Gaucher disease. *Am J Hematol* 85:472-476.

Sternberg Z, Hu Z, Sternberg D, Waseh S, Quinn J, Wild K, Jeffrey K, Zhao L, Garrick M. (2017) Serum Hepcidin Levels, Iron Dyshomeostasis and Cognitive Loss in Alzheimer's Disease. *Aging Dis.* 8(2):215-227.

Stirnemann J, Belmatoug N, Vincent C, Fain O, Fantin B and Mentré F (2010) Bone events and evolution of biologic markers in Gaucher disease before and during treatment. *Arthritis Res Ther.* 12:R156.

Stirnemann J, Boutten A, Vincent C, Mekinian A, Heraoui D, Fantin B, Fain O, Mentré F, Belmatoug N (2011) Impact of imiglucerase on the serum glycosylated-ferritin level in Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis* 46:34-38.

Stoll G and Bendszus M (2009) Imaging of inflammation in the peripheral and central nervous system by magnetic resonance imaging. *Neuroscience* 158:1151-1160.

Vigan M, Stirnemann J, Caillaud C, Froissart R, Boutten A, Fantin B, Belmatoug and, Mentré F (2014) Modeling changes in biomarkers in Gaucher disease patients receiving enzyme replacement therapy using a pathophysiological model. *Orphanet J Rare Dis.* 9:95.

Vyoral D, Petrak J. (2017) Therapeutic potential of hepcidin - the master regulator of iron metabolism. *Pharmacol Res.* 115:242-254.

Wang S, Fu L, Duan X, Crooks D, Yu P, Qian Z, Di X, Li J, Rouault T, Chang Y. (2010) Role of hepcidin in murine brain iron metabolism. *Cell Mol Life Sci.* 67(1):123-33.

Wessa P. (2015), Box-Cox Normality Plot (v1.1.11) in Free Statistics Software (v1.1.23-r7), Office for Research Development and Education, URL http://www.wessa.net/rwasp_boxcoxnorm.wasp/.

Yang W, SriRamaratnam R, Welsch M, Shimada K, Skouta R, Viswanathan V, Cheah J, Clemons P, Shamji A, Clish C, Brown L, Girotti A, Cornish V, Schreiber S, Stockwell B. (2014) Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell.* 156(1-2):317-31.

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

Attachments (2 Tables and 3 Figures)

TABLE 1. Demographic Description of the Whole GD Cohort.

Baseline characteristics of the GD patients under investigation (<i>n</i> =34)	
Males	17
GD type	
- Type 1	31
- Type 3	3
Splenectomy	7
Changes of therapy ¹	15
Age at baseline (yr)	29.16 [19.34-44.41]
Time of follow-up (yr)	3.81 [2.80-4.73]

¹Patients that changed or discontinued treatment for any time and/or for any reason during the follow-up. Variables are expressed in terms of medians [p25-75] or counting.

TABLE 2. The burden of disease at baseline and the effect of the standard therapy on selected severity endpoints measured at the follow-up visit in seven treatment-naïve GD patients.

Variables (<i>n</i>) ¹	Baseline	Follow-up	<i>P</i> ²
Severity score index (17)	3 [1.5-5.5]	1 [0.5-3.5]	0.004
Mean corpuscular volume [fL] (19)	86 [83.9-92.1]	89.2 [82.8-94.2]	0.031
Hemoglobin [g/dL] (19)	13.5 [12-14.2]	14.1 [13.1-14.7]	0.136
White blood cells [$\times 10^3/\mu\text{L}$] (19)	5.5 [4.6-7.6]	5.5 [4.8-7.1]	0.623
Platelets [$\times 10^3/\mu\text{L}$] (19)	129 [91-165]	167 [113-212]	0.001
Alanine aminotransferase [IU/L] (18)	27 [22.2-36]	24 [18.5-26.5]	0.001
Chitotriosidase [$\times 10^3$ nmol/h/mL] (18)	4.2 [1.6-9.7]	2.2 [1.4-5.2]	0.021

Values are in median [p25-75] or counting. ¹*n* was made up exclusively of individuals with paired data, on a variable by variable basis. ²We tested for differences between the two time points by using Wilcoxon test.

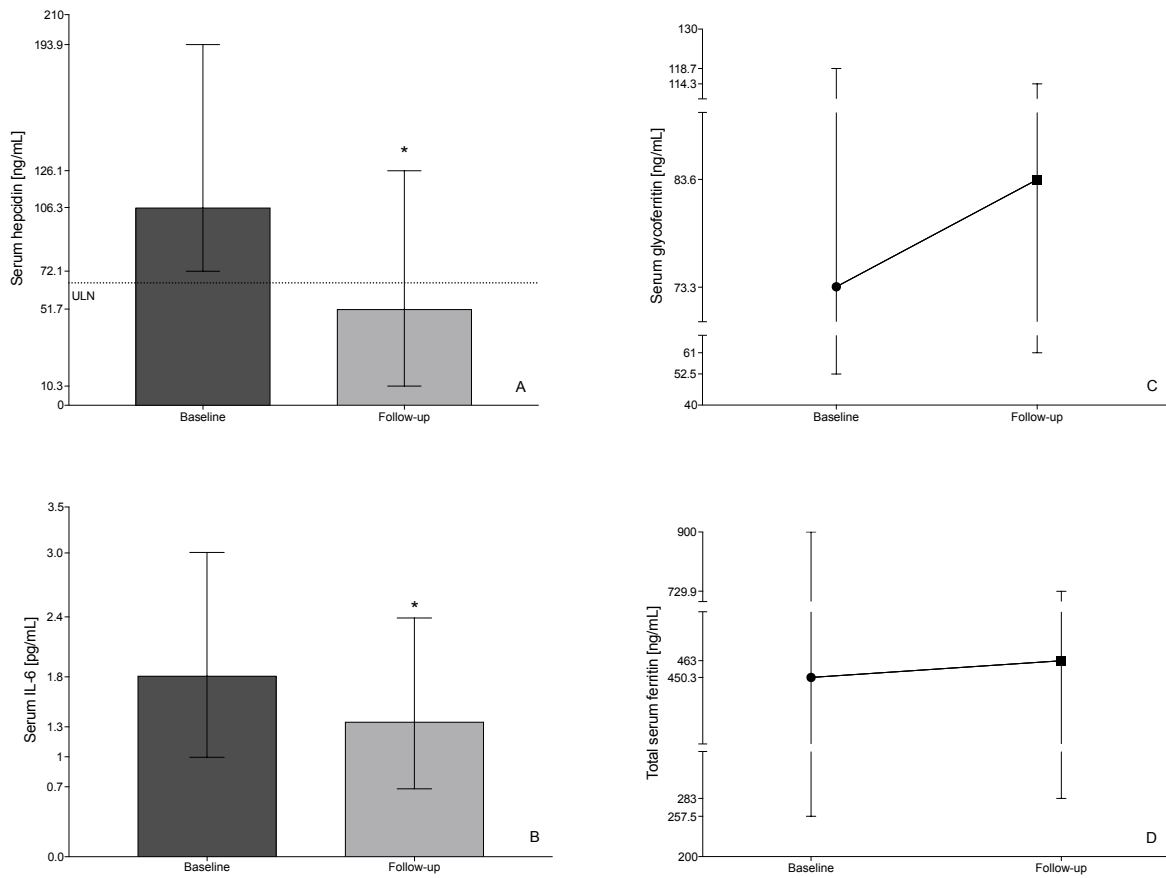


Figure 1. Changes over time for the whole sample of iron-related proteins, including its regulatory hormone hepcidin and the hepcidin transcription-inducer interleukin(IL)-6. Descriptive statistics referring only to paired samples (baseline vs. follow-up) calculated by Wilcoxon signed-rank test are shown here. Accordingly, numbers depicted in between the farthest ends on the x- or y-axis represent median [p25-75] for both times. *Statistically different. Axes in line graphs were split to fit the page. (A) Serum hepcidin levels in the whole cohort ($n=34$) ($*p=0.0045$). ULN stands for upper limit of normality (65.8 ng/mL). (B) Serum IL-6 levels ($n=34$) ($*p=0.0155$). (C) Serum glycosylated ferritin levels ($n=34$) ($p=0.1166$). (D) Total serum ferritin levels ($n=32$) ($p=0.3217$).

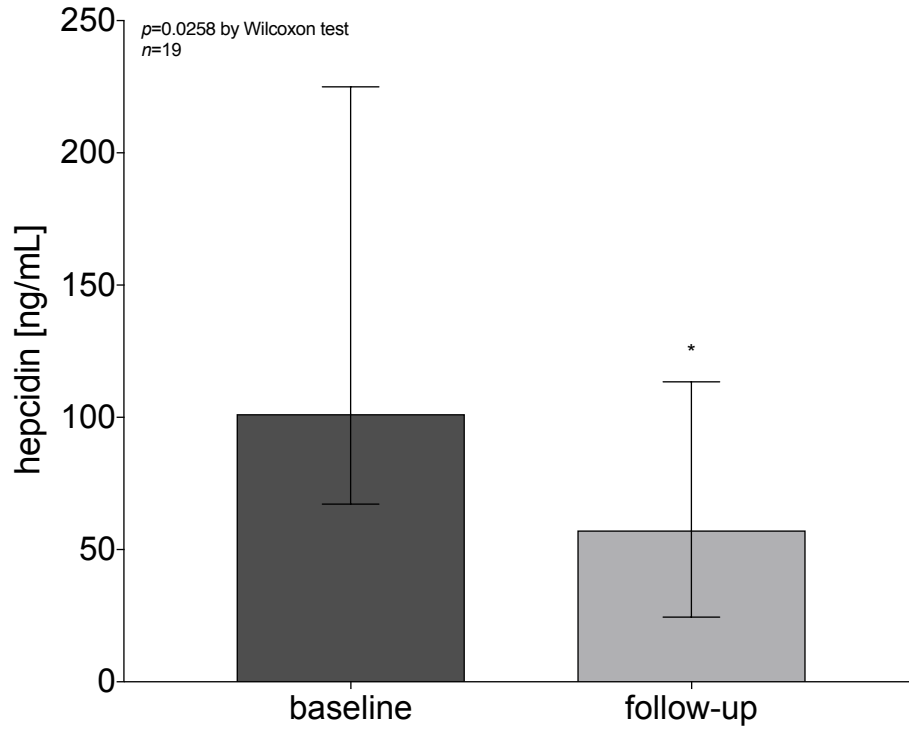


Figure 2. Effect of standard GD therapy on serum hepcidin levels in nineteen treatment-naïve GD patients. Here, pre-treatment is synonymous with baseline and post-treatment with follow-up. Values expressed as median [p25-75].

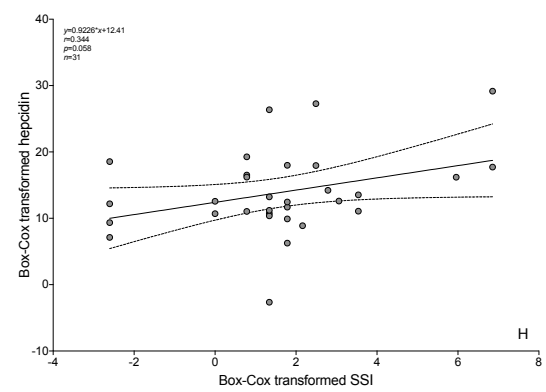
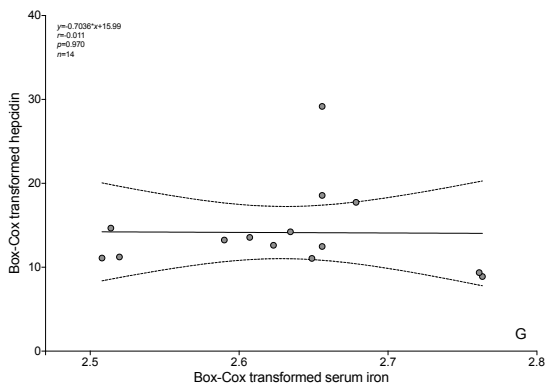
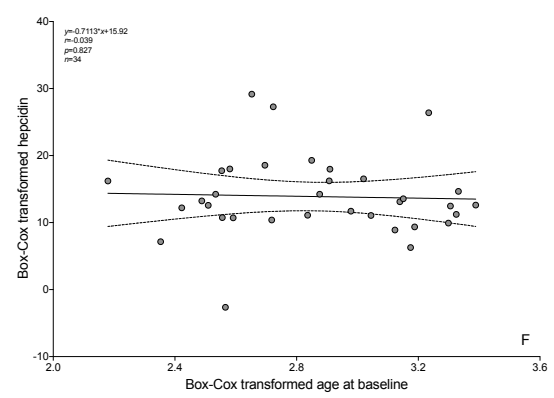
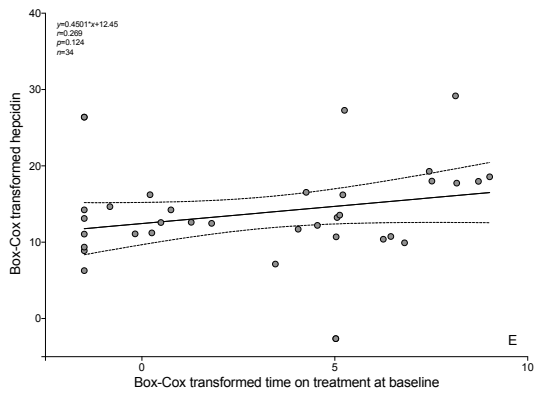
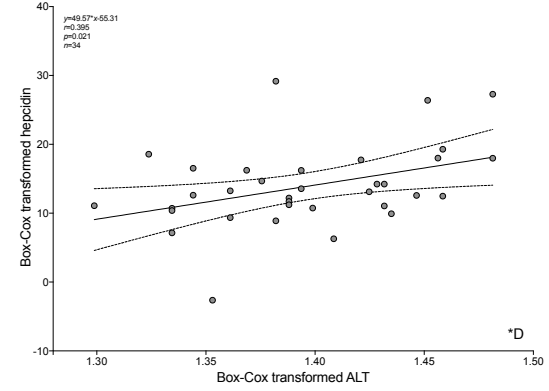
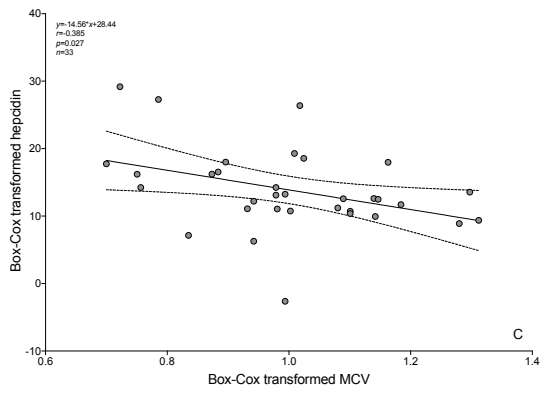
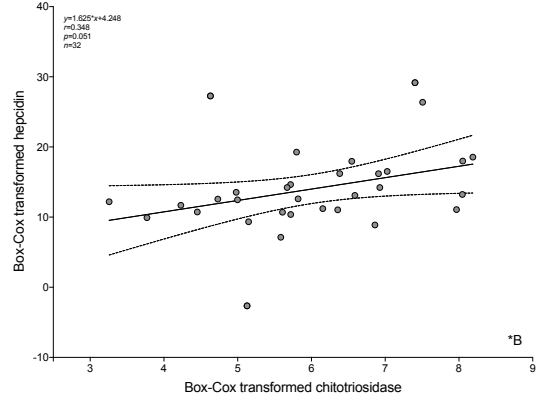
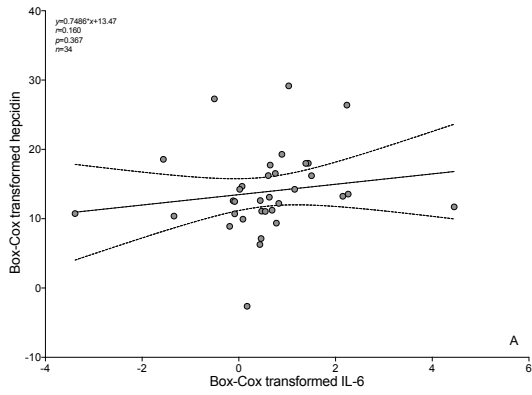


Figure 3. Individual simple regressions assessing the relationships between hepcidin and eight putative explanatory variables are shown here regardless of statistical significance. All variables are from baseline and were transformed *a priori* into ones normally distributed using Box-Cox's power transformation approach (equations are described in the text). From these initial statistics we started off a step-by-step multiple regression modeling (where only variables with $p > 0.20$ were able to pass into the subsequent model - see text for further details) which led up to a multiple regression model with the asterisked variables (B and D). The scale and numbers on the axes do not represent actual concentrations, volumes, years or scores but rather the Box-Cox transformation from those quantities (see the text to find out the units of measurement for the non-transformed counterparts). The linear equations and Pearson coefficients as well as their associated n and p -values are shown on the upper left corner of each graph. In single models hepcidin was not predicted by the variables on the x-axis in (A), (B), (E), (F), (G) and (H). However, on the other hand, it was inversely correlated with (C) and positively with (D).

5.4. Artigo 4: Dietary supplementation with ipriflavone decreases hepatic iron stores in wild type mice

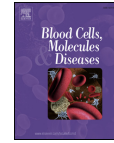
Blood Cells, Molecules and Diseases 60 (2016) 36–43



Contents lists available at ScienceDirect

Blood Cells, Molecules and Diseases

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bcmd



Dietary supplementation with ipriflavone decreases hepatic iron stores in wild type mice



Bonnie Patchen^{a,b,1}, Tiago Koppe^{a,b,1}, Aaron Cheng^{a,b}, Young Ah Seo^{c,d}, Marianne Wessling-Resnick^{c,d}, Paula G. Fraenkel^{a,b,*}

^a Division of Hematology/Oncology, Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, MA, United States

^b Department of Medicine, Harvard Medical School, Boston, MA, United States

^c Department of Genetics and Complex Diseases, Harvard School of Public Health, Boston, MA, United States

^d Department of Nutrition, Harvard School of Public Health, Boston, MA, United States

ARTICLE INFO

Article history:

Submitted 19 November 2015

Revised 4 May 2016

Accepted 4 May 2016

Available online 08 May 2016

Editor: Mohandas Narla

Keywords:

Iron

Hepcidin

Thalassemia

Ferroportin

Hemoglobinopathy

ABSTRACT

Hepcidin, a peptide produced in the liver, decreases intestinal iron absorption and macrophage iron release by causing degradation of the iron exporter, ferroportin. Because its levels are inappropriately low in patients with iron overload syndromes, hepcidin is a potential drug target. We previously conducted a chemical screen that revealed ipriflavone, an orally available small molecule, as a potent inducer of hepcidin expression. To evaluate ipriflavone's effect on iron homeostasis, we placed groups of 5-week old wild type or thalassemia intermedia (*Hbb*^{Th3+/-}) mice on a soy-free, iron-sufficient diet, AIN-93G containing 220 mg iron and 0–750 mg ipriflavone/kg of food for 50 days. Ipriflavone 500 mg/kg significantly reduced liver iron stores and intestinal ferroportin expression in WT mice, while increasing the ratio of hepcidin transcript levels to liver iron stores. Ipriflavone supplementation in *Hbb*^{Th3+/-} mice failed to alleviate iron overload and was associated with a milder reduction in intestinal ferroportin and a failure to alter the ratio of hepcidin transcript levels to liver iron stores or splenic expression of the hepcidin-regulatory hormone, erythropoietin. These data suggest that dietary supplementation with ipriflavone alone would not be sufficient to treat iron overload in thalassemia intermedia.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

As humans do not actively excrete iron, maintaining iron homeostasis requires modulation of intestinal iron uptake to reflect the body's iron stores. Hepcidin is a transcriptionally regulated peptide hormone [1] that is produced primarily in the liver and excreted in the urine. Hepcidin transcription increases in response to inflammation [2,3] or iron overload [4] and decreases in the setting of increased erythropoiesis, iron deficiency, or hypoxia [2]. Hepcidin regulates iron uptake by enterocytes and iron delivery to erythrocytes by binding the iron exporter ferroportin1 (*fpn*), which results in internalization and degradation of *fpn* [5].

In patients with iron overload disorders such as β -thalassemia and hereditary hemochromatosis, regulation of iron absorption and metabolism is disrupted, resulting in accumulation of iron in body tissues such as the liver and spleen. Thalassemias are inherited hemoglobinopathies resulting in impaired synthesis of hemoglobin and are among the most common genetic diseases in the world [1,2]. Patients with thalassemia

major (TM), most commonly those homozygous for β -globin gene deletions (β^0 -thalassemia), exhibit severe anemia resulting in dependence on blood transfusions to maintain normal development and limit progression of liver and spleen enlargement and skeletal deformities caused by extramedullary hematopoiesis [1]. Patients with thalassemia intermedia (TI) have less severe abnormalities in globin production and do not usually require blood transfusions, although they are prone to increased intestinal iron absorption [1]. While life expectancy for thalassemia major (TM) patients has improved in recent decades, heart failure remains the leading cause of mortality [3,4]. Improved control of iron overload, as assessed by serum ferritin levels, correlates with a lower probability of heart disease and death [4].

Hbb^{Th3}, subsequently referred to as Th3, mice have a targeted deletion in the mouse β^{minor} and β^{major} gene. Th3 homozygote mice, a model of thalassemia major, lack all β globin genes and are nonviable unless rescued by blood transfusions. Th3 heterozygotes (Th3 +/-), a model for thalassemia intermedia, are viable without blood transfusions, but exhibit moderate anemia, ineffective erythropoiesis, and iron overload, particularly in the liver and spleen [5]. Th3 +/- exhibit increased intestinal *fpn* expression and inappropriately low hepatic transcript levels of hepcidin [5].

Because its levels are inappropriately low in patients with iron overload syndromes [6] and experimental over-expression of *hepcidin* or

* Corresponding author at: Division of Hematology/Oncology, Beth Israel Deaconess Medical Center, CLS 434, 330 Brookline Avenue, Boston, MA 02215, United States.

E-mail address: pfraenke@bidmc.harvard.edu (P.G. Fraenkel).

¹ These authors contributed equally.

injection of synthetic hepcidin improves iron overload in mouse models [7,8], hepcidin is a potential drug target for the treatment of tissue iron accumulation. While patients with hereditary hemochromatosis may be treated with therapeutic phlebotomy, individuals with iron-loading anemias, such as thalassemia rely on chelation therapy rather than phlebotomy. Despite the widespread use of chelators, the majority of thalassemia major patients die of iron-related organ failure, which is incompletely resolved by chelation therapy [9,10], thus we would like to identify small molecules that modify hepcidin expression, reduce tissue iron overload, and may synergize with iron chelators.

We recently conducted a chemical screen in human hepatocytes (HepG2 cells) for small molecules that regulate hepcidin expression [11,12]. We first identified genistein as a flavone molecule that increased hepcidin expression in human hepatocytes in vitro and in zebrafish embryos in vivo [12]. On further screening [11], we identified ipriflavone, an isoflavone with estrogenic properties, as an upregulator of hepcidin expression that increases hepcidin luciferase activity and hepcidin mRNA transcript abundance at 1 μ M concentration, which is ten-fold more potent than genistein. Ipriflavone increased expression of the BMP-dependent gene *ID3* [11], suggesting it activates the BMP-6 pathway to modulate hepcidin transcription.

Because ipriflavone is a relatively nontoxic, orally available small molecule that has been approved as a drug for osteoporosis in Europe and Japan, we hypothesized that it could be useful in the treatment of iron overload syndromes in vivo. Ipriflavone is a synthetic isoflavone that is derived from daidzein, a molecule that is abundant in soybeans. While ipriflavone has estrogenic effects, it is less stimulatory to the endometrium than estradiol [13]. Ipriflavone, taken as an oral supplement, has been shown to increase bone mineral density in postmenopausal women [14] and to have antioxidant properties [15].

In this study we investigated the effect of dietary supplementation with ipriflavone on iron homeostasis in wild type (WT) mice and in a mouse model of thalassemia intermedia, *Hbb*^{Th3+/-} (Th3 +/-). We found that short-term gavage or dietary supplementation with ipriflavone increased serum hepcidin levels in WT mice. Long-term dietary supplementation with ipriflavone significantly reduced liver iron stores in WT, but not in Th3 +/- mice. Furthermore, dietary supplementation with ipriflavone at 500 mg/kg decreased intestinal *fpn* expression in WT and Th3 +/- mice and significantly increased the ratio of hepcidin transcript levels to liver iron stores in WT mice.

2. Materials and methods

2.1. Mouse strains and diet

All mouse strains were maintained on the C57BL/6 background and included WT C57BL/6 (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) and a thalassemia intermedia model (*Hbb*^{Th3+/-} (Th3 +/-) a gift of Dr. Seth Alper). In the experiments, WT mice were males, while Th3 +/- mice included both males and females, housed separately. All experiments were approved by the Animal Care and Use Committee of Beth Israel Deaconess Medical Center. At 4 weeks of age, the mice were equilibrated for 1 week on a soy-free rodent diet (AIN-93G with 2.5 mg of iron per kg of food, BioServ, Flemington, NJ) that was supplemented with ferrous gluconate hydrate (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) to achieve a total iron content of 35 mg of elemental iron per kilogram of food for short-term experiments or 220 mg of elemental iron per kilogram of food, which is typical for a laboratory mouse diet, for long-term experiments. For 4-hour experiments, ipriflavone (#16068, LKT Laboratories, St. Paul, MN) dissolved in 90% phosphate buffered saline/10% DMSO was administered by oral gavage at 120 mg/kg body weight for one dose followed by nonterminal blood collection 4 h later. The diet was then supplemented with 0, 250, 500, or 750 mg ipriflavone/kg of food and maintained for 7 or 50 days. All groups were fed and watered ad libitum and food intake and body weight were monitored throughout. Animals were maintained on a 12 h light-dark schedule. After 7 or

50 days, the mice were anesthetized by intraperitoneal injection of tribromoethanol and underwent terminal cardiac exsanguination and tissue harvest. Genotypes of the Th3 +/- animals were confirmed by PCR amplification using the primers in Supplementary Table 1.

2.2. Hematologic analysis

Blood was collected from the heart using a heparinized sterile 1 ml tuberculin syringe and 25-gauge needle and then transferred to a test tube with 3.6 mg EDTA. Complete blood counts, white blood cell differential, and reticulocyte counts were performed in the Boston Children's Hospital Department of Laboratory Medicine on an Advia 120 (Siemens Healthcare, Malvern, PA).

2.3. Quantitative real time RT-PCR and quantitation of serum hepcidin levels

Fresh tissues were immediately stabilized in RNAlater solution (Thermo Fisher, Cambridge, MA) and stored at 4 °C. Thirty milligram sections of tissue were removed from the stabilization reagent, flash frozen in liquid nitrogen, and disrupted by grinding with a mortar and pestle. RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) according to the manufacturer's protocol. cDNA was generated and quantitative real time RT-PCR was performed according to the method as described [12]. Serum hepcidin protein level was measured using the hepcidin Murine-Compete ELISA Kit (Intrinsic LifeSciences, La Jolla CA).

2.4. Non-heme tissue iron assay

Fresh aliquots, 200 mg each, of liver and spleen were weighed and frozen at -20 °C. Nonheme iron content was determined using the bathophenanthroline method, as described [16]. Data shown are μ g iron per gram of tissue. All standards and samples were evaluated in triplicate.

2.5. Histology and immunohistochemistry

The ileum and a lobe of the liver from each mouse were fixed in phosphate buffered paraformaldehyde (4%, pH 7.4) and embedded in paraffin, sectioned, and mounted on glass slides.

2.6. Diaminobenzidine (DAB)-enhanced Perls' staining for nonheme iron

Deparaffinized and rehydrated liver and ileum slides were incubated in 1% potassium ferrocyanide/0.12 M HCl for 30 min, washed 3 times in PBS, quenched in 0.3% H₂O₂/Methanol for 20 min, washed 3 times in PBS, and incubated in 3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride solution (SIGMA FAST™ DAB with Metal Enhancer Tablet, #D0426, 1 tablet set per 5 ml solution, Sigma Aldrich) for 30 min. Slides were then washed 3 times in PBS, prior to dehydration and placement of a cover slip.

2.7. Immunohistochemistry

Immunohistochemical staining of ileum slides with an anti-ferroportin (anti-*fpn*) antibody (#MTP11-A, Alpha Diagnostic International, San Antonio, TX) was performed using the Dako EnVision + System-HRP (#K4010, Dako, Carpinteria, CA). Control slides were stained using a mouse *fpn* control peptide (MTP11-P, Alpha Diagnostic International) with 10 μ g/ml antibody in 0.05 M Tris-HCl-1% BSA, or 0.05 M Tris-HCl-1% BSA alone.

2.8. Flow cytometry

To assess the effects of ipriflavone treatment on erythropoiesis, flow cytometry was performed to determine the percentage of mature and immature erythrocytes in the spleen and bone marrow using the method as described [5] with the following antibodies, APC-conjugated anti-Ter119 (#557909, BD Biosciences, San Jose, CA) and PE-conjugated anti-CD71 (#AB22393, Abcam, Cambridge, MA). Cells were counted and analyzed using a Gallios flow cytometer and the Kaluza acquisition and analysis programs (Beckman Coulter, Inc., Indianapolis, IN).

2.9. Transferrin-bound iron uptake assay

Human hepatoma cells, HepG2 (American Type Tissue Collection, Manassas, VA), were plated at a density of 10^6 cells/well in 2 mL of α -minimal essential medium/10% endotoxin-free fetal bovine serum/1% penicillin/streptomycin (Life Technologies, Grand Island, NY) at 37 °C, 5% CO₂. Twenty-four hours after plating, the media was changed to α -MEM/1% FBS/1% penicillin/streptomycin. The following day, the media was supplemented with 6 nM ⁵⁵Fe-transferrin and vehicle only (1% DMSO) or 1–100 μ M ipriflavone. ⁵⁵Fe transferrin-bound iron uptake assay was performed as described [12].

2.10. Statistical analysis

Data shown are means \pm standard errors unless otherwise indicated. The Kruskal-Wallis method was used to generate a global *p*-value using Prism 6.0c (GraphPad, San Diego, CA). Where the global *p*-value

was < 0.05, pairwise Student's *t*-tests were performed. *p* < 0.05 was considered a significant result on the Student's *t*-test.

3. Results

3.1. Ipriflavone increases serum hepcidin levels in wild-type mice

We had previously identified ipriflavone as a potent inducer of *hepcidin* transcript levels in vitro, but had not evaluated its effect on iron metabolism in vivo. To avoid the confounding effects of soy-derived flavones in standard mouse diets, we used the soy-free diet, AIN 93G (Bioserv). To evaluate ipriflavone's short-term effects, we equilibrated 4-week old wild-type, C57/BL6 mice, to an iron-sufficient AIN 93G diet containing 35 mg of iron per kg of food for 1 week and then delivered ipriflavone (120 mg/kg of body weight) or vehicle alone by oral gavage. Four hours later (Fig. 1A), we measured serum hepcidin levels and found an increase in hepcidin levels in the ipriflavone-gavaged mice (550.3 ± 51.1 vs. 348.8 ± 83.79 , *p* = 0.05). We then treated the mice for 7 days on the iron-sufficient diet supplemented with 500 mg ipriflavone/kg of food. At the end of 7 days, the mice exhibited a significant increase in serum hepcidin levels (351.7 ± 44.2 vs 151.4 ± 16.1 , *p* = 0.001), however there was no significant change in liver *hepcidin* transcript levels, liver, or spleen iron stores (Fig. 1B–D).

3.2. Ipriflavone effectively reduced nonheme iron level in the livers of wild-type mice

We were particularly interested in whether longer-term treatment of the mice would prevent hepatic iron loading. To that end, we fed wild-type or Th3 +/- mice diets including higher amounts of

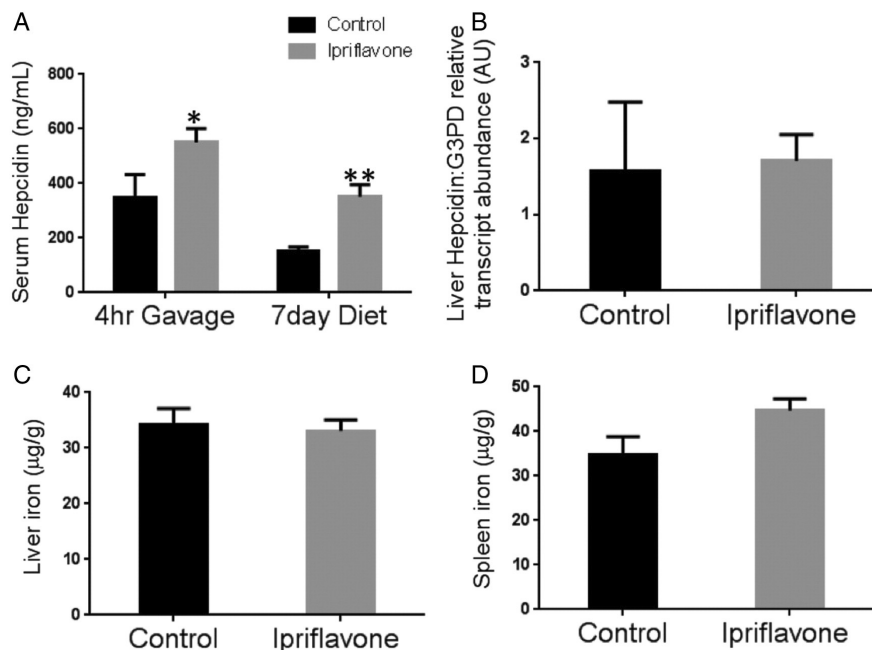


Fig. 1. Treatment with ipriflavone increases serum hepcidin levels in wild-type mice. Four-week old C57/BL6 mice received an iron-sufficient diet (35 mg of iron/kg of food) for 1 week and then underwent a single gavage of ipriflavone (120 mg/kg in 90% PBS/10% DMSO) or vehicle alone. The mice then continued the iron-sufficient diet with or without ipriflavone (500 mg/kg of food) for 7 days. (A) Serum hepcidin levels of WT mice after a single gavage treatment or after 7 day dietary treatment with ipriflavone. (B–D) Evaluation of RNA transcript levels for liver *hepcidin* (B) and nonheme iron quantification of the liver (C) and spleen (D) after 7 days of dietary supplementation with ipriflavone (500 mg/kg of food). *N* = 7–8 mice per group. * signifies *p* = 0.05, while ** signifies *p* = 0.001 by Student's *t*-test compared to 0 mg/kg control group.

elemental iron (220 mg iron/kg food), supplemented with 0, 250, 500, and 750 mg ipriflavone/kg food. The WT mice achieved mean daily doses of 0, 56.30 ± 2.71, 104.0 ± 6.28, and 186 ± 14.4 mg of ipriflavone per kg of body weight, while the Th3 +/– mice, which ate more than the WT mice but gained less weight, ingested mean doses of 0, 108.9 ± 3.25, 151.4 ± 7.07, or 322.3 ± 10.3 mg of ipriflavone per kilogram of body weight (Supplementary Table 2).

We found that dietary supplementation with ipriflavone decreased liver nonheme iron stores (Fig. 2A, B) in WT mice. We observed a significant decrease in hepatic iron stores of WT mice treated with ipriflavone at 500 mg/kg or at 750 mg/kg, compared to those that did not receive ipriflavone supplementation (39.2 ± 2.06 and 44.1 ± 2.58 µg iron/g tissue, respectively, compared to 57.8 ± 3.39 µg iron/g tissue, $p = 0.003$ and $p = 0.012$, respectively). In contrast, spleen iron concentration did not change significantly with ipriflavone treatment. Blinded evaluation of diaminobenzidine (DAB)-enhanced Perls' staining (Fig. 2C, D), also revealed a decrease in hepatic iron stores in WT mice treated with ipriflavone 500 mg/kg or 750 mg/kg.

To evaluate whether ipriflavone is effective at relieving iron overload in a mouse model of thalassemia, we treated Th3 +/– mice with the same regimens that we had used in the WT mice. The untreated Th3 +/– mice exhibited levels of liver and spleen iron of 286.8 ±

41.24 and 1565 ± 86.87 µg iron/mg of tissue, respectively (Fig. 3A, B), which were nearly 5-fold greater than untreated WT liver iron and nearly 6-fold greater than WT spleen iron levels. Treatment with ipriflavone at 250–750 mg/kg failed to reduce significantly the mean level of iron loading in the liver ($p = 0.379$) or spleen ($p = 0.824$) or the extent of liver iron staining (Fig. 3C, D).

Th3 +/– mice have previously been shown to exhibit high levels of intestinal fpn [5], which contributes to the development of iron overload. In fact, we found that Th3 +/– mice exhibit high levels of fpn expression even in the distal small intestine, where fpn expression is usually low (Supplementary Fig. 1, Fig. 4A, B). Enterocyte fpn expression in WT mice declined with increasing ipriflavone dosage (60% of mouse intestines were strongly stained at 0 mg/kg, compared to 33% at 500 mg/kg and 20% at 750 mg/kg), while the intensity of fpn staining in Th3 +/– mice decreased slightly at 500 mg/kg and 750 mg/kg, but remained much higher than in WT mice treated with equivalent doses of ipriflavone (Fig. 4A, B).

3.3. Ipriflavone's effect on erythropoiesis

To evaluate the effect of ipriflavone on erythropoiesis in WT and Th3 +/– mice, we measured the hemoglobin level, hematocrit, mean

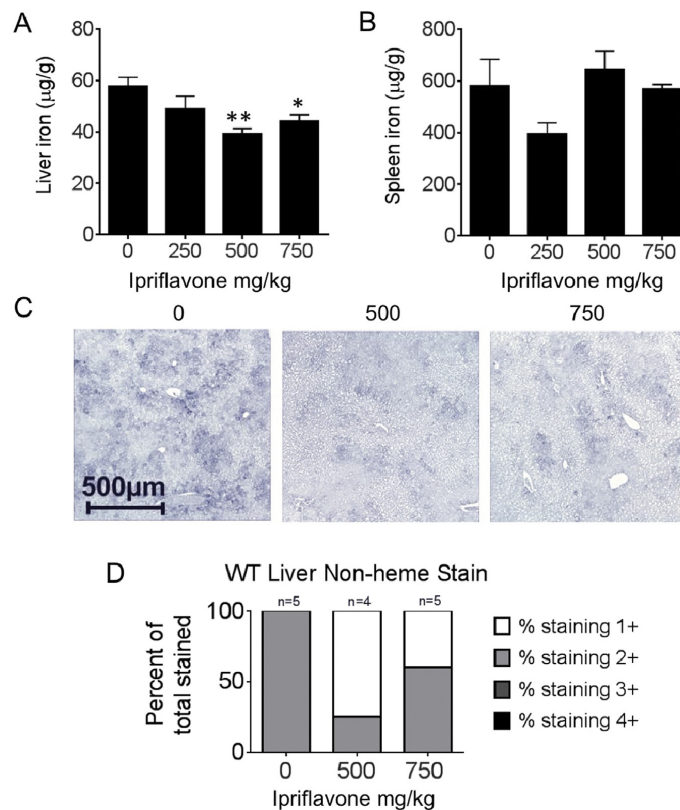


Fig. 2. Dietary supplementation with ipriflavone decreased hepatic iron stores in wild type mice. C57/BL6 mice received diets supplemented with ipriflavone in mg/kg of food at the following doses: 0 mg/kg ($n = 5$), 250 mg/kg ($n = 5$), 500 mg/kg ($n = 4$), and 750 mg/kg ($n = 5$) starting at 5 weeks of age for a total of 50 days followed by tissue harvest for quantification of nonheme iron levels in the liver (A) and spleen (B), reported as µg iron per g of tissue. Data shown are means ± standard errors. By Kruskal–Wallis test, $p = 0.027$ for liver comparisons and 0.099 for spleen comparisons. * signifies $p < 0.05$, while ** signifies $p < 0.01$ by Student's t -test compared to 0 mg/kg controls. (C) Diaminobenzidine (DAB)-enhanced Perls' staining for nonheme iron in liver tissue. (D) Blind analysis was used to score the staining levels of each slide from 1+ (weak) to 4+ (strong).

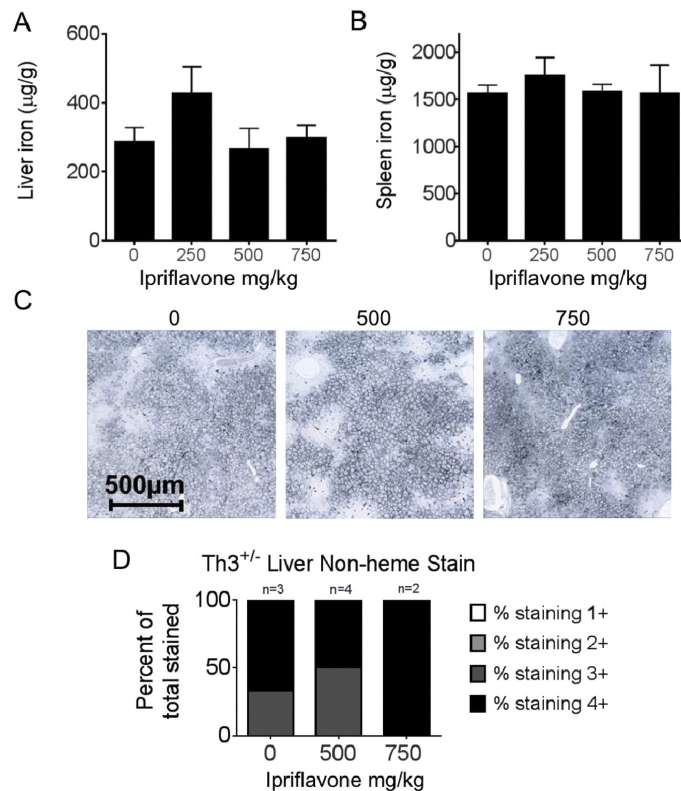


Fig. 3. Dietary supplementation with ipriflavone did not decrease iron stores in the livers or spleens of Th3^{+/-} mice. Th3^{+/-} mice on a C57/BL6 background received diets supplemented with ipriflavone in mg/kg of food at the following doses: 0 mg/kg ($n = 3$), 250 mg/kg ($n = 3$), 500 mg/kg ($n = 4$), and 750 mg/kg ($n = 2$) starting at 5 weeks of age for a total of 50 days followed by tissue harvest for quantification of nonheme iron levels in the liver (A) and spleen (B), reported as µg iron per g of tissue. Data shown are means \pm standard errors. $p = 0.379$ by Kruskal-Wallis for liver comparisons and 0.824 for spleen comparisons. (C) Diaminobenzidine (DAB)-enhanced Perls' staining for nonheme iron in liver tissue. (D) Blind analysis was used to score the staining levels from 1+ (weak) to 4+ (strong).

corpuscular volume (MCV), and reticulocyte percentage (Fig. 5A-D). Interestingly, in WT mice, the mean MCV decreased significantly with ipriflavone treatment at all doses, from 59.86 ± 0.29 untreated, to 58.7 ± 0.41 at 250 mg/kg, 56.83 ± 0.67 at 500 mg/kg, and 58.26 at 750 mg/kg ($p = 0.049$, 0.003 , and 0.019 , respectively, in comparison to untreated). The reticulocyte percentage decreased significantly at the highest dose of ipriflavone (750 mg/kg) from 3.1 ± 0.16 to 1.9 ± 0.15 ($p = 0.001$), suggesting a toxic effect at this high dose. We found that Th3^{+/-} mice exhibited a phenotype consistent with ineffective erythropoiesis that was not altered by ipriflavone treatment. The Th3^{+/-} mice exhibited lower hemoglobin and hematocrit levels and erythrocyte mean corpuscular volumes (MCVs) than WT mice, while their reticulocyte percentages were consistently higher than WT mice (Fig. 5A-D).

To determine whether ipriflavone has any effect on the distribution of erythroid progenitors in Th3^{+/-} mice, we performed fluorescence-activated cell sorting (FACS) for CD71 and Ter119 to identify immature and mature erythroid populations in the bone marrow and spleens. We found no significant effect of ipriflavone treatment on the percentage of erythroid progenitor cells or mature erythrocytes in the bone marrow or spleen in Th3^{+/-} mice (Supplementary Fig. 2).

3.4. Ipriflavone's effect on hepcidin, DMT1, *fpn*, and erythroferrone transcript levels and transferrin-dependent iron uptake

To assess the effect of ipriflavone on gene transcription, we evaluated liver hepcidin transcript levels and intestinal transcript levels of the iron transporters, *DMT1* and *fpn*. The liver *hepcidin:G3PD* transcript levels did not change significantly between treated and untreated mice. The Th3^{+/-} mice exhibited higher *hepcidin* transcript levels than WT mice whether treated with ipriflavone or not (Fig. 6A). Treatment with ipriflavone 250 or 500 mg/kg, however, significantly increased the ratio of hepatic *hepcidin* transcript levels to liver iron stores in WT mice (Fig. 6B) (0.024 ± 0.003 and 0.02 ± 0.002 , respectively, compared to 0.017 ± 0.001 , $p = 0.049$ and $p = 0.021$, respectively). Transcript levels for intestinal *DMT1* decreased significantly at 750 mg/kg in WT mice (0.632 ± 0.04 vs 1.04 ± 0.11 , $p = 0.017$), but were otherwise unaffected in both WT and Th3^{+/-} mice at all doses of ipriflavone. To determine if ipriflavone affected the transcript levels of the recently identified hormone, *erythroferrone*, we measured transcript levels in the spleens of the treated and untreated Th3^{+/-} mice, but found no significant difference in expression ($p = 0.96$) (Supplementary Fig. 3). We also considered that ipriflavone may be lowering hepatic iron stores

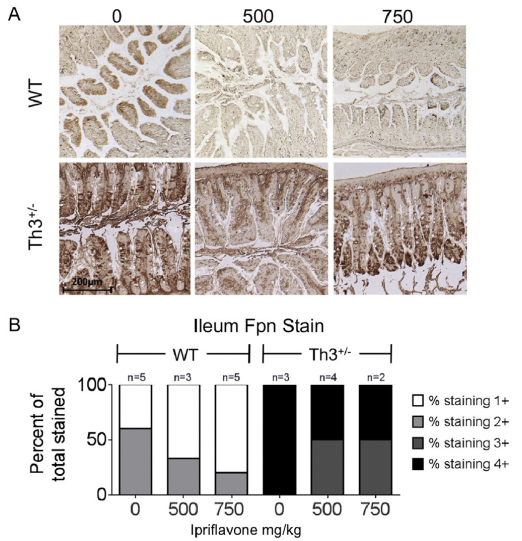


Fig. 4. Dietary supplementation with ipriflavone decreased intestinal *fpn* protein expression in WT mice. A. Representative immunohistochemical staining for *fpn* in cross-sections of intestine from WT and Th3^{+/-} mice treated with ipriflavone: 0, 500, or 750 mg/kg of food. B. Blinded evaluation of staining intensity from 1+ (weak) to 4+ (strong) staining.

by interfering with transferrin-dependent iron uptake by hepatocytes. To evaluate this hypothesis, we co-treated human hepatocytes, hepG2 cells, with ipriflavone and ⁵⁵Fe-transferrin for 4 h. We found no

significant difference in ⁵⁵Fe-transferrin uptake in ipriflavone-treated cells compared to cells treated with vehicle only ($p = 0.46$) (Supplementary Fig. 4).

4. Discussion

In this study we evaluated the *in vivo* effects of ipriflavone, an orally available synthetic flavone, that we recently identified as a potent inducer of *hepcidin* expression in a high throughput screen in human hepatocytes (HepG2 cells) for small molecules that regulate *hepcidin* expression [11,12]. In the current study, we found that oral administration of ipriflavone by gavage or dietary supplementation increased serum *hepcidin* levels (Fig. 1). We also found that dietary supplementation with ipriflavone for 50 days lowered hepatic iron stores and increased *hepcidin* transcript levels relative to liver iron stores in WT, but not Th3^{+/-} mice, which are a mouse model of thalassemia intermedia. The Th3^{+/-} mice actually ingested more ipriflavone per kg of body mass than WT mice (Supplementary Table 2), but also ingested more iron per kg from their diet. Furthermore, baseline hepatic *hepcidin* expression was higher in the Th3^{+/-} mice than the WT mice, thus the Th3^{+/-} mice may require a stronger *hepcidin* inducer than ipriflavone.

The decrease in intestinal *fpn* protein expression in WT mice treated with ipriflavone 500 mg/kg may be secondary to the increase in the ratio of *hepcidin* transcript level to iron stores, however recent studies indicate that *fpn* down-regulation can occur in a *hepcidin*-independent manner. In mice, stimulation of toll-like receptors (TLR2 or 6) reduces *fpn* transcript and protein expression in macrophages, liver, and spleen without increasing macrophage *hepcidin* expression [17]. However, unlike the model of TLR-stimulation, we did not observe a decrease in intestinal *fpn* transcript levels with ipriflavone treatment (Fig. 6), thus we do not think that ipriflavone's effect is caused by TLR-stimulation. We did observe a decrease in intestinal *DMT1* expression

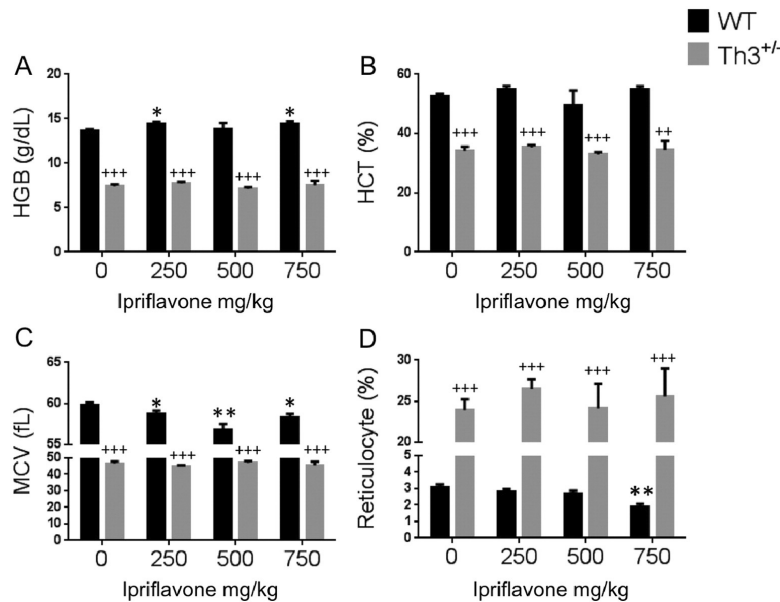


Fig. 5. Ipriflavone treatment decreased mean corpuscular volume (MCV) in wild type mice. Erythrocyte indices for WT and Th3^{+/-} mice after 50 days of treatment with ipriflavone 0–750 mg/kg of food. A. Hemoglobin measurements in g/dL, B. Hematocrit, C. MCV, D. Reticulocyte percentage. * denotes $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ for WT treated vs WT untreated. ++ denotes $p < 0.01$ and +++ denotes $p < 0.001$ for Th3^{+/-} vs WT untreated.

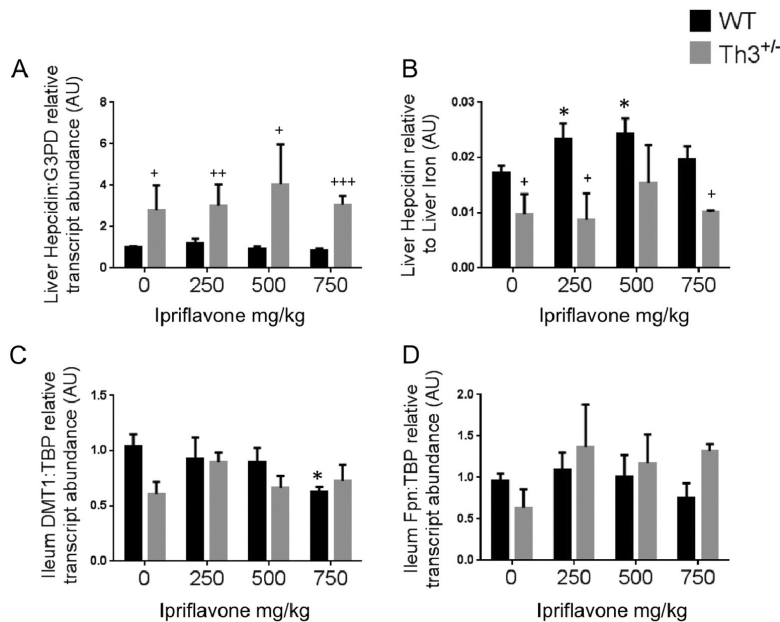


Fig. 6. Ipriflavone treatment increased the ratio of hepcidin transcript level to liver iron level in WT mice. Evaluation of RNA transcript levels for liver hepcidin (A), ratio of liver hepcidin to liver non-heme iron stores (B), intestinal *DMT1* expression (C), and intestinal *fpn* expression (D) for mice treated for 50 days with ipriflavone 0–750 mg/kg of food. * denotes $p < 0.05$ for WT treated vs WT untreated. + denotes $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$, and +++ denotes $p < 0.001$ for Th3^{+/-} vs WT untreated.

in WT mice treated with ipriflavone at the 750 mg/kg dose. This may have helped to limit intestinal iron absorption in these animals.

While ipriflavone structurally resembles estradiol, ipriflavone was effective in WT male mice (Figs. 1, 2), thus it does not appear that ipriflavone requires feminine gender for its effect. Ipriflavone is known to have effects that are independent of estrogen-receptor, as it has been shown to inhibit osteoclast activity by increasing intracellular calcium levels [18] in an effect that is not antagonized by estradiol treatment [19]. We have previously shown that estradiol does not induce *hepcidin* expression in vitro [12], while others have shown that estradiol inhibits *hepcidin* transcription [20], thus we think it is unlikely that ipriflavone is increasing *hepcidin* expression in an estrogen-receptor dependent manner.

Other investigators have been seeking to treat iron overload in mouse models by daily injection of minihepcidins, chemically stabilized derivatives of hepcidin, in hepcidin-knockout mice [8]. Injection of a minihepcidin, PR65, in hepcidin knockout mice caused a more profound reduction in liver iron stores than we observed with ipriflavone treatment in WT mice. Treatment with PR65 was accompanied by a decrease in hemoglobin level and an increase in splenic iron, which is consistent with iron-restricted erythropoiesis [8]. While ipriflavone treatment in WT mice did not produce anemia or a significant increase in splenic iron, we found that it was associated with a modest decrease in erythrocyte mean corpuscular volume (MCV) (Fig. 5C) that could be associated with mildly iron-restricted erythropoiesis. Interestingly, pre-loading *hepcidin*-knockout mice with iron and then treating with minihepcidins was less effective at reducing liver iron stores than treating the mice while they simultaneously received the high iron diet [8]. By 5 weeks of age, when we started ipriflavone as a *hepcidin* inducing treatment, Th3^{+/-} mice may already be “pre-loaded” with iron, as well.

We are intrigued by the fact that ipriflavone did not significantly increase the absolute *hepcidin* transcript levels or reduce the hepatic iron

stores in the Th3^{+/-} mice. The hormone, erythropoietin, has recently been identified as an erythropoietic iron sensor that suppresses *hepcidin* expression in the Th3^{+/-} mouse model of thalassemia [21]. We found that erythropoietin (*ERFE*) transcript levels did not change in Th3^{+/-} mice in response to ipriflavone treatment (Supplementary Fig. 3). It may be necessary to find a small molecule or combination of molecules that can suppress *ERFE* activity in order to increase *hepcidin* expression further in Th3^{+/-} mice. Ideally, a small molecule treatment for iron overload would confer antioxidant effects, as retinoids appear to do [22], suppress intestinal expression of hypoxia inducible factor 2 alpha (*HIF2α*), which can stimulate intestinal iron absorption in mouse models of thalassemia [23], and not disrupt the transcriptional program that is characteristic of enterocyte differentiation [24]. In future experiments, we hope to identify more potent, yet nontoxic, small molecule *hepcidin* inducers that could be used in combination with iron chelators to treat thalassemia-related iron overload more effectively.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmd.2016.05.004>.

Acknowledgements

This research was supported by R01 DK085250, R01 GM083198, and the Basil O'Connor Scholar Award of the March of Dimes Birth Defects Foundation (PGF). The funding agencies did not influence the design or interpretation of the studies. We would like to thank Prof. Seth Alper, Beth Israel Deaconess Medical Center, for providing the *Hbb*^{Th3^{+/-}} mouse strain.

References

- [1] D. Rund, E. Rachmilewitz, Beta-thalassemia, *N. Engl. J. Med.* 353 (11) (2005) 1135–1146.
- [2] X. Gu, Y. Zeng, A review of the molecular diagnosis of thalassemia, *Hematology* 7 (4) (2002) 203–209.

- [3] C. Borgna-Pignatti, et al., Survival and disease complications in thalassemia major, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 850 (1998) 227–231.
- [4] C. Borgna-Pignatti, et al., Survival and complications in patients with thalassemia major treated with transfusion and deferoxamine, *Haematologica* 89 (10) (2004) 1187–1193.
- [5] S. Gardenghi, et al., Ineffective erythropoiesis in beta-thalassemia is characterized by increased iron absorption mediated by down-regulation of hepcidin and up-regulation of ferroportin, *Blood* 109 (11) (2007) 5027–5035.
- [6] G. Papanikolaou, et al., Hepcidin in iron overload disorders, *Blood* 105 (10) (2005) 4103–4105.
- [7] G. Nicolas, et al., Constitutive hepcidin expression prevents iron overload in a mouse model of hemochromatosis, *Nat. Genet.* 34 (1) (2003) 97–101.
- [8] E. Ramos, et al., Minihepcidins prevent iron overload in a hepcidin-deficient mouse model of severe hemochromatosis, *Blood* 120 (18) (2012) 3829–3836.
- [9] M.J. Cunningham, et al., Complications of beta-thalassemia major in North America, *Blood* 104 (1) (2004) 34–39.
- [10] J.C. Wood, et al., The effect of deferasirox on cardiac iron in thalassemia major: impact of total body iron stores, *Blood* 116 (4) (2010) 537–543.
- [11] V. Gaun, et al., A chemical screen identifies small molecules that regulate hepcidin expression, *Blood Cells Mol. Dis.* 53 (4) (2014) 231–240.
- [12] A.W. Zhen, et al., The small molecule, genistein, increases hepcidin expression in human hepatocytes, *Hepatology* 58 (4) (2013) 1315–1325.
- [13] J. Wu, Y. Zhu, J. Wu, Effects of estrogen and estrogenic compounds on cognition in ovariectomized rats, *Climacteric* 11 (3) (2008) 212–220.
- [14] X. Zhang, et al., Effects of ipriflavone on postmenopausal syndrome and osteoporosis, *Gynecol. Endocrinol.* 26 (2) (2010) 76–80.
- [15] J.M. Delarmelina, J.C. Dutra, C. Batitucci Mdo, Antimutagenic activity of ipriflavone against the DNA-damage induced by cyclophosphamide in mice, *Food Chem. Toxicol.* 65 (2014) 140–146.
- [16] P.G. Fraenkel, et al., Ferroportin1 is required for normal iron cycling in zebrafish, *J. Clin. Invest.* 115 (6) (2005) 1532–1541.
- [17] C. Guida, et al., A novel inflammatory pathway mediating rapid hepcidin-independent hypoferrremia, *Blood* 125 (14) (2015) 2265–2275.
- [18] C.V. Albanese, et al., Ipriflavone directly inhibits osteoclastic activity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199 (2) (1994) 930–936.
- [19] A. Miyauchi, et al., Novel ipriflavone receptors coupled to calcium influx regulate osteoclast differentiation and function, *Endocrinology* 137 (8) (1996) 3544–3550.
- [20] Q. Yang, et al., 17beta-estradiol inhibits iron hormone hepcidin through an estrogen responsive element half-site, *Endocrinology* 153 (7) (2012) 3170–3178.
- [21] L. Kautz, et al., Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism, *Nat. Genet.* 46 (7) (2014) 678–684.
- [22] H. Tsuchiya, et al., Suppressive effects of retinoids on iron-induced oxidative stress in the liver, *Gastroenterology* 136 (1) (2009) 341–350 (e8).
- [23] E.R. Anderson, X. Xue, Y.M. Shah, Intestinal hypoxia-inducible factor-2alpha (HIF-2alpha) is critical for efficient erythropoiesis, *J. Biol. Chem.* 286 (22) (2011) 19533–19540.
- [24] F. Wang, et al., Normalizing genes for real-time polymerase chain reaction in epithelial and nonepithelial cells of mouse small intestine, *Anal. Biochem.* 399 (2) (2010) 211–217.

6. Conclusões

- ✓ **OBJETIVO ESPECÍFICO 1:** Registrar os valores de ferritina sérica em uma coorte de pacientes brasileiros com a DG, correlacionando-os com variáveis clinicolaboratoriais de relevância para o manejo da doença.

- ✓ **OBJETIVO ESPECÍFICO 2:** Quantificar a concentração sérica da fração glicosilada da ferritina, correlacionando-a com sua contrapartida não-glicosilada e com variáveis clinicolaboratoriais de relevância, de maneira a refinar o entendimento da sua utilidade como biomarcador.

CONCLUSÃO:

Em relação aos objetivos específicos 1) e 2), embora com resultados controversos e sem definição absoluta sobre o tipo de biomarcação que pode exercer, a concentração elevada de ferritina sérica já era bem documentada em coortes de pacientes com DG de diferentes *backgrounds* genéticos. Em nosso trabalho, nós documentamos, pela primeira vez em pacientes brasileiros com a DG, os níveis elevados de ferritina sérica, corroborando os achados prévios de coortes internacionais. Em nossa investigação sobre sua utilidade como biomarcador, nós mostramos que aproximadamente 80% dos pacientes apresentam hiperferritinemia no período que antecede o início da implementação da terapia-padrão. Registramos ainda que a ferritina sérica, após um tempo mediano de 28 meses de tratamento, apresentou uma redução estatisticamente significativa dos seus níveis séricos da ordem de 30%, acompanhada de melhora clínica e laboratorial da grande maioria dos parâmetros de gravidade da doença (embora a ferritina sérica em si não tenha se correlacionado com nenhum parâmetro de gravidade). Nossa conclusão, portanto, aponta a ferritina sérica como um excelente biomarcador de resposta ao tratamento, ao mesmo tempo em que pode atuar como um biomarcador de auxílio na investigação diagnóstica. Não recomendamos seu uso para inferir gravidade da doença. No pertinente à fração glicosilada, – a qual tinha sido sugerida anteriormente por Stirnemann *et al.* (2011) como um biomarcador superior à ferritina total na DG – nós não observamos qualquer diferença, tanto em relação ao

tratamento quanto em relação a subgrupos, não apresentando também nenhuma correlação com parâmetros de gravidade. Uma vez que nós fomos apenas o segundo grupo a analisar a ferritina glicosilada (com resultados discordantes do estudo publicado anteriormente), concluímos que novos estudos são necessários sobre o tema. Com efeito, estudos realizados em amostras maiores (no âmbito do *Gaucher Registry*, por exemplo) serão úteis em apontar o papel da ferritina glicosilada como biomarcador da DG (se superior ou inferior à ferritina total).

- ✓ **OBJETIVO ESPECÍFICO 3:** Registrar os valores de β_2 -microglobulina sérica em uma coorte de pacientes com a DG, correlacionando-os com variáveis clinicolaboratoriais de relevância para o manejo da doença, no intuito de apontar o seu papel como biomarcador na DG.

CONCLUSÃO:

Em relação à proposição da β_2 -microglobulina como biomarcador da DG, nós descrevemos, pela primeira vez em uma coorte de pacientes, que a β_2 -microglobulina encontra-se frequentemente elevada em pacientes com a DG. Além disso, mostramos que seus níveis se correlacionam com parâmetros de gravidade e que a terapia-padrão é capaz de reduzir seus níveis de maneira consistente. A elevação observada em nossa coorte foi mais pronunciada nos indivíduos que não estavam em vigência de tratamento (entre os quais as variáveis de gravidade estavam claramente mais alteradas do que entre os indivíduos que já vinham recebendo tratamento). Ainda nesses indivíduos, após a implementação do tratamento para a doença, não somente a β_2 -microglobulina se reduziu de maneira consistente, como também as variáveis de gravidade melhoraram. Com esse trabalho, portanto, nós mostramos de maneira clara e segura que a β_2 -microglobulina pode ser um marcador de resposta ao tratamento e um marcador de gravidade da doença. Por outro lado, não assinalamos relevância desse biomarcador, com os nossos dados, para o diagnóstico da doença. No entanto, trabalhos em coortes de com tamanho amostral superior serão necessárias para corroborar nossos achados.

- ✓ **OBJETIVO ESPECÍFICO 4:** Quantificar a concentração sérica de hepcidina, correlacionando os seus níveis com variáveis clinicolaboratoriais de relevância e estabelecendo-a, assim, como biomarcador da DG.

CONCLUSÃO:

No que tange a sugestão da hepcidina sérica como biomarcador na DG, nós fomos o terceiro grupo a estudar seus níveis séricos no contexto da DG. Contudo, nosso tamanho amostral foi 4 vezes maior do que o estudo espanhol de Medrano-Engay *et al.* (2014) e 3 vezes maior do que o estudo sueco de Lorenz *et al.* (2016). Esse fato nos proporcionou mais poder estatístico para mostrar que os níveis séricos de hepcidina encontram-se frequentemente elevados nos pacientes com DG (1,6 vezes acima do limite de referência para a população normal). Além disso, após um intervalo mediano de 3,81 anos, os níveis séricos de hepcidina ficaram reduzidos pela metade, juntamente com uma melhora global dos parâmetros de gravidade. Nos indivíduos inicialmente sem tratamento ($n=7$), a redução após o início da terapia-padrão foi muito mais pronunciada (mediana 76,7 vs. 12,6 ng/mL; $p=0,016$) do que considerando a amostra completa (contendo indivíduos inicialmente já em vigência de tratamento). Não houve diferença entre subgrupos. Na correlação da hepcidina sérica com variáveis de gravidade, nós montamos um modelo de regressão (que controla o efeito das demais variáveis inseridas no modelo) que apontou relevância estatística para quitotriosidase e alanina aminotransferase. Em suma, com os dados obtidos, nós mostramos que a hepcidina pode ser, de maneira consistente, um biomarcador de resposta ao tratamento. Nosso trabalho não a suportou como biomarcador de gravidade e ou de diagnóstico.

- ✓ **OBJETIVO ESPECÍFICO 5:** Quantificar a concentração sérica de IL-6, correlacionando-a com os valores obtidos de hepcidina, ferro sérico, saturação de transferrina, ferritina sérica e índices hematimétricos, de modo a sugerir o mecanismo etiológico da anemia observada na DG e a sugerir o ferro como fator modificador relevante na DG.

CONCLUSÃO:

No pertinente aos mecanismos responsáveis pela hiperhepcidinemia observada em nossa coorte e às possíveis consequências dela decorrentes, nós avaliamos a IL-6 (interleucina clássica e que é reconhecidamente um potente indutor da expressão de hepcidina), juntamente com variáveis do perfil do ferro e dos índices hematimétricos. Nós mostramos que, após um período sob vigência tratamento, a redução nos níveis de hepcidina (descrita no parágrafo anterior) foi acompanhada de: a) redução importante dos níveis de IL-6 sérica, b) aumento do VCM, c) aumento da saturação de transferrina e d) aumento do ferro sérico (além da melhora global dos parâmetros da DG, como já comentado). Tendo em vista o papel fisiológico central que a hepcidina desempenha na absorção, reciclagem e utilização do ferro, nossos dados são consistentes com a noção de que o estado inflamatório presente na DG, o qual é ampla e reconhecidamente documentado na literatura (representado e atestado em nosso trabalho pela IL-6), contribui decisivamente para a expressão aumentada de hepcidina nesses pacientes. Nesse contexto, níveis sustentadamente elevados de hepcidina ocasionam hipoferremia (atestada pelos valores dos dois parâmetros do ferro) e a consequente redução do aporte de ferro para a eritropoiese medular, levando a microcitose (VCM) e anemia. Sabendo que a hepcidina se liga à ferroportina (único transportador conhecido que exporta ferro do meio intra para o extracelular), internalizando-a e inutilizando-a, compreende-se a tendência de os macrófagos reterem ferro nas anemias inflamatórias (King & Weiss, 2014; Fraenkel 2014, 2015) e compreende-se também porque as CG apresentam acúmulo de ferro já documentado histologicamente desde a década de 1960. Logicamente, portanto, mesmo que haja hipoferremia, não há ferropenia verdadeira. Pelo contrário, a tendência é o acúmulo tecidual de ferro, especialmente nos macrófagos (como comentado acima) e outras células fagocíticas em tecidos diversos. Esse paradoxo tem sido nomeado como ferropenia funcional no contexto das anemias inflamatórias (Fraenkel 2014; 2015). Tendo em mente o papel central da hepcidina, fica claro pelos nossos dados que o quadro global tende a ser revertido ao longo do tratamento (tratamento reduz glicoesfingolipídios, que reduz o estado inflamatório, que reduz a hepcidina, que libera o ferro tecidual e que, por fim, favorece a eritropoiese, aumentando o VCM, incrementando a hemoglobina e corrigindo a anemia quando presente). Nesse sentido, nosso trabalho consegue sugerir o mecanismo etiológico da anemia na DG (uma das alterações laboratoriais mais prevalentes da doença) como sendo uma anemia inflamatória (desaconselhamos o termo anemia de doença crônica. Ver Fraenkel, 2014 e 2015 para uma revisão a respeito do assunto). Esse entendimento, embora de senso comum no âmbito da DG,

nunca tinha sido averiguado clinicamente de maneira simultânea com a hepcidina e com os principais atores que atuam no mecanismo fisiopatológico da anemia inflamatória. Até então, a etiologia da anemia era considerada como sendo multifatorial por natureza, sendo atribuída a etiologias tão diversas quanto hiperesplenismo, infiltração medular com CG e deficiência absoluta de ferro (Hughes *et al.*, 2007). Na esteira desse mecanismo proposto, fica claro que o ferro pode ser um fator modificador importante na DG. Os efeitos deletérios que o ferro intracelular exerce quando são ultrapassadas a capacidade de tamponamento são bem estabelecidos. Diversos tipos de neoplasias e de doenças neurodegenerativas têm acúmulo de ferro intracelular demonstrado em modelos *in vitro*, *in vivo* e mesmo em humanos, por meio de técnicas de quantificação indireta de ferro. Na DG, mesmo que a terapia-padrão apresente efeito em reduzir o estado inflamatório e os níveis circulantes de hepcidina, o dano que o ferro intracelular em excesso pode causar enquanto o indivíduo não está em tratamento é preocupante. Logo, parece razoável hipotetizar que tais danos de estresse oxidativo podem se somar ao longo da vida do indivíduo e, combinado com outros fatores genéticos e ambientais, pode ser responsável pela prevalência aumentada de casos de neoplasia e de neurodegeneração na DG. Nesse sentido, indivíduos que não preenchem critérios para a implementação da terapia-padrão já poderiam estar em risco para desfechos negativos da doença a longo prazo. Reconhecendo o ferro como fator modificador da DG, novas terapias que modulem a expressão de hepcidina poderiam ter grande impacto nos desfechos comentados anteriormente.

- ✓ **OBJETIVO ESPECÍFICO 6:** Realizar um *screening in vitro* para moléculas pequenas que possam atuar como moduladores farmacológicos da expressão de hepcidina, utilizando hepatócitos humanos.

CONCLUSÃO:

Em relação a potenciais moduladores sintéticos da expressão de hepcidina, durante o período sanduíche, foi realizada triagem de moléculas pequenas quanto ao seu potencial de influenciar a expressão de hepcidina (aproximadamente 100 drogas candidatas) em um sistema *reporter* construído em hepatócitos humanos transfectados com um plasmídeo contendo a região promotora do gene da hepcidina e o gene da fluoresceína. As drogas candidatas eram então aplicadas às

células contendo esse constructo e avaliadas espectrofotometricamente para absorvância e fluorescência, o que nos informava sobre viabilidade celular (absorvância – observação dos efeitos tóxicos da droga-teste) e a expressão de fluoresceína (mimetizando a transcrição do gene da hepcidina) (ver trabalhos prévios da professora Paula Fraenkel para detalhes sobre o constructo e a estratégia do *screening*). Dentre as drogas triadas durante período sanduíche, aproximadamente 13 delas mostraram efeito expressivo na triagem inicial – tanto para estimular ou suprimir a expressão de hepcidina – e foram submetidas a testes *downstream*, como quantificação de mRNA de hepcidina, ferritina, ferroportina e outros genes do metabolismo do ferro; quantificação proteica dos mesmos alvos por meio de *Western Blots*; quantificação do conteúdo de ferro intracelular, entre outros. Esses testes *downstream* tem o objetivo de confirmar os resultados obtidos no sistema *reporter*. Contudo, essas drogas candidatas ainda não foram testadas *in vivo* e estão atualmente em fase de testagem, motivo pelo qual encontram-se sob sigilo de patente enquanto a investigação está em andamento. Como os resultados não estão publicados ainda, o sigilo de patente não nos autoriza a expor dados preliminares nessa tese. No entanto, há a previsão de que os dados gerados estejam disponíveis e publicados no primeiro semestre de 2018.

- ✓ **OBJETIVO ESPECÍFICO 7:** Testar os efeitos *in vivo* de uma molécula pequena candidata a moduladora farmacológica da expressão de hepcidina.

CONCLUSÃO:

O passo mais concreto em direção a uma droga moduladora da hepcidina foi dado quando da testagem *in vivo* do flavonoide ipriflavona. Em um *screening* prévio, o grupo da professora Paula Fraenkel identificou a ipriflavona como sendo um potente indutor da expressão de hepcidina e, portanto, uma droga potencial para tratar estados deficitários de hepcidina (o oposto da DG, como demonstrado nessa tese de doutoramento), como por exemplo hemocromatose e β -Talassemia. Os experimentos *in vivo* em camundongos selvagens e num modelo de β -Talassemia *intermedia* durante o período sanduíche evidenciaram que a ipriflavona (administrada como suplemento nutricional) não altera a sobrecarga tecidual de ferro, nem a expressão de hepcidina e eritroferrona no modelo de β -Talassemia. No entanto, nos animais com genótipo selvagem, o tratamento com ipriflavona (seja por gavagem ou como aditivo alimentar) teve um efeito

combinado de aumentar os transcritos hepáticos de hepcidina, de aumentar os níveis séricos de hepcidina, de reduzir a sobrecarga hepática de ferro (induzida previamente por dieta enriquecida em ferro) e de diminuir a expressão intestinal de ferroportina. Os nossos dados claramente apontam para uma droga potencial, com efeito importante *in vitro* e *in vivo*. No entanto, não foi observado qualquer efeito da ipriflavona no modelo de β -Talassemia utilizado, o que motiva novos estudos, com desenhos experimentais otimizados e/ou com modelos de β -Talassemia e de hemocromatose alternativos.

Em suma, essa tese de doutoramento apontou dois novos biomarcadores para uso no seguimento clínico dos pacientes com DG, sugeriu que o ferro pode ser um fator modificador importante na DG, identificou o flavonoide ipriflavona como sendo um potencial agonista farmacológico da expressão de hepcidina, que pode vir a ser útil no tratamento de doenças como β -Talassemia e hemocromatose, e abriu o caminho para o desenvolvimento de uma plataforma de identificação de novos fármacos em modelos *in vitro* de DG.

7. Perspectivas Futuras

Por sua dupla função de ter utilidade clínica e servir para revelar mecanismos patofisiológicos adicionais, a linha de pesquisa com biomarcadores é muito promissora no âmbito da DG, como já foi extensivamente abordado nessa tese. Nosso grupo dispõe de todo *know-how* para seguir essa linha de pesquisa e seguir propondo novos biomarcadores da DG e aprofundando a compreensão fisiopatológica da doença. No entanto, devido a limitações em nossa amostra, algumas questões remanescentes em relação aos biomarcadores propostos aqui (como, por exemplo, a respeito da utilidade da ferritina glicosilada) deverão ser avançadas em estudos de coorte maiores (por exemplo, utilizando dados do *Gaucher Registry*), o que fornecerá o tamanho amostral para se poder atingir o poder estatístico necessário para responder as perguntas não adequadamente endereçadas nesse trabalho.

Em relação à hepcidina e ao metabolismo do ferro, sem dúvida há muitos pontos a serem continuados em nosso grupo de pesquisa. Por exemplo: contida no projeto de doutorado original, mas abandonada por questões de custo, a quantificação de ferro tecidual hepático, cardíaco e nervoso – por meio de ressonância magnética nuclear – é uma perspectiva futura bem imediata de

continuidade deste trabalho. O dado quantitativo do ferro tecidual, comparado com os dados de subtipo da DG (i.e., tipo 3, que tem sintomas neurológicos), de gravidade dos sintomas neurológicos, de marcadores de neurodegeneração (ou casos de Parkinson e de demência, por exemplo), de marcadores neoplásicos (ou casos de câncer documentados, por exemplo), de hepcidina, dos índices do ferro, entre outros serão vitais para o avanço da tese proposta nesse trabalho de que o ferro é um fator modificador da DG. Do ponto de vista logístico, o projeto está escrito e orçado, com parceria firmada com o setor de radiologia do HCPA, o qual dispõe dos equipamentos e do software para proceder as quantificações nos pacientes com DG.

Outro desdobramento imediato dessa tese de doutoramento é o estabelecimento de uma linha de pesquisa *in vitro*, composta de CG e/ou células colhidas de pacientes com DG e/ou ainda um modelo celular de Gaucher criado por engenharia genética (todas as três possibilidades são viáveis, já tendo protocolos e trabalhos publicados sobre esse tópico em DG). A parceria desenvolvida com o laboratório da professora Paula Fraenkel foi pensada em função disso: a) adquirir *know-how* em *screening* de alto rendimento em constructos contendo um sistema *reporter* e o gene de interesse *in vitro* e b) ganhar *know-how* no estudo da hepcidina, suas vias de sinalização e possíveis rotas metabólicas a serem abordadas farmacologicamente. Com a parceria estabelecida, o passo seguinte é realizar o *screening* em CG (tentando estabelecer um sistema *reporter* para hepcidina e/ou outros genes de interesse). Em relação à hepcidina, há a tecnologia, há os protocolos com os *primers* já desenhados e há os reagentes disponíveis, todos disponibilizados pela professora Paula Fraenkel, bem como há os equipamentos necessários para os *screenings* (equipamento de cultura de células e espectrofotômetro, por exemplo) disponíveis em nossa instituição. Uma vez gerada a linhagem celular, uma linha de pesquisa de busca por terapias inovadoras (especialmente para moléculas pequenas) se estabelecerá em nosso grupo de pesquisa.

Outro plano em paralelo mais imediato é utilizar fibroblastos de pacientes com DG (mais acessíveis ao nosso grupo do ponto de vista logístico), tratando-os com as drogas mais promissoras identificadas nos experimentos em hepatócitos humanos durante o período sanduiche para a observação dos efeitos sobre parâmetros selecionados da DG. A parceria estabelecida, como já foi dito, permite a colaboração, com fornecimento das drogas, protocolos e propriedade intelectual por parte da professora Paula Fraenkel.

Outra perspectiva futura ainda seria observar os efeitos da hepcidina e do ferro, bem como os efeitos dos tratamentos com os moduladores potenciais de hepcidina sobre a neurodegeneração. Temos planos de estabelecer um protocolo de co-cultura entre CG, hepatócitos humanos e um modelo neuronal de DG (Westbroek *et al.*, 2016), mimetizando *in vitro* a interdependência dos diferentes órgãos na integração do metabolismo da hepcidina e do ferro e complementado as hipóteses geradas por essa tese.

8. Referências

1. Aerts JM, Hollak CE, van Breemen M, Maas M, Groener JE, Boot RG. (2005) Identification and use of biomarkers in Gaucher disease and other lysosomal storage diseases. *Acta Paediatr Suppl.* 94(447):43-6.
2. Aghion H. (1934) La maladie de Gaucher dans l'enfance: forme cardiorénale. Thèse de Médecine de Paris.
3. Aisen P. (2004) Transferrin receptor 1. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36: 2137–2143.
4. Anderson LJ, Holden S, Davis B, Prescott E, Charrier CC, Bunce NH, Firmin DN, Wonke B, Porter J, Walker JM, Pennell DJ. (2001) Cardiovascular T2-star (T2*) magnetic resonance for the early diagnosis of myocardial iron overload. *Eur Heart J.* 22(23):2171-9.
5. Anderson LJ, Westwood MA, Holden S, Davis B, Prescott E, Wonke B, Porter JB, Walker JM, Pennell DJ. (2004) Myocardial iron clearance during reversal of siderotic cardiomyopathy with intravenous desferrioxamine: a prospective study using T2* cardiovascular magnetic resonance. *Br J Haematol.* 127(3):348-55.
6. Appelmans F, Wattiaux R, De Duve C. (1955) Tissue fractionation studies. 5. The association of acid phosphatase with a special class of cytoplasmic granules in rat liver. *Biochem J.* 59(3):438-45.
7. Arosio P, Ingrassia R, Cavadini P. (2009) Ferritins: A family of molecules for iron storage, antioxidation and more. *Biochimica et Biophysica Acta* 1790:589–599.
8. Aslan D, Crain K, Beutler E. (2007) A new case of human atransferrinemia with a previously undescribed mutation in the transferrin gene. *Acta Haematol.* 118(4):244–247.
9. Atesoglu E, Hacıhanefioglu A, Gulbas Z. (2015) Beta-2 microglobulin predicts the outcome after autologous stem cell transplantation in non-Hodgkin lymphoma. *Transfus Apher Sci.* 52(1):65-71.
10. Babitt JL. *et al.* (2006) Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat Genet.* 38: 531–539.
11. Baraibar MA, Barbeito AG, Muhoberac BB, Vidal R. (2008) Iron-mediated aggregation and a localized structural change characterize ferritin from a mutant light chain polypeptide that causes neurodegeneration. *J Biol Chem* 283(46):31679-89.
12. Baraibar MA, Barbeito AG, Muhoberac BB, Vidal R. (2012) A mutant light-chain ferritin that causes neurodegeneration has enhanced propensity toward oxidative damage. *Free Radic Biol Med.* 52(9):1692-7.
13. Barak V, Acker M, Nisman B, Kalickman I, Abrahamov A, Zimran A, Yatziv S. (1999) Cytokines in Gaucher's disease. *Eur Cytokine Netw.* 10(2):205-10.

14. Baranov VS, Schwartzman AL, Gorbunova VN, Gaitskhoki VS, Rubtsov NB, Timchenko NA, Neifakh SA. (1987) Chromosomal localization of ceruloplasmin and transferrin genes in laboratory rats, mice and in man by hybridization with specific DNA probes. *Chromosoma* 96: 60-66.
15. Bardou-Jacquet *et al.* (2011) A novel N491S mutation in the human SLC11A2 gene impairs protein trafficking and in association with the G212V mutation leads to microcytic anemia and liver iron overload. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 47: 243–248.
16. Barneveld RA, Keijzer W, Tegelaers FP, Ginns EI, Geurts van Kessel A, Brady RO, Barranger JA, Tager JM, Galjaard H, Westerveld A, Reuser AJ. (1983) Assignment of the gene coding for human beta-glucocerebrosidase to the region q21-q31 of chromosome 1 using monoclonal antibodies. *Hum Genet.* 64(3):227-31.
17. Barton NW, Brady RO, Dambrosia JM, Di Bisceglie AM, Doppelt SH, Hill SC, Mankin HJ, Murray GJ, Parker RI, Argoff CE, *et al.* (1991) Replacement therapy for inherited enzyme deficiency – macrophage-targeted glucocerebrosidase for Gaucher's disease. *N Engl J Med.* 324(21):1464-70.
18. Beaumont C, Delaunay J, Hetet G, Grandchamp B, Montalembert M, Tcherni G. (2006) Two new human DMT1 gene mutations in a patient with microcytic anemia, low ferritinemia, and liver iron overload. *Blood* 107:4168-4170.
19. Beaumont C, Leneuve P, Devaux I, Scoazec JY, Berthier M, Loiseau MN, Grandchamp B, Bonneau D. (1995) Mutation in the iron responsive element of the L ferritin mRNA in a family with dominant hyperferritinaemia and cataract. *Nature Genet.* 11: 444-446.
20. Bergmann JE & Grabowski GA. (1989) Posttranslational processing of human lysosomal acid beta-glucosidase: a continuum of defects in Gaucher disease type 1 and type 2 fibroblasts. *Am J Hum Genet.* 44(5):741-50.
21. Beutler E & Grabowski GA. (2001) Gaucher Disease. In: Scriver C, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editores. *The metabolic and molecular bases of inherited disease.* 8th ed. New York: McGraw-Hill.
22. Beutler E & Kuhl W. (1970) Detection of the defect of Gaucher's disease and its carrier state in peripheral-blood leucocytes. *Lancet.* 1(7647):612-3.
23. Beutler E, Demina A, Laubscher K, Garver P, Gelbart T, Balicki D, Vaughan L. (1995) The clinical course of treated and untreated Gaucher disease. A study of 45 patients. *Blood Cells Mol Dis.* 21(2):86-108.
24. Beutler E, Felitti, V, Gelbart T, Ho N. (2000) The effect of HFE genotypes in patients attending a health appraisal clinic. *Annals of Internal Medicine* 133: 329-337, 2000.
25. Beutler E, Nguyen NJ, Henneberger MW, Smolec JM, McPherson RA, West C, Gelbart T. (1993) Gaucher disease: gene frequencies in the Ashkenazi Jewish population. *Am J Hum Genet.* 52(1):85-8.
26. Beutler E. (2007) Iron storage disease: Facts, fiction and progress. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 39:140–147.
27. Beutler E. (2010) Disorders of Iron Metabolism. In: Prchal JT, Kaushansky K, Lichtman MA, Kipps TJ, Seligsohn U, editors. *Williams Hematology* 8th edition. New York: McGraw-Hill Companies. Disponível em: <<http://www.accessmedicine.com/content.aspx?aID=6110247>> Acesso em: 7 set. 2013
28. Blanco E, Kannengiesser C, Grandchamp B, Tasso M, Beaumont C. (2009) Not all DMT1 mutations lead to iron overload. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 43:199–201, 2009.

29. Bohlega S, Kambouris M, Shahid M, Al Homsy M, Al Sous W. (2000) Gaucher disease with oculomotor apraxia and cardiovascular calcification (Gaucher type IIIC. *Neurology*. 54(1):261-3.
30. Boot RG, Verhoek M, de Fost M, Hollak CE, Maas M, Bleijlevens B, van Breemen MJ, van Meurs M, Boven LA, Laman JD, Moran MT, Cox TM, Aerts JM. (2004) Marked elevation of the chemokine CCL18/PARC in Gaucher disease: a novel surrogate marker for assessing therapeutic intervention. *Blood*. 103(1):33-9.
31. Boven LA, van Meurs M, Boot RG, Mehta A, Boon L, Aerts JM, Laman JD. (2004) Gaucher cells demonstrate a distinct macrophage phenotype and resemble alternatively activated macrophages. *Am J Clin Pathol*. 122(3):359-69.
32. Brady RO, Kanfer JN, Bradley RM, Shapiro D. (1966a) Demonstration of a deficiency of glucocerebrosidase-cleaving enzyme in Gaucher's disease. *J Clin Invest*. 45(7):1112-5.
33. Brady RO, Kanfer JN, Shapiro D. (1965a) The Metabolism of Glucocerebrosides. I. Purification and Properties of a Glucocerebrosidase-Cleaving Enzyme from Spleen Tissue. *J Biol Chem*. 240:39-43
34. Brady RO, Kanfer JN, Shapiro D. (1965b) Metabolism of Glucocerebrosides. II. Evidence of an Enzymatic Deficiency in Gaucher's Disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 18:221-5.
35. Brady RO, Pentchev PG, Gal AE, Hibbert SR, Dekaban AS. (1974) Replacement therapy for inherited enzyme deficiency. Use of purified glucocerebrosidase in Gaucher's disease. *N Engl J Med*. 291(19):989-93.
36. Brady RO. (1966b) The sphingolipidoses. *N Engl J Med*. 275(6):312-8.
37. Brill NE, Mandelbaum FS, Libman E. (1905) Primary splenomegaly – Gaucher type. Report on one of four cases occurring in a single generation in one family. *Am J Med Sci*. 129(3):491-503.
38. Brill NE. (1901) Primary splenomegaly with a report of three cases occurring in one family. *Am J Med Sci*. 121(4):377-91
39. Camaschella C, Poggiali E. (2009) Towards explaining “unexplained hyperferritinemia”. *Haematologica* 94(3):307-309.
40. Charrow J, Andersson HC, Kaplan P, Kolodny EH, Mistry P, Pastores G, Rosenbloom BE, Scott CR, Wappner RS, Weinreb NJ, Zimran A. (2000) The Gaucher registry: demographics and disease characteristics of 1698 patients with Gaucher disease. *Arch Intern Med*. 160(18):2835-43.
41. Chen C, Wen S, Tan X. (2009) Molecular analysis of a novel case of congenital atransferrinemia. *Acta Haematol*. 122(1): 27–28.
42. Chen J, Enns CA. (2012) Hereditary hemochromatosis and transferrin receptor 2. *Biochimica et Biophysica Acta* 1820:256–263.
43. Choudary PV, Barranger JA, Tsuji S, Mayor J, LaMarca ME, Cepko CL, Mulligan RC, Ginns EI. (1986) Retrovirus-mediated transfer of the human glucocerebrosidase gene to Gaucher fibroblasts. *Mol Biol Med*. 3(3):293-9.
44. Christomanou H, Aignesberger A, Linke RP. (1986). Immunochemical characterization of two activator proteins stimulating enzymic sphingomyelin degradation in vitro. Absence of one of them in a human Gaucher disease variant. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 367:879–90.
45. Clark LN, Kartsaklis LA, Wolf Gilbert R, Dorado B, Ross BM, Kisselev S, Verbitsky M, Mejia-Santana H, Cote LJ, Andrews H, Vonsattel JP, Fahn S, Mayeux R, Honig LS, Marder K. (2009) Association of glucocerebrosidase mutations with dementia with lewy bodies. *Arch Neurol*. 66(5):578-83.

46. Cohen LA, Gutierrez L, Weiss A, Leichtmann-Bardoogo Y, Zhang DL, Crooks DR, Sougrat R, Morgenstern A, Galy B, Hentze MW, Lazaro FJ, Rouault TA, Meyron-Holtz EG. (2010) Serum ferritin is derived primarily from macrophages through a nonclassical secretory pathway. *Blood*. 116(9):1574-84.
47. Cole JA, Taylor JS, Hangartner TN, Weinreb NJ, Mistry PK, Khan A. (2011) Reducing selection bias in case-control studies from rare disease registries. *Orphanet J Rare Dis*. 6:61.
48. Coutinho MF, Prata MJ, Alves S. (2012a) Mannose-6-phosphate pathway: a review on its role in lysosomal function and dysfunction. *Mol Genet Metab*. 105(4):542-50.
49. Coutinho MF, Prata MJ, Alves S. (2012b) A shortcut to the lysosome: the mannose-6-phosphate-independent pathway. *Mol Genet Metab*. 107(3):257-66.
50. Cox T. (2006) Biomarkers in lysosomal storage diseases. Editors In: Mehta A, Beck M, Sunder-Plassmann G, editors. *SourceFabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS*. Oxford: Oxford PharmaGenesis. Chapter 9.
51. Crompton DE, *et al.* (2002) Neuroferritinopathy: A Window on the Role of Iron in Neurodegeneration. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 29(3):522–531.
52. Crook MA (2012) Hyperferritinaemia; laboratory implications. *Ann Clin Biochem* 49:211–213.
53. Cullen V, Lindfors M, Ng J, Paetau A, Swinton E, Kolodziej P, Boston H, Saftig P, Woulfe J, Feany MB, Myllykangas L, Schlossmacher MG, Tyynelä J. (2009) Cathepsin D expression level affects alpha-synuclein processing, aggregation, and toxicity in vivo. *Mol Brain*. 2:5.
54. Daimon M, Yamatani K, Igarashi M, Fukase N, Kawanami T, Kato T, Tominaga M, Sasaki H. (1995) Fine structure of the human ceruloplasmin gene. *Biochem Biophys Res Commun* 208:1028-1035.
55. De Duve C, Pressman BC, Gianetto R, Wattiaux R, Appelmanns F. (1955) Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem J*. 60(4):604-17.
56. de Fost M, Vom Dahl S, Weverling GJ, Brill N, Brett S, Häussinger D, Hollak CE. (2005) Increased incidence of cancer in adult Gaucher disease in Western Europe. *Blood Cells Mol Dis*. 36(1):53-8.
57. Deghady A, Marzouk I, El-Shayeb A, Wali Y. (2006) Coagulation abnormalities in type 1 Gaucher disease in children. *Pediatr Hematol Oncol*. 23(5):411-7.
58. Deibener J, Kaminsky P, Jacob C, Dousset B, Klein M, Duc M. (1998) Enzyme replacement therapy decreases hypergammaglobulinemia in Gaucher's disease. *Haematologica*. 83(5):479-80.
59. Demarsh QB & Kautz J. (1957) The submicroscopic morphology of Gaucher cells. *Blood*. 12(4):324-35.
60. Desnick RJ & Fan JQ. (2007) Pharmacologic Chaperone Therapy for Lysosomal Diseases. In: Futerman AH & Zimram A, editors. *Gaucher Disease*. 1st ed. Boca Raton: CRC/Taylor & Francis.
61. Desnick RJ. (1982) Gaucher disease: a century of delineation and understanding. *Prog Clin Biol Res*. 95:1–30.
62. Deugnier Y, Bardou-Jacquet E, Lainé F, Gandon Y (2012) Diagnostic d'une surcharge hépatique en fer. *La Revue de médecine interne* 33S S10-S14
63. Dexter DT, Sian J, Jenner P, Marsden CD. (1993) Implications of alterations in trace element levels in brain in Parkinson's disease and other neurological disorders affecting the basal ganglia. *Adv Neurol*. 60:273-81.

64. Duyn JH. (2011) High-field MRI of brain iron. *Methods Mol Biol.* 711:239-49.
65. Dvir H, Harel M, McCarthy AA, Toker L, Silman I, Futerman AH, Sussman JL. (2003) X-ray structure of human acid-beta-glucosidase, the defective enzyme in Gaucher disease. *EMBO Rep.* 4(7):704-9.
- a. Enns CA, Ahmed R, Zhang AS. (2012) Neogenin Interacts with Matriptase-2 to Facilitate Hemojuvelin Cleavage. *J. Biol. Chem.* published online August 14.
66. Eskelinen EL. (2006) Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol Aspects Med.* 27(5-6):495-502.
67. Fasano A, Colosimo C, Miyajima H, Tonali PA, Re TJ, Bentivoglio AR. (2008) Aceruloplasminemia: a novel mutation in a family with marked phenotypic variability. *Mov Disord.* 23:751 – 755.
68. Feder J N, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A. *et al.* (1996) A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nature Genetics* 13: 399–408.
69. Feder JN, Tsuchihashi Z, Irrinki A, Lee VK, Mapa FA, Morikang E, Prass CE, Star-nes SM, Wolff RK, Parkkila S, Sly WS, Schatzman RC. (1997) The hemochromatosis founder mutation in HLA-H disrupts beta2-microglobulin interaction and cell surface expression. *Journal of Biological Chemistry* 272: 14025–14028.
70. Ferraz M, Kallemeijn W, Mirzaian M, Herrera Moro D, Marques A, Wisse P, Boot RG, Willems L, Overkleeft H, Aerts J. Gaucher disease and Fabry disease: new markers and insights in pathophysiology for two distinct glycosphingolipidoses (2014). *Biochim Biophys Acta.* 1841(5):811-25.
71. Froissart R. (2006) Current and future biochemical markers for Gaucher disease. *Rev Med Interne.* 27 Suppl 1:S22-5.
72. Fuller M, Meikle PJ, Hopwood JJ. (2006) Epidemiology of lysosomal storage diseases: an overview. In: Mehta A, Beck M, Sunder-Plassmann G, editores. *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS.* Oxford: Oxford PharmaGenesis. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11603/>> Acesso em: 27 ago. 2013
73. Fuqua BK, Vulpe, CD, Anderson, GJ. (2012) Intestinal iron absorption. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 26:115–119.
74. Furbish FS, Blair HE, Shiloach J, Pentchev PG, Brady RO. (1977) Enzyme replacement therapy in Gaucher's disease: large-scale purification of glucocerebrosidase suitable for human administration. *Natl Acad Sci USA.* 74(8):3560-3.
75. Furbish FS, Steer CJ, Krett NL, Barranger JA. (1981) Uptake and distribution of placental glucocerebrosidase in rat hepatic cells and effects of sequential deglycosylation. *Biochim Biophys Acta.* 673(4):425-34.
76. Futerman A & Platt F. (2017) The metabolism of glucocerebrosides - From 1965 to the present. *Mol Genet Metab.* 120(1-2):22-26.
77. Futerman AH & van Meer G. (2004) The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5(7):554-65.
78. Futerman AH. (2007) Cellular Pathology in Gaucher Disease. In: Futerman AH & Zimram A, editores. *Gaucher Disease.* 1st ed. Boca Raton: CRC/Taylor & Francis.
79. Gandon Y, Olivie A, Juhel C, Rohou T, Aubé C. (2004b) Hépatopathies de surcharge et cirrhose. *EMC-Radiologie 1* : 665–687
80. Gandon Y, Olivie D, Guyader D, Aubé C, Oberti F, Sebille V, Deugnier Y. (2004a) Non-invasive assessment of hepatic iron stores by MRI. *Lancet.* 363(9406):357-62.

81. Garik *et al.* (2003) DMT1: A mammalian transporter for multiple metals. *BioMetals* 16: 41–54.
82. Gaucher PCE. (1882) De l'épithélioma primitif de la rate. Hypertrophie idiopathique de la rate sans leucémie. Thèse de Médecine de Paris n° 31.
83. Germain R & Margulies D. (1993) The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Annu Rev Immunol.* 1993;11:403-50.
84. Ghugre NR, Enriquez CM, Gonzalez I, Nelson MD Jr, Coates TD, Wood JC. (2006) MRI detects myocardial iron in the human heart. *Magn Reson Med.* 56(3):681-6.
85. Ginns EI, Choudary PV, Martin BM, Winfield S, Stubblefield B, Mayor J, Merkle-Lehman D, Murray GJ, Bowers LA, Barranger JA. (1984) Isolation of cDNA clones for human beta-glucocerebrosidase using the lambda gt11 expression system. *Biochem Biophys Res Commun.* 123(2):574-80.
86. Ginns EI, Choudary PV, Tsuji S, Martin B, Stubblefield B, Sawyer J, Hozier J, Barranger JA. (1985) Gene mapping and leader polypeptide sequence of human glucocerebrosidase: implications for Gaucher disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 82(20):7101-5.
87. Girelli D, Corrocher R, Bisceglia L, Olivieri O, De Franceschi L, Zelante L, Gasparini P. (1995) Molecular basis for the recently described hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome: a mutation in the iron-responsive element of ferritin L-subunit gene (the "Verona mutation"). *Blood* 86:4050–4053.
88. Gkouvatsos K, Papanikolaou G, Pantopoulos K. (2012) Regulation of iron transport and the role of transferrin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1820:188–202.
89. Gonzalez ACJ, Moreno-Carralero MI, Martinez-Perez J, Mendez M, Garcia-Ros M, Moran-Jimenez MJ. (2010) The hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome: a family study. *Eur J Pediatr* 169:1553–1555.
90. Grabowski GA, Barton NW, Pastores G, Dambrosia JM, Banerjee TK, McKee MA, Parker C, Schiffmann R, Hill SC, Brady RO. (1995) Enzyme therapy in type 1 Gaucher disease: comparative efficacy of mannose-terminated glucocerebrosidase from natural and recombinant sources. *Ann Intern Med.* 122(1):33-9.
91. Grabowski GA, Kazimierczuk A, Liou B. (2007) Cell Biology and Biochemistry of Acid-β-Glucosidase: The Gaucher Disease Enzyme In: Futerman AH & Zimram A, editores. *Gaucher Disease*. 1st ed. Boca Raton: CRC/Taylor & Francis.
92. Grabowski GA, Kolodny EH, Schmidt LS, Rosenbloom BE, Prakash-Cheng A, Kaplan P, Charrow J, Pastores GM, Mistry PK. (2010b) Gaucher Disease: Phenotypic and Genetic Variation. In: Valle D, Beaudet AL, Vogelstein B, Kinzler KW, *et al.*, editores. *The Scriver's Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill Companies. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1036/ommbid.177>> Acesso em: 27 ago. 2013
93. Grabowski GA, Petsko GA, Kolodny EH. (2010a) Gaucher Disease. In: Valle D, Beaudet AL, Vogelstein B, Kinzler KW, *et al.*, editores. *The Scriver's Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill Companies. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1036/ommbid.176>> Acesso em: 27 ago. 2013
94. Grabowski GA. (2012) Gaucher disease and other storage disorders. *Hematology: ASH Education Book* 2012 (1):13-8.
95. Grebenchtchikov N, Geurts-Moespot AJ, Kroot JJ, den Heijer M, Tjalsma H, Swinkels DW, Sweep FG. (2009) High-sensitive radioimmunoassay for human serum hepcidin. *Br J Haematol.* 146(3):317-25.

96. Greipp P, San Miguel J, Durie B, Crowley J, Barlogie B, Bladé J, Boccadoro M, Child J, Avet-Loiseau H, Kyle R, Lahuerta J, Ludwig H, Morgan G, Powles R, Shimizu K, Shustik C, Sonneveld P, Tosi P, Turesson I, Westin J. (2005) International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol.* 23(15):3412-20.
97. Griffiths WJH, Kelly AL, Cox TM. (1999) Inherited disorders of iron storage and transport. *Molecular Medicine Today* 5:431-438.
98. Grosbois B, Revest M, Decaux O. (2009) [Major hyperferritinemia, autoimmune thrombocytopenic purpura and lymphocytic lymphoma in Gaucher disease]. *Presse Med.* 38 Suppl 2:2S56-7.
99. Grotto HZW. (2008) Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 30(5):390-397.
100. Gujja P, Rosing DR, Tripodi DJ, Shizukuda Y. (2010) Iron overload cardiomyopathy: better understanding of an increasing disorder. *J Am Coll Cardiol.* 56(13):1001-12.
101. Gunshin *et al.* (2005) Slc11a2 is required for intestinal iron absorption and erythropoiesis but dispensable in placenta and liver. *The Journal of Clinical Investigation.* 115(5):1258-1266.
102. Güssow D, Rein R, Ginjaar I, Hochstenbach F, Seemann G, Kottman A, Ploegh HL. (1987) The human beta 2-microglobulin gene. Primary structure and definition of the transcriptional unit. *J Immunol.* 139(9):3132-8.
103. Haile DJ. (2000) Assignment of Slc11a3 to mouse chromosome 1 band 1B and SLC11A3 to human chromosome 2q32 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet.* 88(3-4):328-9.
104. Harris ZL, Takahashi Y, Miyajima H, Serizawa M, MacGillivray RTA, Gitlin JD. (1995) Aceruloplasminemia: molecular characterization of this disorder of iron metabolism. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 92:2539-2543.
105. Hashimoto M, Takeda A, Hsu LJ, Takenouchi T, Masliah E. (1999) Role of cytochrome c as a stimulator of alpha-synuclein aggregation in Lewy body disease. *J Biol Chem.* 274(41):28849-52.
106. Heeney MM, Andrews NC. (2004) Iron homeostasis and inherited iron overload disorders: an overview. *Hematol Oncol Clin N Am.* 18:1379-1403.
107. Heilmeyer L, Keller W, Vivell O, et al. (1961) Congenital atransferrinemia in a 7-year-old girl. *Dtsch Med Wochenschr* 86:1745-1751.
108. Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C. (2010) Two to Tango: Regulation of Mammalian Iron Metabolism. *Cell* 142: 24-38.
109. Hers HG. (1965) Inborn Lysosomal Diseases. *Gastroenterology.* 48:625-33
110. Hershberger C L, Larson J L, Arnold B, Rosteck Jr PR, Williams P, DeHoff B, Dunn P, O'Neal KL, Riemen M W, Tice PA, Crofts R, Ivancic J. (1991) A cloned gene for human transferrin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 646:140-154.
111. Ho MW & O'Brien JS. (1971) Gaucher's Disease: Deficiency of 'Acid',s-Glucosidase and Reconstitution of Enzyme Activity In Vitro. *Proc Nat Acad Sci USA.* 68(11):2810-13
112. Hollak CE, van Weely S, van Oers MH, Aerts JM. (1994) Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease. *J Clin Invest.* 93(3):1288-92.
113. Horowitz M, Wilder S, Horowitz Z, Reiner O, Gelbart T, Beutler E. (1989) The human glucocerebrosidase gene and pseudogene: structure and evolution. *Genomics.* 4(1):87-96.
114. Horowitz M, Zimran A. (1994) Mutations causing Gaucher disease. *Hum Mutat.* 3(1):1-11.
115. Hruska KS, LaMarca ME, Scott CR, Sidransky E. (2008) Gaucher disease: mutation and polymorphism spectrum in the glucocerebrosidase gene (GBA). *Hum Mutat.* 29(5):567-83.

116. Hruska KS, LaMarca ME, Sidransky E. (2007) Gaucher Disease: Molecular Biology and Genotype-Phenotype Correlations. In: Futerman AH & Zimram A, editores. Gaucher Disease. 1st ed. Boca Raton: CRC/Taylor & Francis.
117. Hughes D & Pastores G. (2013) Haematological manifestations and complications of Gaucher disease. *Curr Opin Hematol.* 20(1):41-7.
118. Hughes D, Cappellini MD, Berger M, Van Droogenbroeck J, de Fost M, Janic D, Marinakis T, Rosenbaum H, Villarubia J, Zhukovskaya E, Hollak C. (2007) Recommendations for the management of the haematological and onco-haematological aspects of Gaucher disease. *Br J Haematol.* 138(6):676-86.
119. Iolascon A, d'Apolito M, Servedio V, Cimmino F, Piga A, Camaschella C. (2006) Microcytic anemia and hepatic iron overload in a child with compound heterozygous mutations in DMT1 (SCL11A2). *Blood* 107: 349-354.
120. Jiang T, Ding X, Lu W. (2016) The Prognostic Significance of Beta2 Microglobulin in Patients with Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. *Dis Markers.* ID:1523959.
121. Johnson LA, Hoppel BE, Gerard EL, Miller SP, Doppelt SH, Zirzow GC, Rosenthal DI, Dambrosia JM, Hill SC, Brady RO, et al. (1992) Quantitative chemical shift imaging of vertebral bone marrow in patients with Gaucher disease. *Radiology.* 182(2):451-5.
122. Kampine JP, Brady RO, Kanfer JN, Feld M, Shapiro D. (1967) Diagnosis of gaucher's disease and niemann-pick disease with small samples of venous blood. *Science.* 155(3758):86-8.
123. Kannengiesser C, Jouanolle AM, Hetet G, Mosser A, Muzeau F, Henry D, Bardou-Jacquet E, Mornet M, Brissot P, Deugnier Y, Grandchamp B, Beaumont C. (2009) A new missense mutation in the L ferritin coding sequence associated with elevated levels of glycosylated ferritin in serum and absence of serum overload. *Haematologica* 94:335-339.
124. Kaplan P, Andersson HC, Kacena KA, Yee JD. (2006) The clinical and demographic characteristics of nonneuronopathic Gaucher disease in 887 children at diagnosis. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 160(6):603-8.
125. Kasvosve I. (2013) Effect of ferroportin polymorphism on iron homeostasis and infection. *Clinica Chimica Acta* 416:20–25.
126. Kato J, Fujikawa K, Kanda M, et al. (2001) A mutation, in the iron-responsive element of H ferritin mRNA, causing autosomal dominant iron overload. *Am J Hum Genet.* 69(1):191–197.
127. Keogh MJ, Jonas P, Coulthard A, Chinnery PF, Burn J. (2012) Neuroferritinopathy: a new inborn error of iron metabolism. *Neurogenetics* 13:93–96.
128. Klomp L WJ, Gitlin J D. (1996) Expression of the ceruloplasmin gene in the human retina and brain: implications for a pathogenic model in aceruloplasminemia. *Hum. Molec. Genet.* 5: 1989-1996.
129. Knisely AS, Gelbart T, Beutler E. (2004) Molecular characterization of a third case of human atransferrinemia. *Blood* 104(8):2607.
130. Knovich *et al.* (2009) Ferritin for the clinician. *Blood Reviews* 23: 95–104.
131. Kolter T & Sandhoff K. (2005) Principles of lysosomal membrane digestion: stimulation of sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 21:81-103.
132. Kolter T, Proia RL, Sandhoff K. (2002) Combinatorial ganglioside biosynthesis. *J Biol Chem.* 277(29):25859-62.
133. Kolter T. (2011) A view on sphingolipids and disease. *Chem Phys Lipids.* 164(6):590-606.
134. Kowdley KV, Bennett RL, Motulsky AG. (2012) HFE-Associated Hereditary Hemochromatosis. In: Pagon RA, Adam MP, Bird TD, *et al.*, editores. GeneReviews™ [Internet].

- Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1440/>> Acesso em: 27 ago. 2013
135. Kroot JJ, Laarakkers CM, Geurts-Moespot AJ, Grebenchtchikov N, Pickkers P, van Ede AE, Peters HP, van Dongen-Lases E, Wetzels JF, Sweep FC, Tjalsma H, Swinkels DW. (2010) Immunochemical and mass-spectrometry-based serum hepcidin assays for iron metabolism disorders. *Clin Chem.* 56(10):1570-9.
 136. Lahiri DK & Nurnberger JI. (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nuclei Acids Res* 19: 5444.
 137. Landgren O, Turesson I, Gridley G, Caporaso NE. (2007) Risk of malignant disease among 1525 adult male US Veterans with Gaucher disease. *Arch Intern Med.* 167(11):1189-94.
 138. Lee PL, Gelbart T, West C, Halloran C, Beutler E. (1998) The Human Nramp2 Gene: Characterization of the Gene Structure, Alternative Splicing, Promoter Region and Polymorphisms. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 24(9): 199–215.
 139. Lee RE, Balcerzak SP, Westerman MP. (1967) Gaucher's disease. A morphologic study and measurements of iron metabolism. *Am J Med.* 42(6):891-8.
 140. Lee RE. (1968) The fine structure of the cerebroside occurring in Gaucher's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1968 Oct;61(2):484-9.
 141. Lehn A, Boyle R, Brown H, Airey C, Mellick G. (2012) Neuroferritinopathy. *Parkinsonism and Related Disorders* 18:909-915.
 142. Li K, Du H, Lian X, Yang S, Chai D, Wang C, Yang R, Chen X. (2014) Characterization of β 2-microglobulin expression in different types of breast cancer. *BMC Cancer.* 14:750.
 143. Lieberman J & Beutler E. (1976) Elevation of serum angiotensin-converting enzyme in Gaucher's disease. *N Engl J Med.* 294(26):1442-4.
 144. Lorber M, Nemes JL. (1967) Identification of ferritin within Gaucher cells. An electron microscopic and immunofluorescent study. *Acta Haematol.* 37(4):189-97.
 145. Lorber M. (1960) The occurrence of intracellular iron in Gaucher's disease. *Ann Intern Med.* 53:293-305.
 146. Lorber M. (1970) Adult-type Gaucher's disease: a secondary disorder of iron metabolism. *Mt Sinai J Med.* 37(4):404-17.
 147. Lorenz F, Pawłowicz E, Klimkowska M, Beshara S, Bulanda Brustad A, Skotnicki A, Wahlin A, Machaczka M. (2016) Ferritinemia and serum inflammatory cytokines in Swedish adults with Gaucher disease type 1. *Blood Cells Mol Dis.* pii: S1079-9796(16)30206-6.
 148. Luscieti S, *et al.* (2013) Novel mutations in the ferritin-L iron-responsive element that only mildly impair IRP binding cause hereditary hyperferritinaemia cataract syndrome. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8(30).
 149. Mavrogeni SI, Markussis V, Kaklamanis L, Tsiapras D, Paraskevaidis I, Karavolias G, Karagiorga M, Douskou M, Cokkinos DV, Kremastinos DT. (2005) A comparison of magnetic resonance imaging and cardiac biopsy in the evaluation of heart iron overload in patients with beta-thalassemia major. *Eur J Haematol.* 5(3):241-7.
 150. Mayr R, Janecke AR, Schranz M, Griffiths WJH, Vogel W, Pietrangelo A, *et al.* (2010) Ferroportin disease: a systematic meta-analysis of clinical and molecular findings. *J Hepatol* 53:941-9.
 151. McDonald *et al.* (2013) Iron storage disease in Asia-Pacific populations: The importance of non-HFE mutations. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 28: 1087–1094.

152. McKie AT, Marciani P, Rolfs A, Brennan K, Wehr K, Barrow D, et al. (2000) A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol Cell* 5:299-309.
153. McNeill A, Pandolfo M, Kuhn J, Shang H, Miyajima H. (2009) The Neurological Presentation of Ceruloplasmin Gene Mutations. *Eur Neurol* 60:200–205.
154. Medrano-Engay B, Irun P, Gervas-Arruga J, Andrade-Campos M, Andreu V, Alfonso P, Pocovi M, Giraldo P. (2014) Iron homeostasis and inflammatory biomarker analysis in patients with type 1 Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis*. 53(4):171-5.
155. Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. (1999) Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA* 281:249 –254.
156. Mekinian A, Stirnemann J, Belmatoug N, Heraoui D, Fantin B, Fain O, Charpentier A, Rose C. (2012) Ferritinemia during type 1 Gaucher disease: mechanisms and progression under treatment. *Blood Cells Mol Dis*. 49(1):53-7.
157. Merrill AH. (2002) De novo sphingolipid biosynthesis: a necessary, but dangerous, pathway. *J Biol Chem*. 277(29):25843-6.
158. Mignot C, Gelot A, Bessières B, Daffos F, Voyer M, Menez F, Fallet Bianco C, Odent S, Le Duff D, Loget P, Fargier P, Costil J, Josset P, Roume J, Vanier MT, Maire I, Billette de Villemeur T. (2003) Perinatal-lethal Gaucher disease. *Am J Med Genet A*. 120A(3):338-44.
159. Millonig G, Muckenthaler MU, Mueller S. (2010) Hyperferritinaemia-cataract syndrome: worldwide mutations and phenotype of an increasingly diagnosed genetic disorder. *Hum Genomics* 4:250–262.
160. Mims MP, Prchal JT. (2005) Divalent metal transporter 1. *Hematology* 10(4):339–345.
161. Montalbeti N, Simonin A, Kovacs G, Hediger MA. (2013) Mammalian iron transporters: Families SLC11 and SLC40. *Molecular Aspects of Medicine* 34: 270–287.
162. Montfort M, Chabás A, Vilageliu L, Grinberg D. (2004) Functional analysis of 13 GBA mutant alleles identified in Gaucher disease patients: Pathogenic changes and "modifier" polymorphisms. *Hum Mutat*. 23(6):567-75.
163. Montosi G, Donovan A, Totaro A, Garuti C, Pignatti E, Cassanelli S. *et al.* (2001) Autosomal dominant hemochromatosis is associated with a mutation in the ferroportin (SLC11A3) gene. *J. Clin. Invest*. 108:619–623.
164. Morgan MA, Hoffbrand AV, Laulicht M, Luck W, Knowles S. (1983) Serum ferritin concentration in Gaucher's disease. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 286(6381):1864.
165. Morita H, Ikeda S, Yamamoto K, *et al.* (1995) Hereditary ceruloplasmin deficiency with hemosiderosis: a clinico pathological study of a Japanese family. *Ann Neurol*. 37: 646–656.
166. Murugesan V, Chuang W, Liu J, Lischuk A, Kacena K, Lin H, Pastores G, Yang R, Keutzer J, Zhang K, Mistry P. (2016) Glucosylsphingosine is a key biomarker of Gaucher disease. *Am J Hematol*. 91(11):1082-1089
167. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, Ganz T, Kaplan J. (2004) Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 306: 2090-2093.
168. Neufeld EF. (1991) Lysosomal storage diseases. *Annu Rev Biochem*. 60:257-80.
169. Nyhan WL, Barshop BA, Al-Aqeel AI. (2012). Gaucher disease. In: Nyhan WL, Barshop BA, Al-Aqeel AI. *Atlas of Inherited Metabolic Diseases* 3rd edition. London: Hodder Arnold. 613-627.

170. Ockerman PA. (1968) Identity of beta-glucosidase, beta-xylosidase and one of the beta-galactosidase activities in human liver when assayed with 4-methylumbelliferyl-beta-D-glycosides studies in cases of Gaucher's disease. *Biochim Biophys Acta*. 165(1):59-62.
171. Orino K, Watanabe K. (2008) Molecular, physiological and clinical aspects of the iron storage protein ferritin. *The Veterinary Journal* 178: 191–201, 2008.
172. Ouda S, Khairy A, Sorour A, Mikhail M. (2015) Serum Beta-2 Microglobulin: a Possible Marker for Disease Progression in Egyptian Patients with Chronic HCV Related Liver Diseases. *Asian Pac J Cancer Prev*. 16(17):7825-9.
173. Park I, Schaeffer E, Sidoli A, Baralle FE, Cohen GN, Zakin M M. (1985) Organization of the human transferrin gene: direct evidence that it originated by gene duplication. *Proc. Nat. Acad. Sci*. 82:3149-3153.
174. Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. (2001) Heparin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J. Biol. Chem*. 276: 7806–7810.
175. Pastores GM & Hughes DA. (2017) Gaucher Disease. In: Pagon RA, Adam MP, Bird TD, *et al.*, editores. *GeneReviews™* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1269/>> Acesso em: 20 mai. 2017
176. Pentchev PG, Brady RO, Hibbert SR, Gal AE, Shapiro D. (1973) Isolation and characterization of glucocerebrosidase from human placental tissue. *J Biol Chem*. 248(15):5256-61.
177. Peslova G., *et al.* (2009) Heparin, the hormone of iron metabolism, is bound specifically to α -2-macroglobulin in blood. *Blood* 113(24):6225-6236.
178. Petrak J, Vyoral D. (2005) Heparin—a ferroxidase of cellular iron export. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37:1173–1178.
179. Pietrangelo A. (2007) Hemochromatosis: an endocrine liver disease. *Hepatology* 46 (4): 1291–1301.
180. Pietrangelo A., Caleffi A, Corradini E. (2011) Heparin in human iron disorders: Therapeutic implications. *Journal of Hepatology* 54j: 173–181.
181. Pinto R, Caseiro C, Lemos M, Lopes L, Fontes A, Ribeiro H, Pinto E, Silva E, Rocha S, Marcão A, Ribeiro I, Lacerda L, Ribeiro G, Amaral O, Sá Miranda MC. (2004) Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal. *Eur J Hum Genet*. 12(2):87-92.
182. Platt FM & Cox TM. (2007) Substrate Reduction Therapy. In: Futerman AH & Zimram A, editores. *Gaucher Disease*. 1st ed. Boca Raton: CRC/Taylor & Francis.
183. Poll LW, Koch JA, Willers R, Aerts H, Scherer A, Häussinger D, Mödder U, vom Dahl S. (2002) Correlation of bone marrow response with hematological, biochemical, and visceral responses to enzyme replacement therapy of nonneuronopathic (type 1) Gaucher disease in 30 adult patients. *Blood Cells Mol Dis*. 28(2):209-20.
184. Poorthuis BJ, Wevers RA, Kleijer WJ, Groener JE, de Jong JG, van Weely S, Niezen-Koning KE, van Diggelen OP. (1999) The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. *Hum Genet*. 105(1-2):151-6.
185. Premkumar L, Silman I, Sussman JL, Futerman AH. (2007) The X-Ray Structure of Human Acid- β -Glucosidase: Implications for Second-Generation Enzyme Replacement Therapy. In: Futerman AH & Zimram A, editores. *Gaucher Disease*. 1st ed. Boca Raton: CRC/Taylor & Francis.
186. Reczek D, Schwake M, Schröder J, Hughes H, Blanz J, Jin X, Brondyk W, Van Patten S, Edmunds T, Saftig P. (2007) LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase. *Cell*. 131(4):770-83.

187. Regenboog M, van Kuilenburg A, Verheij J, Swinkels D, Hollak C. (2016) Hyperferritinemia and iron metabolism in Gaucher disease: Potential pathophysiological implications. *Blood Rev.* 30(6):431-437.
188. Rice AE, Mendez MJ, Hokanson CA, Rees DC, Björkman PJ. (2009) Investigation of the biophysical and cell biological properties of ferroportin, a multipass integral membrane protein iron exporter. *J Mol Biol* 386:717-32.
189. Rosenbloom BE & Weinreb NJ. (2013) Gaucher disease: a comprehensive review. *Crit Rev Oncog.* 18(3):163-75.
190. Rosenbloom BE, Weinreb NJ, Zimran A, Kacena KA, Charrow J, Ward E. (2005) Gaucher disease and cancer incidence: a study from the Gaucher Registry. *Blood.* 105(12):4569-72.
191. Rouault TA & Cooperman S. (2006) Brain iron metabolism. *Semin Pediatr Neurol.* 13(3):142-8.
192. Roy CN, Penny DM, Feder JN, Enns CA. (1999) The hereditary hemochromatosis protein, HFE, specifically regulates transferrin-mediated iron uptake in HeLa cells. *Journal of Biological Chemistry* 274: 9022–9028.
193. Royle NJ, Irwin DM, Koschinsky M L, MacGillivray RTA, Hamerton JL. (1987) Human genes encoding prothrombin and ceruloplasmin map to 11p11-q12 and 3q21-24, respectively. (Abstract) *Somat. Cell Molec. Genet.* 13:285-292.
194. Rusticeanu M, *et al.* (2013) Novel ceruloplasmin mutation causing aceruloplasminemia with hepatic iron overload and diabetes without neurological symptoms. (Letter) *Clin Genet.*, Apr.5.
195. Saad STO. (2010) Causas genéticas de deficiência de ferro. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 32(2):99-104.
196. Saadi T, Rosenbaum H, Veitsman E, Baruch Y. (2010) Gaucher's disease type I: a disease masked by the presence of abnormal laboratory tests common to primary liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 22(8):1019-21.
197. Santoro C, Marone M, Ferrone M, Constanzo F, Colombo M, Minganti C, Cortese R, Silengo L. (1986) Cloning of the gene coding for human L apoferritin. *Nucleic Acids Research* 14(7):2863-2876.
198. Santos PC, Caçado RD, Pereira AC, Schetttert IT, Soares RA, Pagliusi RA, Hirata RD, Hirata MH, Teixeira AC, Figueiredo MS, Chiattonne CS, Krieger JE, Guerra-Shinohara EM. (2011) Hereditary hemochromatosis: mutations in genes involved in iron homeostasis in Brazilian patients. *Blood Cells Mol Dis.* 46(4):302-7.
199. Santos PC, Dinardo CL, Caçado RD, Schetttert IT, Krieger JE, Pereira AC. (2012) Non-HFE hemochromatosis. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 34(4):311-6.
200. Schnabel D, Schröder M, Sandhoff K. (1991) Mutation in the sphingolipid activator protein 2 in a patient with a variant of Gaucher disease. *FEBS Lett.* 284(1):57-9.
201. Schulze H, Kolter T, Sandhoff K. (2009) Principles of lysosomal membrane degradation: Cellular topology and biochemistry of lysosomal lipid degradation. *Biochim Biophys Acta.* 1793(4):674-83.
202. Shamsian BS, Rezaei N, Arzanian MT, Alavi S, Khojasteh O, Eghbali A. (2009) Severe hypochromic microcytic anemia in a patient with congenital atransferrinemia. *Pediatr Hematol Oncol.* 26(5): 356–362.
203. Shawki *et al.* (2012) H(+)-coupled divalent metal-ion transporter-1: functional properties, physiological roles and therapeutics. (Abstract) *Curr Top Membr.* 70: 169-214.

204. Shayehi M, *et al.* (2005) Identification of an Intestinal Heme Transporter. *Cell* 122: 789–801
205. Sheftel AD, Mason AB, Ponka P. (2012) The long history of iron in the Universe and in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 1820:161–187.
206. Shi H, Bencze K Z, Stemmler T L, Philpott CC. (2008) A cytosolic iron chaperone that delivers iron to ferritin. *Science* 320(5880): 1207–1210.
207. Sidransky E, Bottler A, Stubblefield B, Ginns EI. (1994) DNA mutational analysis of type 1 and type 3 Gaucher patients: how well do mutations predict phenotype? *Hum Mutat.* 3(1):25-8.
208. Sidransky E, Samaddar T, Tayebi N. (2009) Mutations in GBA are associated with familial Parkinson disease susceptibility and age at onset. *Neurology.* 73(17):1424-5.
209. Sidransky E. (2004) Gaucher disease: complexity in a "simple" disorder. *Mol Genet Metab.* 83(1-2):6-15.
210. Silva, B, Martins, R, Proença D, Fleming R, Faustino P. (2012) The functional significance of E277K and V295A *HFE* mutations. *British Journal of Haematology*, 158: 399-408.
211. Sobreira E, Pires RF, Cizmarik M, Grabowski GA. (2007) Phenotypic and genotypic heterogeneity in Gaucher disease type 1: a comparison between Brazil and the rest of the world. *Mol Genet Metab.* 90(1):81-6.
212. Sorge J, Gelbart T, West C, Westwood B, Beutler E. (1985a) Heterogeneity in type I Gaucher disease demonstrated by restriction mapping of the gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 82(16):5442-5.
213. Sorge J, Gross E, West C, Beutler E. (1990) High level transcription of the glucocerebrosidase pseudogene in normal subjects and patients with Gaucher disease. *J Clin Invest.* 86: 1137-1141
214. Sorge J, Kuhl W, West C, Beutler E. (1987) Complete correction of the enzymatic defect of type I Gaucher disease fibroblasts by retroviral-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84(4):906-9.
215. Sorge J, West C, Westwood B, Beutler E. (1985b) Molecular cloning and nucleotide sequence of human glucocerebrosidase cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 82(21):7289-93.
216. Stahl PD, Rodman JS, Miller MJ, Schlesinger PH. (1978) Evidence for receptor-mediated binding of glycoproteins, glycoconjugates, and lysosomal glycosidases by alveolar macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA.* 75(3):1399-403.
217. Stein P, Yu H, Jain D, Mistry PK. (2010) Hyperferritinemia and iron overload in type 1 Gaucher disease. *Am J Hematol.* 85(7):472-6.
218. Stenson PD, Mort M, Ball EV, Howells K, Phillips AD, Thomas NS, Cooper DN. (2009) The Human Gene Mutation Database: 2008 update. *Genome Med.* 1(1):13.
219. Stirnemann J, Belmatoug N, Camou F, Serratrice C, Froissart R, Caillaud C, Levade T, Astudillo L, Serratrice J, Brassier A, Rose C, Billette de Villemeur T, Berger M. (2017) A Review of Gaucher Disease Pathophysiology, Clinical Presentation and Treatments. *Int J Mol Sci.* 18(2). pii: E441.
220. Stirnemann J, Belmatoug N, Vincent C, Fain O, Fantin B, Mentré F. (2010) Bone events and evolution of biologic markers in Gaucher disease before and during treatment. *Arthritis Res Ther.* 12(4):R156.
221. Stirnemann J, Boutten A, Vincent C, Mekinian A, Heraoui D, Fantin B, Fain O, Mentré F, Belmatoug N (2011) Impact of imiglucerase on the serum glycosylated-ferritin level in Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis.* 46(1):34-8.
222. Strimbu K, Tavel J. (2010) What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS.* 5(6):463-6.

223. Suzuki Y, Yoshida K, Aburakawa Y, Kuroda K, Kimura T, Terada T, Kono S, Miyajima H, Yahara O. (2013) Effectiveness of oral iron chelator treatment with deferasirox in an aceruloplasminemia patient with a novel ceruloplasmin gene mutation. *Intern Med.* 52 (13):1527-30.
224. Syed BA, Beaumont NJ, Patel A, Naylor CE, Bayele HK, Joannou CL, Rowe PSN, Evans RW, Srai SKS. (2002) Analysis of the human hephaestin gene and protein: comparative modelling of the N-terminus ecto-domain based upon ceruloplasmin. *Prot. Eng.* 5(3):205-214.
225. Takahashi Y, Miyajima H, Shirabe S, Nagataki S, Suenaga A, Gitlin JD. (1996) Characterization of a nonsense mutation in the ceruloplasmin gene resulting in diabetes and neurodegenerative disease. *Hum. Molec. Genet.* 5: 81-84.
226. Tanner MA, Galanello R, Dessi C, Smith GC, Westwood MA, Agus A, Roughton M, Assomull R, Nair SV, Walker JM, Pennell DJ. (2007) A randomized, placebo-controlled, double-blind trial of the effect of combined therapy with deferoxamine and deferiprone on myocardial iron in thalassemia major using cardiovascular magnetic resonance. *Circulation.* 115(14):1876-84.
227. Thomas A, Mehta A, Hughes D. (2014) Gaucher disease: haematological presentations and complications. *Br J Haematol.* 165(4):427-40.
228. Thomas AS, Mehta AB, Hughes DA. (2013) Diagnosing Gaucher disease: an on-going need for increased awareness amongst haematologists. *Blood Cells Mol Dis.* 50(3):212-7.
229. Trams EG & Brady RO. (1960) Cerebroside synthesis in Gaucher's disease. *J Clin Invest.* 39:1546-50.
230. Tsuji S, Choudary PV, Martin BM, Stubblefield BK, Mayor JA, Barranger JA, Ginns EI. (1987) A mutation in the human glucocerebrosidase gene in neuronopathic Gaucher's disease. *N Engl J Med.* 316(10):570-5.
231. Tsuji S, Martin BM, Barranger JA, Stubblefield BK, LaMarca ME, Ginns EI. (1988) Genetic heterogeneity in type 1 Gaucher disease: multiple genotypes in Ashkenazic and non-Ashkenazic individuals. *Proc Natl Acad Sci USA.* 85(7):2349-52.
232. Tuchman LR, Suna H, Carr JJ. (1956) Elevation of serum acid phosphatase in Gaucher's disease. *J Mt Sinai Hosp N Y.* 23(2):227-9.
233. U.S. National Library of Medicine, National Center for Biomedical Communications, National Institutes of Health Department of Health & Human Services. Genetics Home Reference: GBA gene. URL: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/GBA#resources>. Acessado em 02/05/2017.
234. Vachette P, Dainese E, Vasyliov VB, et al. (2002) A key structural role for active site type 3 copper ions in human ceruloplasmin. *J Biol Chem* 277: 40823-40831.
235. van Meer G & Lisman Q. (2002) Sphingolipid transport: rafts and translocators. *J Biol Chem.* 277(29):25855-8.
236. van Weely S, Brandsma M, Strijland A, Tager JM, Aerts JM. (1993) Demonstration of the existence of a second, non-lysosomal glucocerebrosidase that is not deficient in Gaucher disease. *Biochim Biophys Acta.* 1181(1):55-62.
237. Vignes S, Le Moël G, Fautrel B, Wechsler B, Godeau P, Piette JC. (2000) Percentage of glycosylated serum ferritin remains low throughout the course of adult onset Still's disease. *Ann Rheum Dis.* 59(5):347-50.
238. Vignes S, Le Moël G, Fautrel B, Wechsler B, Godeau P, Piette JC. (2000) Percentage of glycosylated serum ferritin remains low throughout the course of adult onset Still's disease. *Ann Rheum Dis.* 59(5):347-50.

239. Vulpe CD, Kuo YM, Murphy TL, Cowley L, Askwith C, Libina N, Gitschier J, Anderson GJ. (1999) *Nat Genet.* 21:195–199.
240. Weinreb N, Barranger J, Packman S, Prakash-Cheng A, Rosenbloom B, Sims K, Angell J, Skrinar A, Pastores GM. (2007) Imiglucerase (Cerezyme) improves quality of life in patients with skeletal manifestations of Gaucher disease. *Clin Genet.* 71(6):576-88.
241. Weinreb NJ, Brady RO, Tappel AL. (1968) The lysosomal localization of sphingolipid hydrolases. *Biochim Biophys Acta.* 59(1):141-6.
242. Weinreb NJ, Cappellini MD, Cox TM, Giannini EH, Grabowski GA, Hwu WL, Mankin H, Martins AM, Sawyer C, vom Dahl S, Yeh MS, Zimran A. (2010) A validated disease severity scoring system for adults with type 1 Gaucher disease. *Genet Med.* 12(1):44-51.
243. Weinreb NJ, Deegan P, Kacena KA, Mistry P, Pastores GM, Velentgas P, vom Dahl S. (2008) Life expectancy in Gaucher disease type 1. *Am J Hematol.* 83(12):896-900.
244. Weinreb NJ, Goldblatt J, Villalobos J, Charrow J, Cole JA, Kerstenetzky M, vom Dahl S, Hollak C. (2013) Long-term clinical outcomes in type 1 Gaucher disease following 10 years of imiglucerase treatment. *J Inher Metab Dis.* 36(3):543-53.
245. Weisberger J, Emmons F, Gorczyca W. (2004) Cytochemical diagnosis of Gaucher's disease by iron stain. *Br J Haematol.* 124(6):696.
246. Wenstrup RJ, Roca-Espiau M, Weinreb NJ, Bembi B. (2002) Skeletal aspects of Gaucher disease: a review. *Br J Radiol.* 75 Suppl 1:A2-12.
247. Westbroek W, Nguyen M, Siebert M, Lindstrom T, Burnett R, Aflaki E, Jung O, Tamargo R, Rodriguez-Gil J, Acosta W, Hendrix A, Behre B, Tayebi N, Fujiwara H, Sidhu R, Renvoise B, Ginns EI, Dutra A, Pak E, Cramer C, Ory D, Pavan W, Sidransky E. (2016) A new glucocerebrosidase-deficient neuronal cell model provides a tool to probe pathophysiology and therapeutics for Gaucher disease. *Dis Model Mech.* 9(7):769-78.
248. Westwood MA, Anderson LJ, Firmin DN, Gatehouse PD, Lorenz CH, Wonke B, Pennell DJ. (2003) Interscanner reproducibility of cardiovascular magnetic resonance T2* measurements of tissue iron in thalassemia. *J Magn Reson Imaging.* 18(5):616-20.
249. Westwood MA, Firmin DN, Gildo M, Renzo G, Stathis G, Markissia K, Vasili B, Pennell DJ. (2005a) Intercentre reproducibility of magnetic resonance T2* measurements of myocardial iron in thalassaemia. *Int J Cardiovasc Imaging.* 21(5):531-8.
250. Westwood MA, Sheppard MN, Awogbade M, Ellis G, Stephens AD, Pennell DJ. (2005b) Myocardial biopsy and T2* magnetic resonance in heart failure due to thalassaemia. *Br J Haematol.* 128(1):2.
251. Whitfield PD, Nelson P, Sharp PC, Bindloss CA, Dean C, Ravenscroft EM, Fong BA, Fietz MJ, Hopwood JJ, Meikle PJ. (2002) Correlation among genotype, phenotype, and biochemical markers in Gaucher disease: implications for the prediction of disease severity. *Mol Genet Metab.* 75(1):46-55.
252. WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION (2010). International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th Revision – ICD-10. Disponível em: <<http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2010/en>> Acesso em: 27 ago. 2013.
253. Wine E, Yaniv I, Cohen IJ. (2007) Hyperimmunoglobulinemia in pediatric-onset type 1 Gaucher disease and effects of enzyme replacement therapy. *J Pediatr Hematol Oncol.* 29:451–7.
254. Wong J, Sridharan S, Berdeprado J, Vilar E, Viljoen A, Wellsted D, Farrington K. (2016) Predicting residual kidney function in hemodialysis patients using serum β -trace protein and β 2-microglobulin. *Kidney Int.* 89(5):1090-8.

255. Wood JC, Otto-Duessel M, Aguilar M, Nick H, Nelson MD, Coates TD, Pollack H, Moats R. (2005) Cardiac iron determines cardiac T2*, T2, and T1 in the gerbil model of iron cardiomyopathy. *Circulation*. 112(4):535-43.
256. Worwood M, Brook J D, Cragg S J, Hellkuhl B, Jones BM, Perera P, Roberts SH, Shaw D J. (1985) Assignment of human ferritin genes to chromosomes 11 and 19q13.3-19qter. *Hum. Genet.* 69: 371-374.
257. Worwood M, Cragg SJ, Wagstaff M, Jacobs A. (1979) Binding of human serum ferritin to concanavalin A. *Clin Sci (Lond)*. 56(1):83-7.
258. Yoshida K, Furihata K, Takeda S, Nakamura A, Yamamoto K, Morita H, Hiyamuta S, Ikeda S, Shimizu N, Yanagisawa N. (1995) A mutation in the ceruloplasmin gene is associated with systemic hemosiderosis in humans. *Nature Genet.* 9: 267-272.
259. Zhao N, Zhang AS, Enns CA. (2013) Iron regulation by hepcidin. *J Clin Invest* 123(6): 2337-43.
260. Zimran A, Gelbart T, Westwood B, Grabowski GA, Beutler E. (1991) High frequency of the Gaucher disease mutation at nucleotide 1226 among Ashkenazi Jews. *Am J Hum Genet.* 49(4):855-9.
261. Zimran A, Sorge J, Gross E, Kubitz M, West C, Beutler E. (1989) Prediction of severity of Gaucher's disease by identification of mutations at DNA level. *Lancet.* 2(8659):349-52.