

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

**QUANTIFICAÇÃO DE GLICOSILCERAMIDA EM PLASMA DE PACIENTES**  
**COM A DOENÇA DE GAUCHER**

Tese de Doutorado

**Maria Viviane Gomes Müller**

**Porto Alegre**

**2010**

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

**QUANTIFICAÇÃO DE GLICOSILCERAMIDA EM PLASMA DE PACIENTES**  
**COM A DOENÇA DE GAUCHER**

**Maria Viviane Gomes Müller**

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Janice Carneiro Coelho

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em  
Ciências Biológicas: Bioquímica – Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul – como parte dos  
requisitos para a obtenção do título de Doutor em  
Bioquímica

## **AGRADECIMENTOS**

À orientadora Dra. Janice Carneiro Coelho, pela disponibilidade, colaboração e dedicação na condução e realização do trabalho; pela amizade, estímulo e ensinamentos transmitidos.

À co-orientadora Dra. Vera Maria Treis Trindade por me receber com carinho permitindo que este trabalho fosse desenvolvido em seu laboratório, e por ter contribuído de modo ímpar para o complemento de minha formação.

Aos meus amigos Alexandre Mello, Cristina Castilhos, Tarik Costa, Franciane Mendes, Jamila Mezzalira, Mariana Goldim e Fernanda Timm pelo carinho, convivência e auxílio em muitas etapas deste trabalho.

À minha amiga Kristiane Michelin-Tirelli, com destaque, pelo auxílio incessante na busca e no fornecimento de plasma de pacientes com Gaucher, bem como pelo incansável auxílio gráfico e intelectual.

Aos meus queridos colegas do laboratório 25, em especial Ana C. Breier, Fernando Kreut e Luciene P. Vianna, pela amizade e pelos valiosos momentos de convivência.

Ao querido amigo e estagiário do laboratório 25 André Petry, que chegou para aprender e acabou ensinando detalhes fundamentais na condução e na finalização desta pesquisa.

Aos funcionários do departamento de Bioquímica, na pessoa da Cléia, secretária do curso de Pós-Graduação, pelos auxílios recebidos.

Ao Dr. Fernando Irazoqui - Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba - Republica Argentina (CIQUIBIC, UNC-CONICET), pelo apoio e embasamento teórico/prático na imunorevelação.

A ajuda também fundamental da pesquisadora Patrícia Nardin por seu auxílio com a CCL18/PARC, bem como ao seu orientador Dr. Carlos A. Saraiva Gonçalves;

Ao meu esposo e minha filha, a quem dedico este trabalho, pelo carinho, paciência, compreensão e diuturno estímulo recebido.

A FAPERGS, CNPq e GPPG-HCPA pelo auxílio financeiro.

<b>SUMÁRIO</b>	<b>Página</b>
<b>Agradecimentos.....</b>	<b>III</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>1</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>2</b>
<b>Lista de Abreviaturas e Siglas.....</b>	<b>3</b>
<b>1.INTRODUÇÃO.....</b>	<b>4</b>
1.1. Erros inatos do metabolismo.....	4
1.1.1. As doenças lisossômicas de depósito (DLDs).....	5
1.1.2. Glicosfingolipídios.....	9
1.1.3. Vias metabólicas dos GSLs.....	13
1.1.4. A Doença de Gaucher.....	18
1.1.4.1. Aspectos patofisiológicos e genéticos da DG.....	20
1.1.4.2. Diagnóstico da Doença de Gaucher.....	23
1.1.4.3. Tratamento na Doença de Gaucher.....	23
1.1.4.4. Marcadores para doença de Gaucher.....	28
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
3.1. Amostras.....	31
3.1.1. Critérios de inclusão.....	31
3.1.2. Critérios de exclusão.....	32

<b>SUMÁRIO</b>	<b>Página</b>
3.2. Grupo de estudos.....	<b>32</b>
3.3. Material Biológico.....	<b>33</b>
3.3.1. Coleta, processamento e armazenamento do material biológico.....	<b>33</b>
3.3.1. Coleta de sangue.....	<b>33</b>
3.3.2. Processamento e armazenamento do plasma.....	<b>33</b>
3.3.3. Processamento e armazenamento dos leucócitos.....	<b>33</b>
3.4. ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	<b>34</b>
3.4.1. Medida da atividade da enzima $\beta$ -glicosidase em leucócitos.....	<b>34</b>
3.4.2. Medida da atividade da enzima quitotriosidase em plasma.....	<b>34</b>
3.4.3. Dosagem de proteínas.....	<b>35</b>
3.4.4. Análise quantitativa de glicosilceramida.....	<b>35</b>
3.4.4.1. Extração lipídica total.....	<b>37</b>
3.4.4.2. Purificação de Glicosilceramida.....	<b>37</b>
3.4.5. Quantificação da quemoquina CCL18/PARC.....	<b>40</b>
3.4.5.1. Preparação das placas.....	<b>40</b>
3.4.5.2. Procedimento para preparação e deposição das amostras e Curva padrão.....	<b>41</b>
3.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	<b>42</b>

<b>SUMÁRIO</b>	<b>Página</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
4.1. Análises enzimáticas.....	43
4.1.1. Atividade da enzima $\beta$ -glicosidase em leucócitos.....	43
4.1.2. Atividade da enzima quitotriosidase em plasma.....	44
4.2. Determinação quantitativa de glicosilceramida em plasma.....	45
4.2.1. Padronização da metodologia de extração, purificação, separação, detecção e quantificação de glicosilceramida.....	45
4.2.2. Quantificação de glicosilceramida em pacientes com e sem tratamento por reposição enzimática.....	52
4.3. Quantificação da quemoquina CCL18/PARC.....	54
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>56</b>
<b>6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>69</b>
6.1. Conclusões.....	69
6.2. Perspectivas.....	73
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>74</b>
<b>8. LISTA DE TABELAS E FIGURAS.....</b>	<b>92</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>95</b>
Anexo 1: Aprovação do Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.....	96
Anexo 2 Termo de consentimento livre e esclarecido.....	97
Anexo 3: Carta de aceite e publicação do artigo.....	98
Anexo 4: Artigo a ser publicado.....	99

## RESUMO

A Doença de Gaucher (DG) é uma esfingolipidose causada por mutações no gene da  $\beta$ -glicosidase, ocasionando depósito lisossomal de glicosilceramida (GliCer), principalmente, nas células do sistema mononuclear fagocitário. O diagnóstico da DG é, normalmente, confirmado pela determinação enzimática e/ou pela caracterização molecular. Neste trabalho nos propusemos a: (1) confirmar o diagnóstico de uma amostra de indivíduos com DG através da medida da atividade da  $\beta$ -glicosidase e da quitotriosidase (QT); (2) extrair, purificar e quantificar a GliCer de plasma de pacientes com DG com e sem tratamento por reposição enzimática (TRE) e de indivíduos normais, comparando o conteúdo deste lipídio entre os grupos mencionados e (3) comparar a concentração plasmática da quemoquina CCL18/PARC entre os 3 grupos acima. Os leucócitos e o plasma de cada indivíduo foram separados por centrifugação. A atividade da  $\beta$ -glicosidase em leucócitos dos pacientes com DG foi 5% daquela de indivíduos normais e a quitotriosidase estava 500 vezes aumentada nos pacientes com DG. O plasma de cada indivíduo foi tratado, seqüencialmente, com três sistemas de solventes: clorofórmio (C): metanol (M) em três proporções distintas. Os três extratos lipídicos totais de cada amostra foram reunidos (extrato lipídico total) e evaporados a seco (resíduo). Este resíduo de extrato lipídico total foi submetido, seqüencialmente, a uma coluna de ácido silícico, à metanólise alcalina e a uma coluna Sep-Pack<sup>®</sup>. Desta coluna resultaram os eluatos C:M:água (3:48:47) e (60:30:4,5). Após ajustes necessários obtivemos a purificação de glicosilceramida numa única fração. A análise destes eluatos por cromatografia em camada delgada de alta resolução (HPTLC) e com revelação química ( $\text{CuSO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ ) mostrou que ambos continham uma banda com velocidade de migração semelhante a do padrão de GliCer. A confirmação da identidade desta banda foi realizada por imunorevelação usando anticorpo primário anti-GliCer e secundário conjugado a peroxidase. Pacientes com DG sem tratamento por TRE apresentaram, aproximadamente, 20 vezes mais GliCer que indivíduos normais e 11 vezes mais que pacientes com tratamento. Com a dosagem plasmática da quemoquina CCL18/PARC, observamos que pacientes com DG possuíam uma concentração da mesma 28 vezes aumentada em relação aos indivíduos normais e 17 vezes mais elevada que a de pacientes com tratamento. Ou seja, podemos detectar uma redução de 90% da concentração de GliCer e de 40% na concentração de CCL18/PARC nos pacientes com DG com TRE em comparação com as respectivas concentrações nos paciente com DG sem tratamento. A metodologia estabelecida neste trabalho permitiu extrair, purificar, separar, detectar e quantificar GliCer no plasma de pacientes com DG com e sem tratamento por TRE, bem como, GliCer de indivíduos normais. Tanto a quantificação da GliCer quanto a dosagem de CCL18/PARC permitiram identificar, através dos respectivos valores obtidos de plasma, os grupos de indivíduos analisados. Portanto, estas duas avaliações podem ser associadas à determinação da atividade da quitotriosidase como biomarcadores da DG.

## ABSTRACT

Gaucher's disease (GD) is a sphingolipidosis caused by mutations in the  $\beta$ -glucosidase gene, causing lysosomal storage of glucosylceramide (GluCer) mainly in the mononuclear phagocyte system cells. As a rule, GD diagnosis is confirmed by enzyme determination and/or molecular characterization. The objectives of the present study were (1) to confirm GD diagnosis in a sample of subjects by measuring  $\beta$ -glucosidase activity and chitotriosidase activity, (2) to extract, purify and quantify GluCer in the plasma of patients with GD with and without enzyme replacement therapy (ERT) and of healthy individuals, comparing the content of the lipid between the groups, and (3) to compare the plasma concentration of chemokine CCL18/PARC between the three groups. Plasma of each individual was centrifuged to obtain leukocytes.  $\beta$ -glucosidase activity in leukocytes of patients with GD represented a 5% share of that of healthy individuals, while chitotriosidase activity was 500 times higher in GD patients. Plasma was treated sequentially with a chloroform:methanol solvent system as three sequential solution ratios. The three total lipid extracts of each sample were pooled (total lipid extract) and evaporated to dryness to obtain a residue. This residue was sequentially treated in a salicylic acid column and a Sep-Pak™ column for alkaline methanolysis, from which two chloroform:methanol:water eluates were obtained (3:48:47 and 60:30:4.5). After the required adjustments, GluCer was purified as a single fraction. High performance thin-layer chromatography (HPTLC) and chemical development using  $\text{CuSO}_4$  and  $\text{H}_3\text{PO}_4$  showed that both eluates had a band whose migration speed was similar to the GluCer standard. Confirmation of this band's identity was conducted by immune development using anti-GluCer primary antibody and peroxidase-conjugated secondary antibody. GluCer levels in DG patients without ERT treatment were approximately 20 times higher than in healthy individuals and 11 times higher than in patients under treatment. Plasma chemokine CCL18/PARC levels in DG patients without treatment were 28 and 17 times higher as compared to healthy and individuals DG patients under treatment, respectively. This accounts for a 90% decrease in GluCer levels and a 40% decrease in CCL18/PARC levels in GD patients with ERT in comparison to DG patients without treatment. The methodology described in this paper afforded to quantify GluCer in plasma of DG individuals with and without ERT as well as GluCer levels in healthy individuals. Quantification of GluCer and CCL18/PARC levels in plasma afforded to identify the groups of individuals analyzed. Therefore, these two parameters may be associated to the determination of chitotriosidase activity as GD biomarkers.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**β-gli:** β-glicosidase

**Cer:** ceramida

**CERT:** proteína de transferência de ceramida

**CCL18/PARC:** Pulmonary and activation – regulated chemokine

**CGaIT:** ceramida galactosiltransferase

**DG:** doença de Gaucher tipo I

**DLD:** doença lisossômica de depósito

**EC:** enzyme classification (classificação das enzimas)

**EIM:** Erros Inatos do Metabolismo

**EET:** *Enzyme Enhancement Therapy*

**EMA:** *European Medicines Agency*

**FDA:** *Food and Drug Administration*

**Gal:** galactose

**GalCer:** galactosilceramida

**HPLC:** cromatografia líquida de alta performance

**IL-1:** interleucina 1

**LacCer:** lactosilceramida

**M6P:** manose-6-fosfato

**NB-DNJ:** N-butildeoxinojirimicina

**PCT:** *Pharmacological Chaperone Therapy*

**QT:** quitotriosidase

**SAP:** saposinas

**SPT:** serina-palmitoiltransferase

**TNFα:** fator α de necrose tumoral

**TRE:** Terapia de Reposição Enzimática

**TRS:** Terapia de Redução de Substrato

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. ERROS INATOS DO METABOLISMO

As doenças metabólicas hereditárias são chamadas de Erros Inatos do Metabolismo (EIM), os quais resultam da falta ou deficiência na atividade de uma ou mais enzimas específicas ou do defeito em uma proteína de transporte. Como conseqüências dos EIM, podemos ter o acúmulo de substrato, normalmente presente em concentrações mínimas, a deficiência de produtos intermediários críticos, a deficiência de produtos finais específicos ou ainda o excesso nocivo de produtos de vias metabólicas acessórias (Pollitt et al., 1997; Ballabio, 2009).

Segundo Wappner (1993), os EIM são, na sua grande maioria de herança autossômica recessiva, com risco de 25% a cada gestação de pais heterozigotos. Alguns são ligados ao cromossoma X, sendo o risco de recorrência de 50% a cada gestação para o sexo masculino e de 50% das filhas serem portadoras. Existem ainda as heranças mitocondriais, onde o risco de recorrência é de praticamente 100% para filhos de ambos os sexos. A incidência individual de cada EIM, de acordo com o autor, é relatada como rara, entretanto quando analisados conjuntamente é de 1:5000 recém nascidos vivos, sendo assim, o diagnóstico precoce e tratamento adequado, podem reverter sintomas agudos e prevenir danos crônicos.

Martins (1999) escreve que, em decorrência da heterogeneidade metabólica, os EIM apresentam uma variedade na sua classificação. Entretanto, segundo a autora, aquela estabelecida por Saudubray e Charpentier (1995) é ainda a mais didática e de maior aplicação clínica. Nesta classificação, os EIM dividem-se em três grandes grupos de acordo com o fenótipo clínico da doença: grupo 1 engloba os distúrbios na síntese ou catabolismo de moléculas complexas ou macromoléculas. Os sintomas são permanentes, progressivos, independentes de eventos

intercorrentes, como infecções, e não estão relacionados à ingestão alimentar. Fazem parte deste grupo as doenças de depósito lisossômico e as peroxissomiais; no grupo 2 temos os erros inatos do metabolismo intermediário, que levam à intoxicação aguda e recorrente ou crônica e progressiva. Fazem parte deste grupo as aminoacidopatias, os defeitos dos ácidos orgânicos e do ciclo da uréia e as intolerâncias aos açúcares e no grupo 3 encontramos a deficiência na produção ou utilização de energia resultante de erros inatos do metabolismo intermediário no fígado, miocárdio, músculo ou cérebro. Este grupo inclui as doenças de depósito do glicogênio, defeitos na gliconeogênese, hiperlactemias congênitas, defeitos na oxidação dos ácidos graxos e doenças mitocondriais da cadeia respiratória.

#### **1.1.1. As doenças lisossômicas de depósito (DLDs)**

A importância fisiológica das vias degradativas é revelada pela existência de no mínimo 50 EIM classificados como Doenças Lisossômicas de Depósito (DLDs) (Neufeld, 1991; Wilcox, 1995; Aerts et al., 2003). Os autores argumentam que a maioria destas doenças ocorre devido a vários fatores entre eles a deficiência enzimática lisossomal, transporte insuficiente dos substratos a serem hidrolisados ou dos produtos de hidrólise através da membrana lisossomal, a ausência de cofatores essenciais ou o defeito de proteínas ativadoras das esfingolipidases.

As DLDs, de acordo com o substrato acumulado conforme os fatores citados acima são agrupadas em mucopolissacaridoses, esfingolipidoses, mucolipidoses, lipidoses, glicoproteinoses, glicogenoses e lipofucinoses (Neufeld, 1991). As DLDs são individualmente raras na população, com menos de 5 casos em cada 10.000 nascimentos, mas em conjunto têm uma incidência de aproximadamente 1 caso

para cada 800 nascidos vivos, representando uma difícil situação econômica e social (Danks, 1981; Meikle et al., 1999; Ballabio, 2009).

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

Parenti (2009) também relata que as DLDs são caracterizadas pelo envolvimento de múltiplos tecidos e órgãos o que ocasiona fenótipos heterogêneos. Entre as manifestações clínicas, as relacionados ao sistema nervoso central (SNC) com neurodegeneração progressiva e disfunção cognitiva, são altamente debilitantes.

Para a maioria das DLDs, o processo anormal de depósito inicia no feto durante a gravidez e torna-se clinicamente evidente nos primeiros dois anos de vida, mas existem várias situações de início tardio. As DLDs são progressivas, graves e predominantemente incuráveis. Para a maioria delas, o diagnóstico permite apenas medidas preventivas como o aconselhamento genético, a detecção de heterozigotos e o diagnóstico pré-natal (Ballabio, 2009).

As enzimas lisossômicas são sintetizadas em polissomos ligados à membrana do retículo endoplasmático rugoso (RER) e glicosiladas através da transferência de oligossacarídios provenientes de dolicol-P-oligossacarídios. No RER, o peptídeo sinalizador é removido e as proteínas são translocadas para o Complexo de Golgi onde ocorre fosforilação dos oligossacarídios. A fosforilação de certos resíduos de manose de enzimas hidrossolúveis é um processo que, entre outros resultados, culmina na criação dos sítios de reconhecimento do receptor manose-6-fosfato (M6P). Em uma primeira etapa, N-acetilglicosamina-1-fosfato é adicionado a um ou dois grupos de manose presentes nas cadeias de oligossacarídios através da ação de uma fosfotransferase. Em uma segunda etapa, os grupamentos N-acetilglicosamina são removidos por uma fosfoglicosidase expondo resíduos de M6P. A unidade M6P é reconhecida por receptores presentes na membrana do Complexo de Golgi, favorecendo a ligação destas glicoproteínas aos receptores. Embora sistemas de transporte independentes de M6P existam na maioria dos tipos celulares, a via de transporte e reconhecimento por receptores M6P é o principal meio de distinção das enzimas lisossômicas de outras enzimas secretadas (Kornfeld, 1987; Nadimpalli e Amancha, 2010).

As vesículas contendo glicoproteínas ligadas a receptores surgem do Complexo de Golgi e ligam-se a vesículas pré-lisossômicas, as quais são mais ácidas que as provenientes do Complexo de Golgi. Esta diminuição do pH promove a dissociação da glicoproteína de seu receptor, estes pré-lisossomos se fundem a lisossomos maduros recebendo suas enzimas. Neste ponto os receptores de M6P retornam ao Complexo de Golgi através de grupo diferente de vesículas (Kornfeld, 1987).

O receptor M6P que se dissocia da enzima é reciclado podendo ser utilizado várias vezes. Caso não ocorra acidificação, não há dissociação do complexo enzima-receptor e conseqüentemente o receptor M6P não retorna ao Complexo de Golgi. Na carência do receptor, glicoproteínas que deveriam ter como destino os lisossomos continuam na via de secreção e são liberadas (Kornfeld, 1987).

Segundo Nadimpalli e Amancha (2010) em seres humanos, a ausência deste sistema de reconhecimento pode levar a graves doenças do armazenamento lisossomal, enfatizando seu papel essencial na biogênese dos lisossomas.

### **1.1.2. Glicosfingolípídios (GSLs)**

Os glicosfingolípídios (GSLs) são componentes essenciais da membrana de células eucarióticas. Eles são sintetizados no retículo endoplasmático e no Complexo de Golgi. Localizados principalmente na camada externa da membrana plasmática são internalizados por endocitose e são degradados dentro dos lisossomos (Sillence e Platt, 2004).

Os GSLs colaboram nas propriedades físico-químicas da membrana celular. Eles apresentam cerca de 300 estruturas diferentes entre si e são compostos de pelo menos um resíduo de monossacarídeo glicosidicamente ligado a um aminoálcool ceramida - esfingosina ligada a um ácido graxo - (Figura 1) (Degroote et al., 2004; Wenneks et al., 2009; Xu et al., 2010).

Pela diversidade do núcleo estrutural da porção glicídica, os glicosfingolípídeos podem ser agrupados em classes distintas (Schwarzmann, 2001; Wenneks et al., 2009; Xu et al., 2010). Assim, são classificados em ácidos ou neutros, baseado na presença ou ausência de grupamentos carregados negativamente na molécula de açúcar (Li e Li, 1999). Em glicosfingolípídios neutros, a porção hidrofílica contém geralmente glicose, galactose, N-acetilgalactosamina, N-acetilglicosamina ou fucose, sendo formada por um ou mais resíduos destas oses. Em glicosfingolípídios ácidos, o núcleo glicídico está ligado a um grupo sulfato, formando os sulfatídeos (Masserini e Ravasi, 2001; Xu et al., 2010) ou estar ligado a um ou mais resíduos de ácido siálico, formando assim os gangliosídeos (Allende e Proia, 2002; Xu et al., 2010).

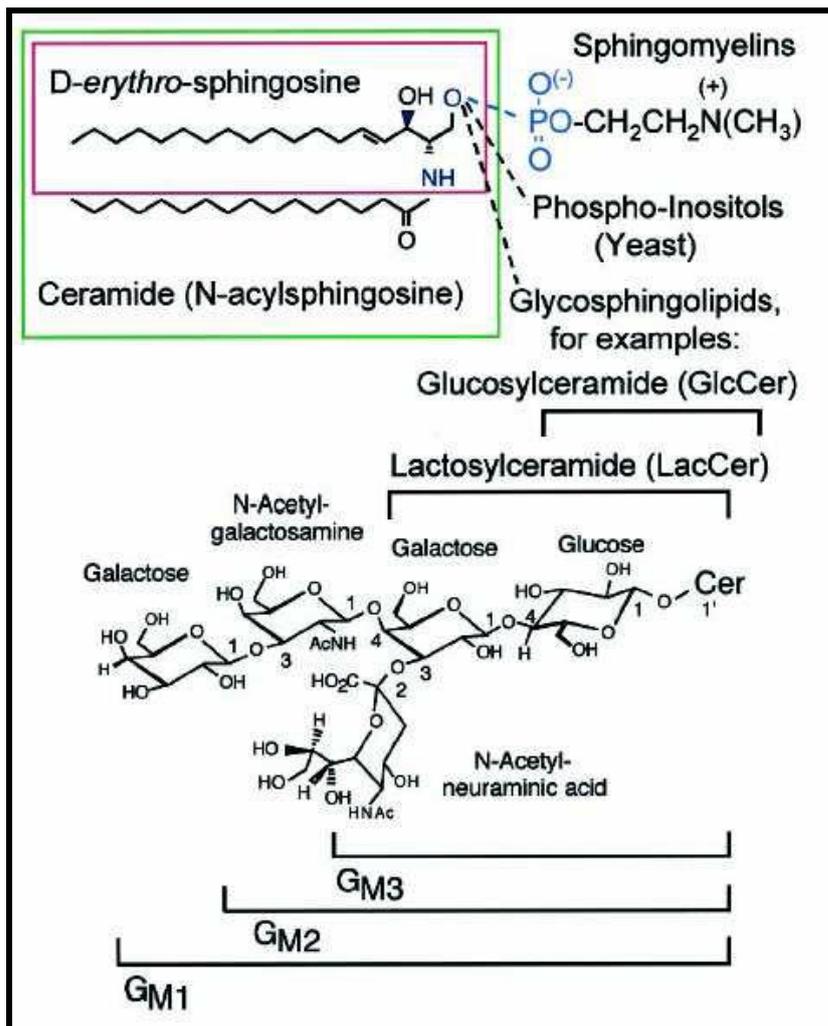


FIGURA 1. Estrutura dos esfingolipídios mais comuns. A esfingosina (no inglês *D-erythro-sphingosine*) é mostrada no quadro vermelho, com a cadeia acila formando a ceramida (no inglês *ceramide* ou *N-acylsphingosine*) no quadro em verde, e o grupo fosfato (em azul), formando esfingosina-1-fosfato. Modificações na região polar formam os esfingolipídios complexos.

*Sphigomyelins*: esfingomielina; *Phospho-inositols (Yeast)*: fosfoinositóis (leveduras); *Glycosphingolipids*: glicoesfingolipídios, como exemplo são mostradas as estruturas que dão origem à glicosilceramida (*glucosylceramide*), lactosilceramida (*lactosylceramide*) onde podem ser identificadas as moléculas de glicose (*glucose*), galactose e a acetilgalactosamina (*N-acetyl-galactosamine*). A adição de um ácido silálico (*N-acetylneuraminic acid*) dá origem aos gangliosídeos GM3, GM2 e GM1. Fonte: Smith e Merrill, 2002.

A presença destas moléculas na membrana plasmática enriquece a superfície externa da camada de carboidratos deixando-a mais rígida e auxiliando a proteger a membrana de danos químicos e mecânicos (Chester, 1999). Diversas outras funções dos GSLs como adesão, crescimento, regulação e diferenciação celular têm sido observadas *in vitro* (Yamashita et al., 1999; Sandhoff e Kolter, 2003).

Considerando o metabolismo de glicosfingolípídios tendo como molécula central a Ceramida (Cer), três vias específicas podem ser descritas, como observado na Figura 2, todas elas interligadas: (1) síntese de esfingolípídios pela via “*de novo*”, no retículo sarco(endo)plasmático (ER), através da condensação de uma serina com um ácido palmítico, dando origem a uma base esfingóide; (2) via de síntese de esfingolípídios complexos, que ocorre no aparelho e Golgi, e tem como molécula precursora a ceramida (Cer); e (3) degradação desses esfingolípídios complexos (principalmente nos lisossomas esfingomiéline e os glicosfingolípídios) à Cer e a posterior metabolização desta em outras bases esfingóides (Hannun e Obeid, 2002; Hannun et al., 2001; Kolesnick, 2002; Cowart e Hannun, 2005; Futerman e Riezman, 2005; Kitatani et al., 2009; Xu et al., 2010).

Como todos os constituintes celulares, os GSLs são continuamente sintetizados e degradados. Tanto a via de síntese como a de degradação, contém uma série de enzimas, sendo o produto de uma reação o substrato para próxima. Se umas das enzimas faltar, a molécula não é sintetizada, é imperfeita, ou não é degradada, gerando desordens metabólicas (Sandhoff e Kolter, 2003). Algumas destas desordens metabólicas hereditárias são conhecidas por resultarem de defeitos nas enzimas lisossomais envolvendo a degradação dos GSLs (Yamashita et al., 1999; Furukawa, 2004).

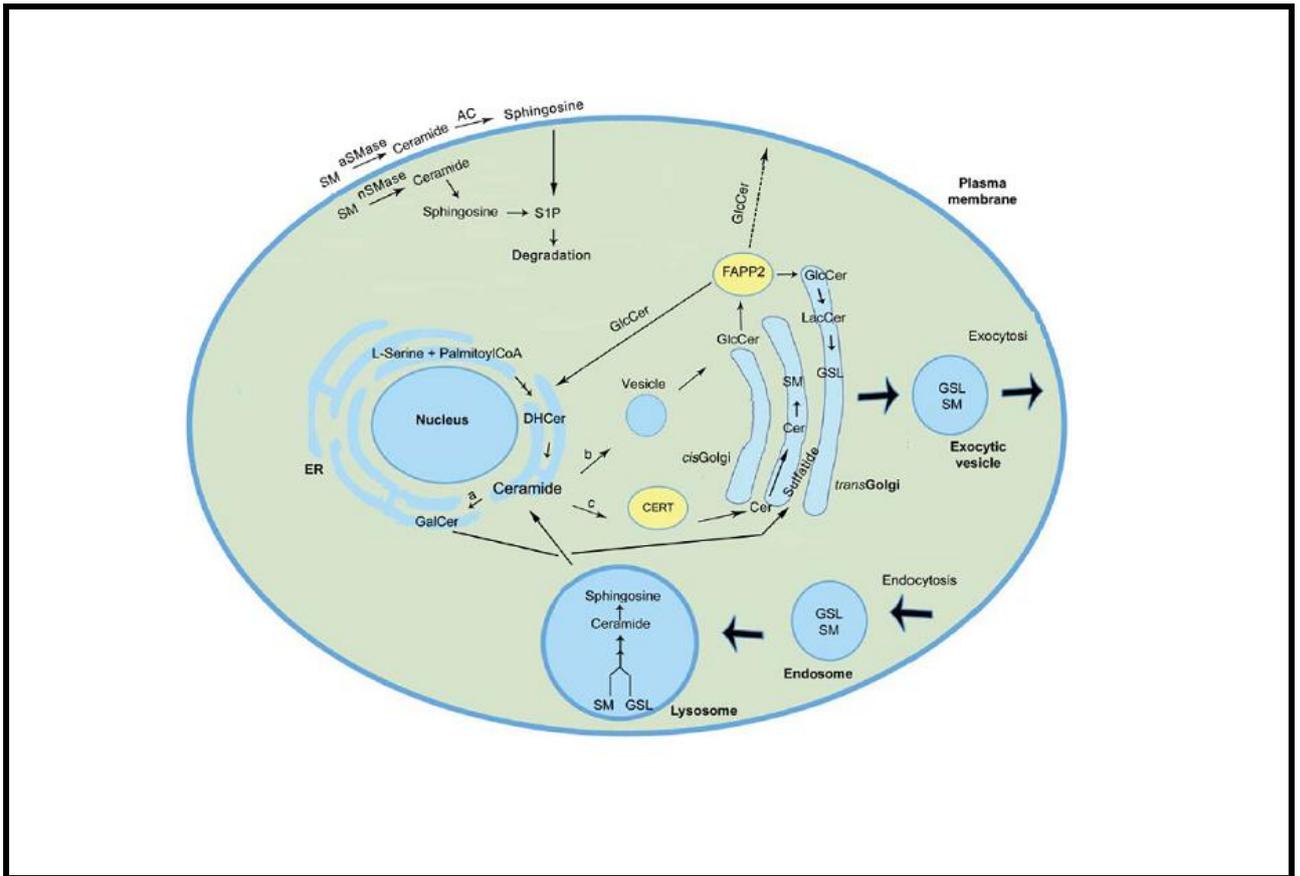


FIGURA 2. Topologia intracelular da biosíntese e fluxo dos GSLs.

Abreviaturas: Cer: ceramida; DHCer: dihydroceramida; S1P; sphingosina 1-fosfato; SM: esfingomielina; aSMase: esfingomielinase ácida; nSMase: esfingomielinase neutra; GlcCer: glicosilceramida; LacCer: lactosilceramida; GSL: glicosíngolípídio; CERT: proteína de transferência de ceramida; FAPP2: proteína adaptadora de fosfato. Fonte: Xu et al., 2010.

A enorme heterogeneidade estrutural entre os glicosíngolípídios se reflete nas diversas funções das diferentes espécies moleculares presentes no organismo. Evidenciam-se, com isso, mecanismos bioquímicos e celulares complexos e altamente organizados, que garantem a regulação dos níveis dessas moléculas, sua interconversão e, conseqüentemente, seu efeito na fisiologia celular (Futerman e Hannun, 2004).

Nas células eucarióticas, GSLs compõem 10 a 20% do total de lipídios, sendo importantes para uma variedade de funções celulares, entre elas podemos destacar

a proteção a danos mecânicos e químicos que as membranas celulares estão expostas. De acordo com Kolter e Sandhorff (2005) e Lahiri e Futerman (2007) outras funções, observadas *in vitro*, estão relacionadas à adesão, crescimento, regulação, apoptose e diferenciação celular. GSLs são transportados para compartimentos intracelulares e membranas plasmáticas enriquecendo microdomínios das bicamadas lipídicas. Durante o *turnover* da membrana plasmática, GSLs podem ser internalizados e, parcialmente ou completamente, degradados no sistema endossomal/lisossomal a esfingosina e ácidos graxos livres, podendo seguir ainda a via de reciclagem para uso como moléculas sinalizadoras (Figura 2).

### 1.1.3. Vias metabólicas dos GSLs

A via de síntese dos glicosfingolípídeos inicia com a condensação de serina e palmitoil-CoA pela serina-palmitoiltransferase (SPT) na face citoplasmática do retículo endoplasmático (RE), levando à síntese *de novo* de ceramida, precursor chave na síntese de vários esfingolípídios e glicosfingolípídios (Figura 2 e Figura 3). A ceramida assim formada pode: a) atuar como precursor para síntese de galactosilceramida (GalCer) no retículo endoplasmático através da enzima ceramida galactosiltransferase (CGalT), b) ser transportada pela proteína de transferência de ceramida (CERT) para face citoplasmática do Golgi e participar da síntese de glicosilceramida (GliCer) pela enzima  $\beta$ -glicosidase ácida ( $\beta$ -gli) e c) atuar na síntese de esfingosina a partir da degradação lisossomal de esfingolípídios (Wenneks et al., 2009; Kitatani et al., 2009; Hanada et al., 2003). Na face trans Golgi, a transferência de  $\beta$ -galactose a glicosilceramida pela lactosilceramida sintetase gera lactosilceramida (LacCer) (Lannert et al., 1994).

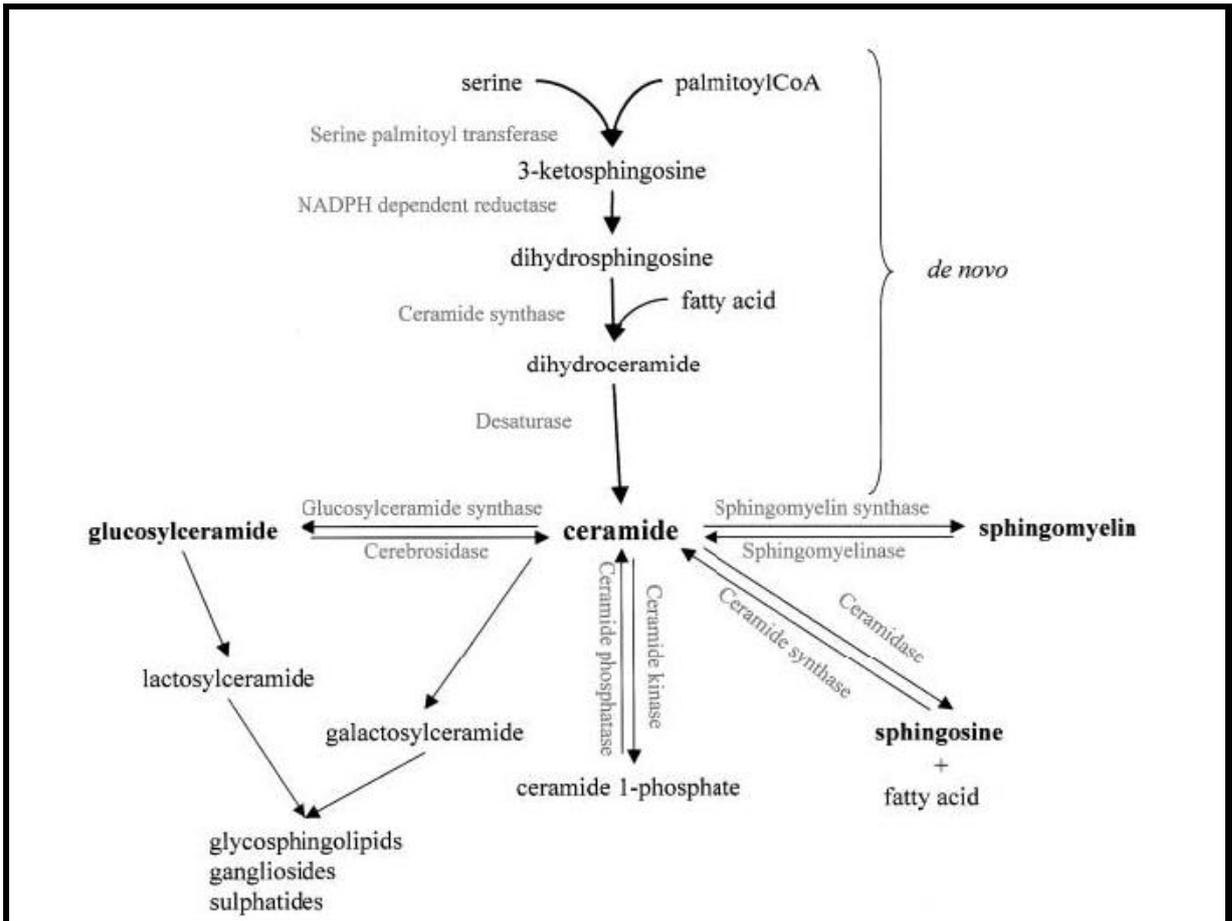


FIGURA 3. Biossíntese de glicosíngolípido (GSLs) em humanos. Fonte: Ohanian e Ohanian, 2001.

Relatado no trabalho de Iwamori e colaboradores (1984), as diferentes classes de GSLs são definidas pela diversidade das várias enzimas que alongam a porção oligossacarídica. A adição de ácido siálico a LacCer pela ação da GM3 sintetase no retículo endoplasmático forma o gangliosídeo GM3, dando início a síntese dos gangliosídeos (série a, b e c) (Figura 3).

Ainda sobre o metabolismo dos glicosíngolípídios, os autores abaixo listados corroboram que as enzimas relacionadas são reguladas em resposta a estímulos extras e intracelulares levando a modulação dos níveis de lipídeos bioativos. Um exemplo desta modulação é a *upregulation* da  $\beta$ -Gli pelo fator  $\alpha$  de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ) e IL-1 no fígado. A inibição da glicocerebrosidase e esfingomielinase por

TNF $\alpha$  foi encontrada em células de rbdomiossarcoma (Bourteele et al., 1998; Huwiler et al., 2000; Walkley e Vanier, 2009).

Huwiler e colaboradores (2000) e Walkley e Vanier (2009) destacam que o modo da regulação coordenada de tais enzimas em respostas a estímulos diversos altera o fluxo de lipídios. Continuando, os autores sustentam que alterações nas múltiplas vias de síntese, degradação e reciclagem dos GSLs podem gerar a produção e acúmulo secundário de GSLs e gangliosídeos, os quais podem contribuir diretamente para a patogênese de muitas doenças de depósito (Figura 4).

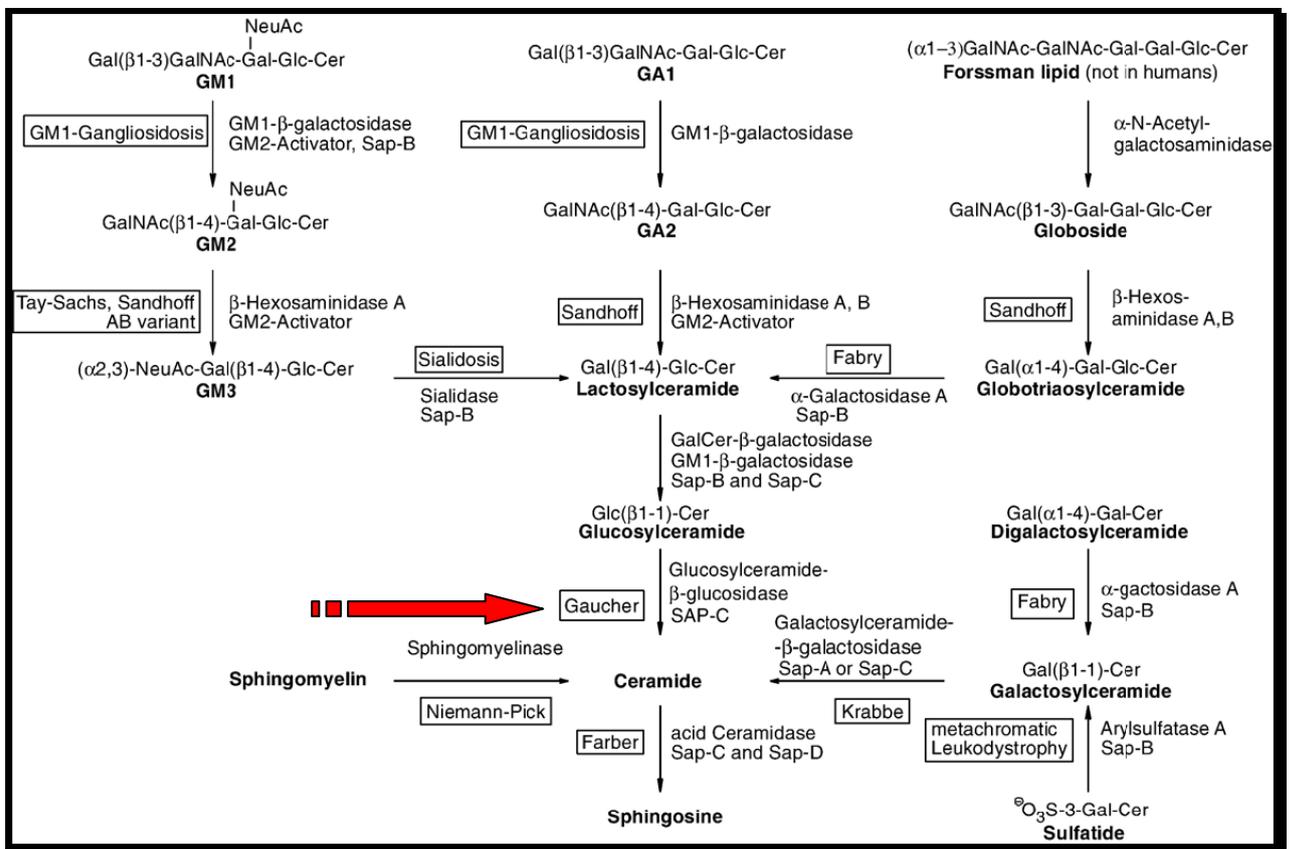


FIGURA 4. Degradação de glicosíngolipídios (GSLs) nos lisossomos humanos: enzimas envolvidas e enzimas relacionadas às doenças de depósito. Fonte: Kolter e Sandhorff, 2006.

O catabolismo de glicosíngolípídios ocorre, predominantemente, em endossomas e lisossomas. O modo como GSLs são direcionados a estes compartimentos variam de acordo com o material a ser processado (Holthuis et al., 2001; Wennekes et al., 2009; Xu et al., 2010). No trabalho de Kolter e Sandhoff (2005) é relatado a endocitose mediada por receptores de lipoproteínas de baixa densidade (LDLs) que direcionam GSLs para o lúmen lisossomal e a fagocitose mediada por macrófagos que ocorre principalmente em células senescentes contendo glicosíngolípídios. Os autores ainda salientam que regiões da membrana plasmática ricas em GSLs destinados a degradação são internalizadas e fusionadas em endossomas primários, os quais formam vesículas direcionadas aos lisossomas. O catabolismo endolisossomal de glicosíngolípídios ocorre na vesícula ou lipoproteína internalizada.

A glicosilceramida, glicosíngolípídio acumulado em lisossomos de pacientes com a Doença de Gaucher, em pessoas sadias é degradada em ceramida e glicose pela enzima  $\beta$ -glicosidase conforme observado na Figura 4. Esta enzima é uma glicosidase que necessita da proteína ativadora sapocina C. De acordo com os trabalhos de Kolter e Sandhoff, (2006) e Wennekes e colaboradores (2009) a deficiência desta proteína acessória também resulta no acúmulo de glicosilceramida em lisossomos.

Apesar da aplicação generalizada das duas principais terapias para auxiliar na melhora clínica dos sintomas causados pelo acúmulo de glicosilceramida, surpreendentemente, muito pouco foi discutido sobre a flutuação dos níveis plasmáticos deste glicosíngolípídio frente às terapias de reposição enzimática e redução de substrato.

Desde modo a quantificação da glicosilceramida (GliCer) acumulada nesta patologia é um forte candidato como biomarcador na DG. Sua difusão como prática bioquímica é restrita devido às dificuldades na sua quantificação. Segundo Groener e colaboradores (2008) e Shaner e colaboradores (2009), a quantificação de GliCer por espectrometria de massa é muito laboriosa e de alto custo, sendo necessários equipamentos sofisticados e pessoal especializado. Estes mesmos autores sugerem a quantificação de GliCer por HPLC (cromatografia líquida de alta performance), mas esta também necessita equipamento sofisticado e de alto custo, nem sempre disponível em laboratórios de análises clínicas.

Conforme exposto acima e de acordo com Xu e colaboradores (2010) conhecer a síntese e as alterações no fluxo dos glicoesfingolipídios em estados patológicos são fundamentais para o entendimento das várias DLD, como na Doença de Gaucher (DG), uma esfingolipidose onde o defeito na enzima  $\beta$ -glicosidase ocasiona o acúmulo patológico de glicosilceramida em lisossomos, importante precursor na síntese de glicoesfingolipídios.

Os aspectos expostos justificam o intenso campo de pesquisa na tentativa de elucidar o papel dos glicoesfingolipídios na integridade estrutural das membranas plasmáticas, sua participação em eventos de reconhecimento e sinalização bem como seu envolvimento em processos patológicos, como na DG, objeto desta tese.

#### 1.1.4. A Doença de Gaucher

A Doença de Gaucher é um erro inato do metabolismo dos glicoesfingolípídios resultando no acúmulo lisossomal de um material degradado incompletamente denominado de glicocerebrosídeo dentro de células da linhagem monócito-macrófago (Beutler, 1999). Este acúmulo deve-se à ausência ou deficiência da enzima lisossomal  $\beta$ -glicosidase ácida -  $\beta$ -gli (D-glicosil-N-ácil esfingosina glicohidrolase, EC 3.2.1.45). Em decorrência da deficiência da atividade da  $\beta$ -gli, fica prejudicada a clivagem da ligação  $\beta$ -glicosídica do glicocerebrosídeo (glicosilceramida) que resulta em glicose e ceramida (Figura 5) (Grabowski e Horowitz, 1997).

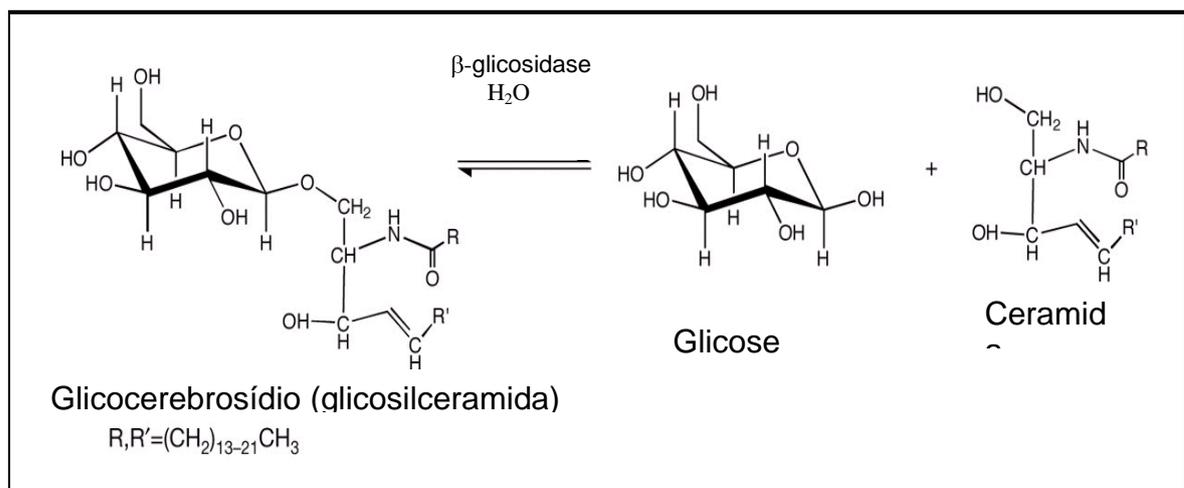


FIGURA 5: A  $\beta$ -glicosidase decompõe o glicocerebrosídeo, um glicolípídio que se origina da renovação e degradação das membranas celulares, dentro dos lisossomos das células da linhagem de monócitos/macrófagos. Esta reação tem como produto resultante moléculas de glicose e ceramida. Fonte: Dvir et al., 2003.

As manifestações clínicas da DG apresentam-se variadas, as mais comuns são a hepatosplenomegalia, trombocitopenia, anemia, infecções recorrentes, lesões ósseas incluindo fraturas e osteoporose (Brady et al., 1966; Grabowsk, 1983; Cox e Schofield, 1997; Moyses, 2003; Futerman et al., 2004).

A DG foi descrita de acordo com os autores abaixo pela primeira vez em 1882 pelo médico francês Philippe C. E. Gaucher como um epitelioma de baço (reconhecido, hoje em dia, como linfoma), quando avaliava a autópsia de baço de uma jovem mulher com esplenomegalia para a sua tese de doutorado. Já no início do século XX, foi sugerido que a doença era uma desordem familiar (Beutler e Grabowski, 1995).

Em 1934, Aghion identificou corretamente o material acumulado nas células do retículo endotelial do baço, fígado, cérebro e medula óssea de pacientes com DG como glicocerebrosídeo (ou glicosilceramida). Na década de 60, Patrick (1965) identificou a enzima envolvida no catabolismo do glicocerebrosídeo, a glucocerebrosidase ou  $\beta$ -glicosidase - EC 3.2.1.45 - (GBA1; glucosilceramida- $\beta$ -glucosidase; - $\beta$ -gli) o que foi confirmado por Brady e colaboradores (1966).

Desde então, principalmente na década de 70, avanços na pesquisa envolvendo a descoberta de proteínas ativadoras de esfingolipidases denominadas conjuntamente de SAPs ou Sapocinas A, B, C e D, a purificação da glucocerebrosidase de placentas humanas, a identificação de células de Gaucher na linhagem do sistema retículo endotelial, bem como a presença de receptores de manose-6-fosfato na superfície destas células foram fundamentais para um diagnóstico mais preciso e para o desenvolvimento de terapias eficazes (Patrick, 1965; Beutler e Grabowski, 1995; Cox, 2001)

#### **1.1.4.1. Aspectos patofisiológicos e genéticos da DG**

Nas doenças lisossômicas de depósito a inflamação observada principalmente em tecidos viscerais e sistema nervoso central é um evento patológico comum. O excesso lipídico é a causa primeira da resposta pré-inflamatória à injúria tecidual, incluindo a ativação do sistema micróglia/macrófagos que iniciam assim a produção e liberação de citocinas inflamatórias.

Na doença de Gaucher tipo 1, a glicosilceramida acumulada, principalmente, nas células do sistema mononuclear fagocitário é responsável pelo aumento e pela liberação mediada por macrófagos, muitas vezes acentuada, de citocinas pró e anti-mediadoras inflamatórias. Estas incluem entre outras citocinas a interleucina-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), a interleucina-6 (IL-6), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e a quemoquina CCL18/PARC. Tais mediadores, segundo os autores, podem contribuir para a patogênese da doença (Allen et al.,1997; Hollak et al.,1997; Huwiler e Kolter 2000; Boot et al., 2004; Jmoudiak e Futerman 2005; Walkley e Vanier 2009).

A herança da DG tem caráter autossômico recessivo sendo caracterizada a presença de dois alelos mutantes para o gene da  $\beta$ -gli (*GBA1*), localizado na região q21 do cromossomo 1, a qual hidrolisa a glicosilceramida em ceramida e glicose (Figura 5) (Beutler e Grabowski, 2001). Como resultado tem-se o acúmulo do substrato glicosilceramida, principalmente, em células do sistema mononuclear fagocitário (monócitos/macrófagos), as quais são denominadas células de Gaucher.

Os pacientes com DG são, geralmente, divididos em três fenótipos de acordo com os sinais e sintomas clínicos apresentados:

DG Tipo 1 (crônica, não neuropática ou adulta): caracterizada por hepatoesplenomegalia, anemia, trombocitopenia e degeneração óssea. A expressão clínica da doença pode variar dos primeiros meses de vida até a oitava década. O

sistema nervoso não está envolvido. É a forma mais comum da doença correspondendo a 99% dos casos e é, especialmente, prevalente entre os judeus Ashkenazi com uma incidência de cerca de 1:450 indivíduos e de cerca de 1:40.000 na população geral.

DG Tipo 2 (aguda, neuropática ou infantil): pacientes têm anormalidades nervo-craniais e no tronco cerebral, hipertonia, retardamento mental, apnéia, hepatoesplenomegalia. Idade de aparecimento de sintomas em torno de 6 meses.

DG Tipo 3 (subaguda, neuropática ou infanto-juvenil): pacientes têm sintomas similares ao tipo 1, mas os sinais neuropáticos (demência, apraxia motora ocular) aparecem durante a adolescência.

Atualmente, são conhecidas mais de 200 mutações no gene *GBA1* o que acarreta expressiva heterogeneidade nas manifestações fenotípicas da doença. (Niederau et al., 1996; Cox, 2001; Brady, 2003; Fost et al., 2003; Moyses, 2003; Futerman et al., 2004; Schueler et al., 2004; Emre et al., 2008; Wenekes et al., 2009).

O curso clínico da DG pode variar consideravelmente, mesmo dentro de uma mesma família compartilhando o mesmo genótipo (Maaswinkel-Mooij et al., 2000). Os autores acrescentam que essa heterogeneidade observada na manifestação clínica inicial, idade ao diagnóstico e posterior progressão da doença, tem sido atribuída, pelo menos em parte, ao tipo de mutação observada. Desse modo, tem sido proposto o conceito de mutações leves e graves, para explicar a heterogeneidade clínica da doença.

As mutações mais prevalentes nesta doença são as denominadas N370S e L444P. A primeira é causada por uma troca de adenina por guanina no exon 9 do gene *GBA1*, que determina a substituição do aminoácido asparagina por serina no

resíduo 370 da proteína. A mutação L444P deve-se a troca de timina por citosina no exon 10 do gene, que leva a substituição do aminoácido leucina por prolina no resíduo 444 da proteína (Zimran et al., 1991; Emre et al., 2008; Wennekes et al., 2009).

Wennekes e colaboradores (2009) e os autores citados abaixo ressaltam que existe correlação entre algumas das mutações do gene *GBA1* e as manifestações clínicas da doença, em particular, quanto ao desenvolvimento dos sintomas neurológicos. Pacientes homozigotos para a mutação N370S são diagnosticados mais tardiamente e apresentam a doença do tipo 1, menos agressiva que os tipos 2 e 3. Pacientes que apresentam um fenótipo mais grave, com comprometimento neurológico, em geral são homozigotos para a mutação L444P, e diagnosticados mais precocemente (Zimran et al., 1991; Charrow et al., 2000; Emre et al., 2008).

De acordo com Charrow e colaboradores (2000) entre os judeus Ashkenazi, quatro mutações são responsáveis por 90% dos casos, N370S, 84GG, L444P, e IVS2+1. Na população não-judia, a doença apresenta baixa prevalência, e as mutações mais comumente identificadas são as L444P, N370S, D409H, R463C, e IVS2+119. Neste trabalho, os autores salientam que no *Gaucher Registry*, dentre os 1.528 cromossomos analisados, a mutação mais comum identificada foi a N 370S (53%), seguida pela L444P (18%), a 84GG (7%), e IVS2+1 (2%).

No Brasil, as mutações mais freqüentes coincidem com as mais comuns referidas na literatura internacional: N370S e L444P (Pires e Sobreira, 2004).

#### **1.1.4.2. Diagnóstico da Doença de Gaucher**

O método utilizado para confirmar o diagnóstico da DG é a determinação enzimática da atividade da enzima  $\beta$ -gli em leucócitos e fibroblastos. A enzima expressa uma atividade cerca de 30% menor que aquela em indivíduos adultos normais e cerca de 10% menor em crianças, o que não indica, entretanto a severidade da doença. Os valores de referência são de 10 – 45 nmol de substrato hidrolisado/h/mg de proteínas (Waber, 1990; Seashore e Rinaldo, 1993; Fost et al., 2003; Germain, 2004a; Germain, 2004b; Boot et al., 2009). Ainda, e de acordo com o exposto anteriormente, mutações no gene da enzima detectadas molecularmente também levam a um diagnóstico preciso. Como este último método envolve um custo maior, não é rotineiramente utilizado em laboratórios de análise.

#### **1.1.4.3. Tratamento na Doença de Gaucher**

As opções terapêuticas para doenças lisossômicas de depósito são relativamente limitadas e restringem-se na sua maioria a cuidados paliativos. Este fato decorre da dificuldade dos agentes terapêuticos desenvolvidos agirem no sistema nervoso central, local de manifestação na maioria das DLDs. Grupos de pesquisas concentram esforços para desenvolver estratégias principalmente no transplante de medula óssea, terapia de reposição enzimática, terapia de redução de substrato e terapia gênica (Platt e Butters, 2000; Ozkara, 2004; Xu et al., 2010).

Em algumas desordens como a doença de Gaucher, a reposição enzimática oferece melhora clínica substancial (Butters, 2003). Segundo Aerts e colaboradores (2003) a Doença de Gaucher tipo 1, é entre as DLDs, a mais proeminente para o desenvolvimento de terapêuticas eficazes, uma vez que as bases moleculares do defeito genético, em nível protéico e gênico já foram estabelecidas. Como

conseqüência, Wennekes e colaboradores (2009) lembram que a DG tem sido nas últimas décadas, um campo de testes para o desenvolvimento de terapias para as DLDs.

A primeira terapia desenvolvida para DG foi a de reposição enzimática (TRE), proposta em 1966 por Brady e colaboradores sendo que a primeira experiência clínica com administração intravenosa da glicocerebrosidase ( $\beta$ -gli) purificada, não modificada e derivada de placenta humana aconteceu em 1974 no *National Institutes of Health* (Mistry et al.,1996). Relatado por Aerts e colaboradores (2003) os resultados obtidos não se mostraram eficazes terapeuticamente por dois motivos imperiosos: em primeiro lugar, a obtenção de pouca quantidade de enzima purificada em decorrência das tecnologias existentes na época e em segundo, o fato de que a enzima não modificada era absorvida principalmente por hepatócitos, não pelos macrófagos.

Foram necessários avanços tecnológicos não só para extrair quantidades suficientes de glicocerebrosidase da placenta, como também para fazê-la chegar aos macrófagos através de tratamento enzimático de grupos de açúcares terminais expondo os resíduos de manose para que os receptores de manose-6-fosfato pudessem reconhecê-los (Brady et al., 1966; Barton et al., 1990; Brady, 2003). Em 1994 a glicocerebrosidase exógena, inicialmente extraída de placenta humana (alglucerase, Ceredase®, Genzyme Corporation, Cambridge, Massachusetts) foi então substituída pela forma recombinante (imiglucerase, Cerezyme®, Genzyme Corporation) (Germain, 2004 b).

Os dois medicamentos diferem entre si na substituição de um único aminoácido (histidina por arginina, na posição 495), o que não afeta a função catalítica da enzima (Grace et al.,1993; Grabowski, 1995). Os autores pontuam

ainda que a imiglucerase é uma glicoproteína monomérica de 497 aminoácidos com carboidratos compondo aproximadamente 6% da molécula. A enzima humana  $\beta$ -gli não modificada também contém 497 aminoácidos, mas consiste de 12% de carboidratos.

Atualmente, a Terapia de Reposição Enzimática (TRE) é utilizada em milhares de pacientes para tratar DG tipo 1 (não neuropática). Neste tratamento a enzima recombinante GlcCerase (Imiglucerase, Cerezyme<sup>®</sup>) alivia os principais sintomas da doença. As desvantagens da TRE esbarram no elevado custo do tratamento, cerca de U\$ 70.000 a U\$ 550.000 ano/paciente dependendo da dosagem utilizada, na administração intravenosa e na incapacidade de prevenir ou tratar os sintomas neurológicos, visto que a enzima não consegue atravessar a barreira hematoencefálica (Barton et al., 1990; Grabowski, 1995; Mistry et al., 1996; Desnick, 2004; Futerman et al., 2004; Germain, 2004a; Germain, 2004b; Wennekes et al., 2009). Principalmente por causa do alto custo faz-se necessário o estudo de biomarcadores que possam auxiliar no estabelecimento da dose ideal para o paciente.

De acordo com Desnick (2004) o tratamento com enzima recombinante é bem tolerado e capaz de reverter anos de acúmulo de substrato, produzindo melhora clínica e de qualidade de vida para os doentes. A reversão do envolvimento celular pela TRE requer que quantidades suficientes de enzima sejam entregues às células e órgãos afetados.

Conforme preconizado no Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Doença de Gaucher (Portaria SAS/MS nº 449, de 08 de julho de 2002) o tratamento deverá ser mantido por toda a vida, podendo haver redução da dosagem a critério

clínico e considerando a evolução clínica favorável do paciente. A dose mínima recomendada é de 15 - 30 U/kg a cada 15 dias.

Os pacientes sob tratamento por TRE, cujos plasmas foram utilizados neste trabalho, fazem uso da medicação imiglucerase, Cerezyme®.

A Terapia de Redução de Substrato (TRS) foi proposta em 1980 por Vunnam e Radin, onde o acúmulo de substrato é evitado não pela substituição da enzima deficiente, mas pela redução na concentração de substrato onde a atividade residual da enzima mutante seja suficiente para evitar o estoque patológico (Lachmann e Platt, 2001; Butters, 2003; Moyses, 2003; Platt, 2003; Germain, 2004a; Germain, 2004b; Wennekes et al., 2009). De acordo com os autores são utilizadas moléculas difusíveis inibidoras da síntese de glicosíngolipídios. Em 2002, um dos inibidores pesquisados em ensaios clínicos com pacientes de Gaucher tipo 1 que não toleram a terapia de reposição enzimática, o Miglustat: N-butyldeoxynojirimycin (NB-DNJ; Zavesca®) foi aprovado como medicamento pelo *Food and Drug Administration* (FDA) e pela *European Medicines Agency* (EMA) (Xu et al., 2010). Esta substância (Miglustat–Zavesca®-) age inibindo a enzima glicosilceramida sintetase, enzima esta responsável pelo primeiro passo na síntese da maioria dos GSLs (Moyes, 2003).

Estudos demonstram que esta terapia tem como vantagens sobre a TRE o fato da administração ser oral, evitando assim reações imunológicas, a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica além de não necessitarem receptores específicos para endocitose (Platt, 2003; Weinreb et al., 2005; McEachern et al., 2007; Schiffmann et al., 2008; Xu et al., 2010).

Segundo Wennekes e colaboradores (2009) Miglustat é bem tolerado e os principais efeitos colaterais na administração oral de NB-DNJ são os relacionados com as reações provocadas na inibição das dissacaridases nas microvilosidades do

epitélio intestinal, o que acarreta diarreia osmótica, flatulência, e distensão abdominal (Platt e Butters, 2000).

Wennekes e colaboradores (2009) e Desnick (2004) enfatizam que além das terapias mencionadas, outra linha de pesquisa vem tentando descobrir novas moléculas com atividades de “chaperonas” na tentativa de aumentar a atividade residual da enzima  $\beta$ -Gli, as quais poderiam, em princípio, atravessar a barreira hematoencefálica.

Esta terapia tem o nome de *Enzyme Enhancement Therapy* (EET), ou *Pharmacological Chaperone Therapy* (PCT) ou ainda Terapia Mediada por Chaperoninas. Khanna e colaboradores (2010) relataram que em pesquisas anteriores a utilização da chaperona isofagomina (IFG) auxiliou na estabilização da enzima  $\beta$ -Gli aumentando assim o tráfico lisossomal e a atividade da enzima com mutação N370S.

Embora o conceito da PCT esteja alicerçado no auxílio que chaperoninas possam dar a proteínas defeituosas em algumas das DLDs, evidências apontam um possível benefício sobre enzimas selvagens. Segundo Kornhaber e colaboradores 2008 e Tropak e colaboradores 2008, o uso da chaperona isofagomina induz a estabilização conformacional e aumenta a estabilidade térmica da enzima recombinante normal  $\beta$ -gli.

Aliado às terapias já existentes alguns trabalhos indicam que a terapia gênica usando diversos vetores *in vivo* e *ex vivo* tem grande possibilidade de tornar-se opção de tratamento para doenças lisossomais. Os autores enfatizam, entretanto, que mais pesquisas na tecnologia de vetores e na expressão de transgenes em macrófagos são necessárias, além do que carecem de experiência clínica (Aerts et al., 2003; Ioannou et al., 2003; Haskins, 2009; Parenti, 2009).

#### **1.1.4.4. Marcadores para doença de Gaucher**

Os autores abaixo sugerem que análises de anormalidades secundárias, tais como elevação nos níveis plasmáticos de proteínas específicas, poderiam intervir no entendimento da complicada fisiopatologia da doença e assim fornecer marcadores que possam auxiliar no diagnóstico bem como servir de parâmetro da efetividade das terapias utilizadas, o que conseqüentemente poderá auxiliar na otimização da dose para cada paciente, levando-se em conta o auto custo dos tratamentos (Aerts et al., 2003; Parenti, 2009).

A quitotriosidase (QT), também conhecida como quitinase humana (EC 3.2.1.14) é uma glicosil hidrolase sintetizada e excretada por macrófagos ativados. Esta enzima é análoga a quitinases de não vertebrados. Na década de 90, estudos mostraram que pacientes com DG possuíam níveis elevados de QT no plasma (cerca de 100 a 500 vezes) e que após a introdução da TRE estes níveis diminuía (Hollak et al., 1994; Pastores e Barnett, 2005; Pastores et al., 2005; Fost et al., 2006).

Pesquisadores da área têm proposto, para pacientes cujo início de tratamento seja questionável, que a atividade da enzima quitotriosidase acima de 15000 nmol de substrato hidrolisado/h/mL de plasma possa ser utilizada como confirmação bioquímica para o diagnóstico da DG, em adição à determinação da atividade da  $\beta$ -gli (Aerts, 2003; Moyses, 2003; Aerts et al., 2008).

Apesar da potencialidade da enzima quitotriosidase como marcador bioquímico para DG, Moyses (2003) e Aerts et al. (2003) assinalam que a elevada atividade enzimática não constitui condição específica desta patologia. Além disso, a quitotriosidase não é expressa em 6,5 % da população incluindo pacientes com DG

(Boot et al. 1998). Levando-se em conta as afirmativas acima, a pesquisa com marcadores alternativos se faz necessário.

A proteína quemoquina CCL18/PARC vem sendo estudada para servir como marcador específico para Doença de Gaucher. Boot e colaboradores (2004) e Chang e colaboradores (2010) relataram que, no plasma de pacientes sintomáticos com DG, a concentração desta proteína está cerca de 29 vezes mais elevada, não ocorrendo sobreposição entre pacientes e indivíduos normais. A medida normal está estimada em 33 ng/mL (10 – 72 ng/mL) enquanto o nível plasmático para pacientes com DG é de 948 ng/mL (237 – 2285 ng/mL).

Estudos clínicos estabelecendo uma comparação da atividade da quitotriosidase na urina e plasma de pacientes com DG demonstraram que a atividade enzimática na urina não está correlacionada com os valores da atividade enzimática no plasma. Os autores sugerem que os níveis de atividade enzimática encontrados na urina destes pacientes refletem uma patologia renal e não uma resposta as células de Gaucher. Em contrapartida, os níveis da quemoquina CCL18/PARC destes pacientes no plasma e urina estão de acordo com o que a literatura preconiza para indivíduos portadores de DG (Boot et al., 2004; Deegan. et al., 2005; Kzhyshkowska, et al., 2007; Chang et al., 2010). Ao analisarmos os trabalhos já realizados com a quemoquina CCL18 e compararmos com os resultados obtidos nesta pesquisa, fica claro de que esta proteína pode tornar-se um efetivo marcador para doença de Gaucher.

## 2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos:

### **Objetivo Geral:**

Estudar diferentes metodologias de diagnóstico complementar e monitoramento da evolução do tratamento por Terapia de Reposição Enzimática da Doença de Gaucher.

### **Objetivos específicos:**

1. Medir a atividade das enzimas  $\beta$ -glicosidase e quitotriosidase em plasma de pacientes com Doença de Gaucher sob tratamento ou não por reposição enzimática (TRE) e em plasma de indivíduos normais, de modo a caracterizar nossa amostra;

2. Extrair, purificar e quantificar a glicosilceramida de amostras de plasma de pacientes com doença de Gaucher com e sem tratamento por reposição enzimática (TRE) e de plasma de indivíduos normais;

3. Comparar o conteúdo de glicosilceramida de pacientes com Doença de Gaucher sob tratamento por TRE com aqueles sem TRE e indivíduos normais de modo a verificar se este é um bom parâmetro na separação entre estes grupos de indivíduos;

4. Medir e comparar a concentração de quemoquina CCL18/PARC em plasma de pacientes com Doença de Gaucher sob tratamento ou não por reposição enzimática (TER) e em plasma de indivíduos normais;

5. Correlacionar os resultados da atividade da quitotriosidase, da análise quantitativa da glicosilceramida e dos níveis plasmáticos da quemoquina CCL18/PARC obtidos neste trabalho.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

Este estudo foi realizado em conformidade com a Declaração de Helsinki da Associação Médica Mundial e foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Anexo 1). Todos os indivíduos que participaram do estudo assinaram um termo de consentimento informado (Anexo 2).

#### **3.1. AMOSTRAS**

Este trabalho contou com amostras de plasma de pacientes com diagnóstico para Doença de Gaucher tipo 1, confirmados através da determinação enzimática leucocitária da enzima beta glicosidase ( $\beta$ -gli) e/ou genótipo. Estas amostras foram enviadas de vários locais do Brasil, por médicos que colaboraram com nosso estudo.

O grupo controle foi composto por indivíduos sadios que, após terem sido informados sobre os objetivos do trabalho, se dispuseram voluntariamente a participar.

O número amostral de cada um dos grupos desta pesquisa foi decidido com base na frequência, a qual é baixa, dos pacientes com Doença de Gaucher diagnosticados em nosso laboratório. Este número variou para cada um dos experimentos realizados e será mostrado, no item Resultados, junto com o resultado de cada experimento.

##### **3.1.1. Critérios de inclusão**

Foram incluídos neste estudo pacientes diagnosticados com doença de Gaucher tipo 1, bem como indivíduos normais (controles) que concordaram com os critérios da pesquisa através do consentimento escrito autorizando a utilização das

informações para fins científicos, lhes assegurado o sigilo de identidade quanto aos dados fornecidos.

### **3.1.2. Critérios de exclusão**

a) Materiais biológicos que não cumpriram o protocolo de rotina de investigação diagnóstica para doença de Gaucher tipo 1.

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

c) Pacientes ou controles que não assinaram o termo de consentimento informado (Anexo 2).

### **3.2. GRUPOS DE ESTUDO**

Para a maioria dos estudos aqui realizados, contamos com 3 grupos de indivíduos:

a) Grupo Controle: indivíduos normais.

b) Homozigotos para DG sem tratamento: indivíduos com diagnóstico para Doença de Gaucher tipo 1 por análise enzimática ou por portarem uma mutação já estabelecida no gene da  $\beta$ -glicosidase (N370S/L444P; N370S/N370S; N370S/IVS2+1 ou N370S/D409H).

c) Homozigotos para DG em tratamento de reposição enzimática (TRE): idem ao grupo acima só que a coleta foi realizada após, pelo menos, 2 meses de introdução da TRE com imiglucerase.

### **3.3. MATERIAL BIOLÓGICO**

#### **3.3.1. Coleta, processamento e armazenamento do material biológico**

##### ***3.3.1. Coleta de sangue:***

As amostras de sangue total dos indivíduos deste estudo foram obtidas por punção venosa em seringa contendo 0,2 mL de heparina. Foram coletados 10 mL de sangue. Destes, 2 mL foram reservados para separação do plasma e 8 mL para a separação dos leucócitos.

##### ***3.3.2. Processamento e armazenamento do plasma:***

A amostra de sangue total de cada indivíduo num volume de 2 mL foi centrifugada a 600 x g por 10 minutos para completa separação entre o plasma e os outros componentes sanguíneos. A amostra de plasma foi identificada, mantendo-se o anonimato, e armazenada em freezer a -40°C.

##### ***3.3.3. Processamento e armazenamento dos leucócitos:***

Os restantes 8 mL de sangue foram utilizados para a separação de leucócitos segundo a técnica de Skoog e Beck (1956). Aos 8 mL de sangue foi adicionado igual volume de uma mistura contendo ácido cítrico-dextrose, dextran 6% e glicose 5%. Após 1 hora de repouso, o sobrenadante foi centrifugado a 600 x g por 10 minutos a 4°C. O precipitado resultante desta centrifugação foi lavado com NaCl 0,9%, água destilada gelada e NaCl 3,6%. Após nova centrifugação a 600 x g por 5 minutos a 4°C, o precipitado (leucócitos), foi armazenado a -40°C para posterior análise.

### **3.4. ANÁLISES BIOQUÍMICAS**

#### **3.4.1. Medida da atividade da enzima $\beta$ -gli em leucócitos**

A atividade enzimática da  $\beta$ -gli foi determinada de acordo com Peters e colaboradores (1976), utilizando-se uma mistura de 10mmol/L de 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-glicosídeo como substrato e 50mmol/L de tauracolato de sódio como detergente. Para o ensaio foram utilizados 20 $\mu$ L de leucócitos, 100 $\mu$ L de substrato e 50 $\mu$ L de tampão citrato-fosfato 0,54mol/L pH 5,5. Os leucócitos foram incubados por 1 hora a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de 1500 $\mu$ L de tampão glicina-NaOH 0,5mol/L pH 10,3, e a fluorescência foi medida em um espectrofluorímetro Hitachi F-2000 usando filtros de emissão e excitação de comprimentos de onda 450nm e 365nm, respectivamente. As leituras foram comparadas a uma curva de calibração 4-metilumbeliferona.

As atividades enzimáticas foram calculadas em nanomóis de substrato hidrolisados por hora por miligrama de proteína (nmol/h/mg de proteína).

#### **3.4.2. Medida da atividade da enzima quitotriosidase em plasma**

A atividade enzimática da quitotriosidase foi determinada segundo Hollak e colaboradores (1994), utilizando-se o substrato artificial 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-N-N'-N''-triacetilquitotriosídeo 0,026mmol/L. O material destinado ao ensaio continha 5 $\mu$ L de plasma acidificado (50 $\mu$ L de plasma adicionado de 5 $\mu$ L de ácido cítrico 0,2mol/L) e 100 $\mu$ L de substrato, dissolvido em tampão citrato (10mmol/L-fosfato 200mmol/L pH 5,2) num volume total de 105 $\mu$ L. Este material foi incubado por 15 minutos a 37°C. A reação foi interrompida com 1000 $\mu$ L de tampão glicina-NaOH 0,5mmol/L pH 10,3, e a fluorescência foi lida com um espectrofluorímetro Hitachi F-2000 com filtros de emissão e excitação de 450nm e 365nm, respectivamente.

As leituras foram corrigidas com valores dos brancos e comparadas a uma curva de calibração de 4-metilumbeliferona. Nas amostras em que a atividade foi muito elevada (pacientes com Doença de Gaucher), procedeu-se uma diluição prévia (1:50) da amostra em albumina 1% em água destilada para assegurar as condições de saturação do substrato.

As atividades enzimáticas foram calculadas em nanomóis de substrato hidrolisados por hora por mililitro de sangue (nmol/h/mL).

### **3.4.3. Dosagem de proteínas**

As proteínas foram determinadas em cada amostra de acordo com o método de Biureto conforme instruções do fabricante (Reagente Biureto – proteínas totais – Labtest) (Gornal et al., 1949).

### **3.4.4. Análise quantitativa de glicosilceramida**

Para aperfeiçoar as condições de extração, de purificação, das migrações e revelações cromatográficas, assim como, da quantificação da glicosilceramida e a reprodutibilidade dos experimentos, os seguintes parâmetros foram pesquisados na literatura e testados em laboratório, no mínimo três vezes para cada avaliação: volume de plasma para extração; sistemas de solventes para extração; sistemas de eluição (solventes) para as colunas de ácido silícico e Sep-Pack<sup>®</sup>; sistemas de solventes para migração cromatográfica; métodos químicos de revelação cromatográfica e métodos de imunorevelação.

A partir dos vários ensaios preliminares para alcançar os objetivos propostos acima, as descrições abaixo, resumidas na Figura 6 e detalhadas no texto que segue, foram estabelecidas como adequadas.

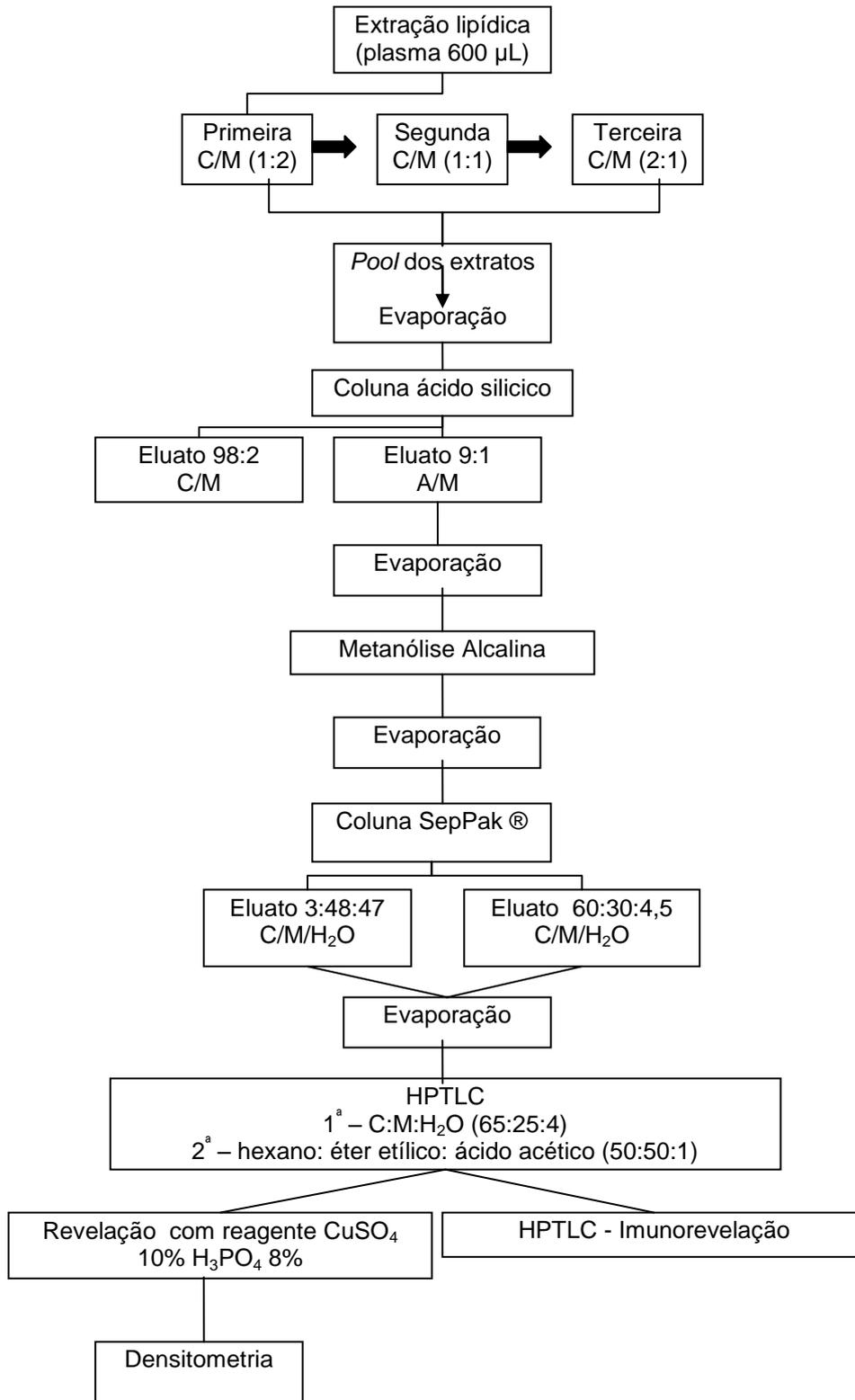


FIGURA 6. Fluxograma da metodologia utilizada. Ver detalhes no texto.

#### **3.4.4.1. Extração lipídica total**

A glicosilceramida (GliCer) foi extraída do plasma conforme descrito previamente por Doering e colaboradores (1999) com adequações necessárias ao volume de 600  $\mu\text{L}$  de plasma de cada amostra analisada. O plasma de cada indivíduo foi tratado, seqüencialmente, com três sistemas de solventes: clorofórmio (C): metanol (M) nas proporções 1:2 (1800 $\mu\text{L}$ ), 1:1 (1200 $\mu\text{L}$ ) e 2:1 (1800 $\mu\text{L}$ ) a 37°C, durante 2 horas para cada sistema, sob agitação. Os três extratos lipídicos totais de cada amostra foram reunidos e evaporados a seco (resíduo).

#### **3.4.4.2. Purificação de GliCer**

O resíduo do extrato lipídico total, obtido conforme o item 3.4.4.1., foi submetido aos tratamentos abaixo listados para remoção de contaminantes como sais, lipídeos neutros (colesterol e triglicerídeos) e fosfoglicerídios.

a) Coluna de ácido silícico (Sigma-Aldrich): o resíduo do extrato lipídico total foi suspenso em 1 mL de clorofórmio (C) / metanol (M) (98:2) e submetido à coluna de ácido silícico (500mg) de acordo com Ullman e McCluer (1977). O eluato correspondente a fração apolar (2000 $\mu\text{L}$ ) clorofórmio/metanol C/M (98:2) foi descartado, enquanto o eluato correspondente a fração polar (2000  $\mu\text{L}$ ) acetona (A) / metanol (M) (9:1) foi evaporado a seco e o resíduo, assim obtido, submetido à metanólise alcalina.

b) Metanólise alcalina: para hidrólise dos fosfolipídios, o resíduo da fração polar obtida a partir da coluna de ácido silícico A/M (9:1) foi submetida à metanólise alcalina suave como descrito por Ullman e McCluer (1977). O resíduo evaporado da

fração A/M (9:1) foi suspenso em 1mL de NaOH metanólico 0,6 N, e colocado em banho de água a 37°C por 90 minutos. Após a metanólise alcalina o material foi evaporado em fluxo de nitrogênio gasoso.

c) Coluna Sep-Pack® (Waters): o resíduo seco da metanólise alcalina suave foi suspenso em C/M (1:1) (1000µL) e submetido à coluna Sep-Pack® C18 (65mg) cartridges segundo Williams e McCluer (1980) para eliminação de sais e compostos de baixa massa molecular. Da coluna Sep-Pack® foram obtidos dois eluatos C:M:água nas proporções de 3:48:47 e 60:30:4,5, os quais foram coletados e armazenados em um mesmo recipiente. O *pool* destes eluatos foi evaporado em fluxo de nitrogênio gasoso a 37°C. O resíduo assim obtido de cada uma das amostras processadas foi submetido à análise cromatográfica conforme descrito abaixo.

d) Análise por cromatografia em camada delgada de alta resolução (HPTLC) e quantificação da banda de glicosilceramida

Os extratos lipídicos purificados foram analisados por HPTLC (placas 20 x 10 cm, sílica gel 60 A, Merck). Para aplicação na placa cromatográfica, cada resíduo do extrato purificado foi suspenso em 50µl de C/M (1:1) e aplicado nas linhas, eqüidistantes 4,0 mm entre si, 1,5 cm da base e 1,0 cm das laterais. Este volume foi aplicado à placa com o auxílio de uma pipeta automática. Em seguida, a placa foi colocada numa cuba cromatográfica contendo o sistema de solventes. Foram utilizados, seqüencialmente, dois sistemas de solventes de acordo com Tani-ichi e colaboradores, (2005). O primeiro consistiu em C:M:água (65:25:4) e o segundo em hexano/éter etílico/ácido acético (50:50:1). Entre uma corrida e outra, a placa

cromatográfica foi submetida à secagem em capela. Os cromatogramas foram revelados por imersão em  $\text{CuSO}_4$  10%/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 8% e após aquecidas 150°C (Doering et al., 1999). A identificação da banda de glicosilceramida da amostra foi baseada na sua respectiva velocidade de migração (*Rate flow- Rf*) comparada com a do padrão de glicosilceramida (Sigma-Aldrich). A banda corada de GliCer foi quantificada por densitometria dos cromatogramas em um densitometro CS 930 Shimadzu UV/vis, seguido de comparação dos mesmos com um cromatograma obtido com quantidades conhecidas de GliCer conforme Gonarti e colaboradores (2002). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}/600\mu\text{L}$  plasma,  $\mu\text{mol}/\text{L}$  plasma e ng/mg proteína.

#### e) Imunorevelação

A confirmação da identidade da banda de glicosilceramida foi realizada por imunorevelação segundo Brade e colaboradores (2000) com modificações no tampão bloqueio (Haycock, 1993). Foi utilizado um cromatograma com padrão de GliCer (0.5 $\mu\text{g}$ ) e extratos lipídicos purificados de plasma de pacientes com DG sem tratamento por TRE e de indivíduos normais, obtidos como descrito acima.

A técnica teve as seguintes etapas:

1. A imunorevelação foi iniciada incubando-se a placa cromatográfica, a qual foi preparada conforme o item 3.4.4.2.d, em tampão de bloqueio (Tris-HCl 50mM, pH 7,4; NaCl 200mM; Polivinilpirrolidona 0,1%, Sigma-Aldrich) por duas horas, à 24°C sob agitação suave.

2. Em seqüência, a placa foi incubada com anticorpo primário feito em coelho anti-glicosilceramida humana (Glyco-Tech Produktions) na diluição de 1:500 em tampão de lavagem (Tris-HCl 50mM, pH 7,4; NaCl 200mM) por quatro horas, a 24°C sob agitação suave.

3. Após cinco lavagens com tampão de lavagem a placa cromatográfica foi incubada com anticorpo secundário anti-coelho (IgG) conjugado com peroxidase (Dianova, Sigma- Aldrich), na diluição de 1:1000 em tampão de lavagem por duas horas, à 24°C sob agitação suave.

4. Em seguida, foram realizadas quatro lavagens como descrito anteriormente e a quinta lavagem foi feita com tampão substrato (citrato sódio, 0,1 M, pH 4,5). A ligação dos anticorpos foi detectada pela incubação da placa cromatográfica durante 30 min, a 24°C com solução substrato (10mL) preparada na hora e composta de 8,33mL de tampão substrato; 1,6 mL de 4-cloro-1-naftol (3mg/mL em MeOH) e peróxido de hidrogênio (3.3µL de solução a 30%).

#### **3.4.5. Quantificação da quemoquina CCL18/PARC**

A quantificação foi realizada em plasma de pacientes e controles de acordo com o ensaio imunoenzimático (ELISA – Sanduíche) usando o kit da CytoSet.

As condições da técnica, conforme descritas nas etapas abaixo seguiram as recomendações do fabricante (*Biosource International*) e como desenvolvido previamente por Boot e colaboradores (2004).

##### **3.4.5.1. Preparação das placas**

a) O anticorpo de captura, obtidos de rato, anti CCL18/PARC humana foi diluído na concentração de trabalho (1.0µg/mL em PBS).

b) Imediatamente foi depositado 100µL do anticorpo nas cavidades da placa, previamente identificadas, para adsorção. A placa foi então coberta e incubada a temperatura ambiente *overnight*.

c) Na manhã seguinte, dando prosseguimento, as placas foram vertidas na pia e lavadas com tampão de lavagem (Tween 20 - 0,05% em PBS, pH 7,2 – 7,4). O processo foi repetido 3 vezes num total de três lavagens. Para cada cavidade foi utilizado 250 $\mu$ L de tampão usando um dispensador automático. Após a última lavagem qualquer vestígio do tampão foi removido por inversão da placa contra um papel toalha.

d) As cavidades da placa foram bloqueadas adicionando-se 200 $\mu$ L do reagente diluente por poço (BSA 1 % em PBS, pH 7,2 – 7,4). A placa foi então incubada em temperatura ambiente por 1 hora.

e) O processo de lavagem descrito no item c foi repetido. A placa neste momento ficou preparada para receber as amostras.

#### **3.4.5.2. Procedimento para preparação e deposição das amostras e curva padrão**

a) Na placa, previamente lavada e com as cavidades identificadas, foi adicionado 100 $\mu$ L de cada amostra (1:600) e curva padrão diluídos em reagente diluente (RD) (BSA 1% em PBS, pH 7,2 – 7,4). A placa foi coberta com parafilme e incubada por duas horas em temperatura ambiente.

b) O processo de lavagem descrito no item 3.4.5.1. c de preparação das placas foi repetido.

c) Em seguida, foi adicionado em cada cavidade 100 $\mu$ L do anticorpo de detecção obtidos de cabra (anticorpo anti CCL18/PARC humana) conjugado com peroxidase, diluído em RD. A placa foi coberta com parafilme e incubada por 2 horas em temperatura ambiente.

d) O processo de lavagem descrito no item 3.4.5.1. c de preparação das placas foi repetido.

e) Após lavagem, cada cavidade recebeu 100 $\mu$ L do conjugado peroxidase-estreptavidina diluída em RD. A placa foi coberta e incubada por 20 minutos em temperatura ambiente.

f) O processo de lavagem descrito no item 3.4.5.1. c de preparação das placas foi repetido.

g) Após lavagem foi adicionado em cada cavidade 100 $\mu$ L da solução substrato. Esta solução foi preparada utilizando-se uma solução de OPD (o-phenilenediamina dihidroclorido -Sigma- Aldrich). Esta solução foi preparada num tubo de *ependorff* coberto com papel alumínio. A placa foi então incubada em câmara escura por 20 minutos em temperatura ambiente.

h) Passados os 20 minutos a reação foi interrompida adicionando-se em cada cavidade 50 $\mu$ L de solução bloqueio (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N). A placa foi gentilmente movimentada para assegurar boa homogeneização.

i) Finalizando a técnica, a absorbância foi lida a 490nm usando um leitor de microplacas (Multiskan EX), e a concentração de CCL18/PARC de cada cavidade foi quantificada através da curva padrão estabelecida com quantidades conhecidas do padrão da quemoquina. Os resultados foram expressos em ng/mL.

### **3.5. Análises estatísticas**

Os resultados obtidos foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. A significância estatística foi avaliada a partir de ANOVA de uma via seguida pelo teste de DUNCAN quando  $p < 0,05$ . As análises foram feitas em programa SPSS-PC versão 17.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. ANÁLISES ENZIMÁTICAS

#### 4.1.1. Atividade da enzima $\beta$ -glicosidase em leucócitos

Neste estudo foi realizada a medida da atividade enzimática da  $\beta$ -glicosidase em 21 indivíduos com Doença de Gaucher sem tratamento por TRE e 21 indivíduos normais. Conforme pode ser observado na Figura 7 a média das atividades da  $\beta$ -glicosidase nos pacientes com DG foi de  $0,83 \pm 0,75$  nmol substrato hidrolisado/h/mg de proteína, enquanto nos 21 indivíduos normais (controles) a média foi de  $14,89 \pm 7,46$  nmol substrato hidrolisado/h/mg de proteína.

Após análise estatística ( $t = 8,59$  e  $p < 0,0001$ ) verificamos que os indivíduos com DG apresentaram uma atividade enzimática significativamente menor que aquelas dos controles.

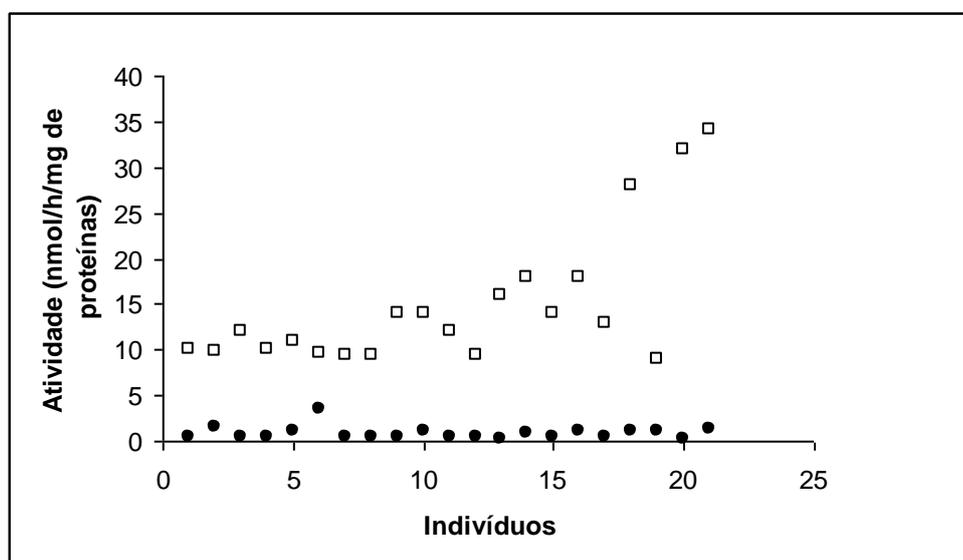


FIGURA 7. Atividade da  $\beta$ -glicosidase (nmol substrato hidrolisado/h/mg de proteínas) em leucócitos de pacientes com Doença de Gaucher (●) e indivíduos normais (□). Valores de referência: 10 - 45 nmol de substrato hidrolisado/h/mg de proteínas.

#### **4.1.2. Atividade da enzima quitotriosidase em plasma**

Neste estudo foi realizada a medida da atividade enzimática da quitotriosidase em 21 indivíduos com Doença de Gaucher sem tratamento, em 5 indivíduos com Doença de Gaucher em tratamento por reposição enzimática e em 21 indivíduos normais.

De acordo com os dados representados no gráfico da Figura 8 a média de atividade da quitotriosidase nos 21 pacientes com DG foi de  $20.695,4 \pm 20.692,3$  nmol substrato hidrolisado/h/mL de plasma (mediana: 20.733), enquanto nos 5 pacientes com DG em tratamento por TRE foi de  $5.797,8 \pm 2.611,4$  nmol substrato hidrolisado/h/mL de plasma (mediana: 3.440). Os 21 indivíduos normais (controles) apresentaram valores médios de  $48,1 \pm 30,6$  nmol substrato hidrolisado/h/mL de plasma (mediana: 46). Após análise estatística ( $F = 11,70$  e  $p < 0,001$ ), verificamos que os indivíduos com DG apresentaram uma atividade enzimática significativamente maior que aquelas dos controles e aquela dos indivíduos tratados e estes últimos também diferiram significativamente dos controles.

Para que os três grupos de indivíduos pudessem ser representados dentro da mesma figura, apresentamos a atividade da quitotriosidase na Figura 8 como logaritmo decimal.

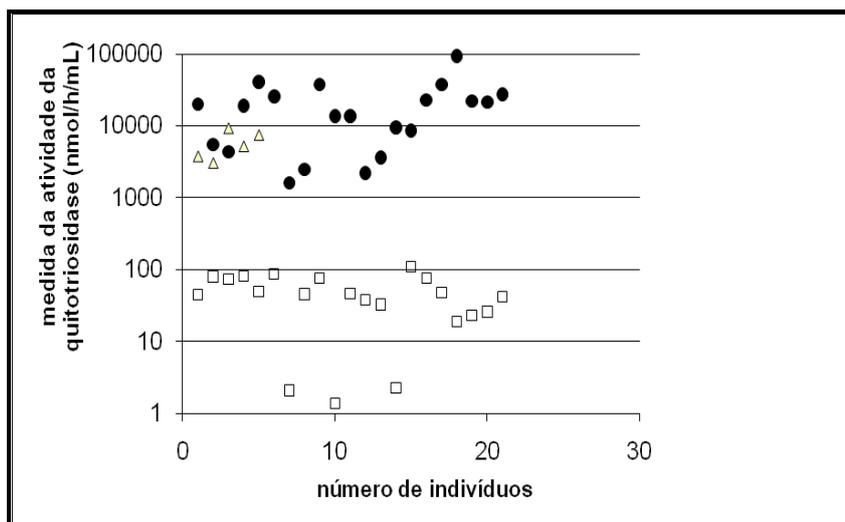


FIGURA 8. Atividade da quitotriosidase (nmol substrato hidrolisado/h/mL) em plasma de pacientes com Doença de Gaucher sem tratamento n=21 (●), pacientes com Doença de Gaucher sob tratamento por TER n=5 (Δ) e indivíduos normais n=21 (□). Valores referência 8,8 - 132 nmol/h/mL de plasma. Escala logarítmica decimal.

#### 4.2. Determinação quantitativa de glicosilceramida em plasma

Parte dos resultados que serão apresentados a seguir, foram aceitos para publicação na revista Biochemical Journal of Pharmaceuticals Science: com o título “Quantification of glucosylceramide in plasma of Gaucher disease patients” (Anexo 4).

##### 4.2.1. Padronização da metodologia de extração, purificação, separação, detecção e quantificação de glicosilceramida

O extrato lipídico total de plasma, obtido conforme o item 3.4.4 foi, seqüencialmente, submetido a uma coluna de ácido silícico, à metanólise alcalina, à coluna Sep-Pak® e cromatografia (HPTLC) para extração, purificação e separação de glicosilceramida (GliCer). A padronização foi realizada inicialmente com plasma de paciente com DG conforme fluxograma representado na figura 6.

Ao passar o extrato lipídico total (Figura 9-linha 5) pela coluna de ácido silícico obtiveram-se dois eluatos: a) um eluato apolar clorofórmio/metanol C/M (98:2) contendo os lipídios apolares como colesterol, éster de colesterol e triglicerídeos (Figura 9-linha 6) (este eluato foi posteriormente descartado) e b) um eluato polar acetona/metanol (9:1) contendo glicosfingolipídios neutros, dentre eles o de interesse da pesquisa: glicosilceramida (Figura 9-linha 7). Para purificação de GliCer foi necessário que o resíduo do eluato (9:1) fosse submetido à metanólise alcalina suave para retirada de impurezas próprias do processo de extração de glicosfingolipídios como fosfolipídios, os quais interferem no isolamento da GliCer.

O resíduo metanólico foi então submetido à coluna Sep-Pack<sup>®</sup> C18 (fase de limpeza) para eliminação de sais e compostos de baixo peso molecular obtidos na metanólise alcalina. Desta coluna resultaram os eluatos C:M:água: 3:48:47 e 60:30:4,5. A análise dos resíduos obtidos a partir destes eluatos por cromatografia em camada delgada de alta resolução e com revelação química ( $\text{CuSO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ ) mostrou que ambos continham uma banda (Figura 9-linhas 10 e 11) com velocidade de migração (*Rate flow* - Rf) semelhante ao padrão glicosilceramida (Figura 9 linhas 2, 3 e 4).

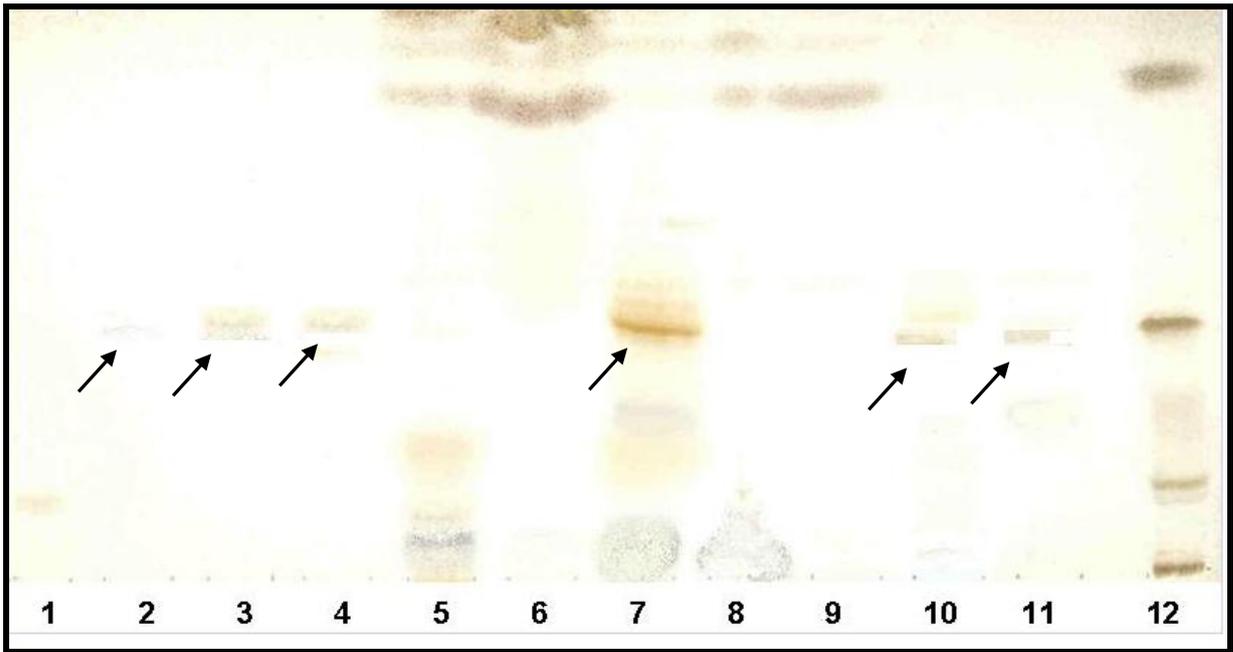


Figura 9: Análise por cromatografia em camada delgada de alta resolução (HPTLC) das frações obtidas durante a extração e purificação de glicosilceramida de extrato lipídico de plasma de paciente com Gaucher. 1: esfingomielinina; 2: 1,5  $\mu\text{L}$  glicosilceramida\*; 3: 3  $\mu\text{L}$  glicosilceramida\*; 4: 4,5  $\mu\text{L}$  glicosilceramida\*; 5: extrato lipídico total de plasma de paciente DG; 6: coluna ác. silícico, fração 98:2; 7: coluna ác. silícico, fração 9:1; 8: coluna SepPak 98:2, fração 3:48:47; 9: coluna SepPak 98:2, fração 60:30:4,5; 10: coluna SepPak<sup>®</sup> 9:1, fração 3:48:47; 11: coluna SepPak<sup>®</sup> 9:1, fração 60:30:4,5; 12: padrões de fosfolipídios e colesterol a partir da origem: fosfatidilserina, esfingolmielinina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e colesterol \* Solução de glicosilceramida 500  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

Se a banda detectada nas linhas 10 e 11 fosse confirmada por imunodeteção como glicosilceramida humana, esta metodologia poderia ser utilizada como diagnóstico complementar e como monitoramento do tratamento da doença de Gaucher. Para isso, um experimento semelhante foi realizado com plasma de paciente com DG e plasma de indivíduo normal (controle). A Figura 10A mostrou que tanto o eluato C:M:água (3:48:47) (Figura 10A-linha 4-Banda 1) quanto o eluato C:M:água 60:30:4,5 (Figura 10A-linha 5-Banda 1), obtidos após o processamento do plasma de pacientes com DG, continham uma banda com Rf semelhante ao do padrão de glicosilceramida (Figura 10A-linhas 1, 2 e 3). O mesmo ocorreu com o

material obtido de plasma de indivíduo normal, mas com menor intensidade (Figura 10A-linhas 6 e 7-Banda 1). A confirmação da identidade destas bandas foi realizada por imunorevelação usando um anticorpo primário de coelho anti-glicosilceramida humana, seguido de um anticorpo secundário de cabra anti-IgG de coelho, conjugado com peroxidase. A visualização da imunorevelação foi realizada pela adição de peróxido de hidrogênio e alfa-naftol tamponado (Figura 10B-banda 1). A banda 2 também foi imunorevelada e pode corresponder a outra GliCer com base esfingóide diferente.

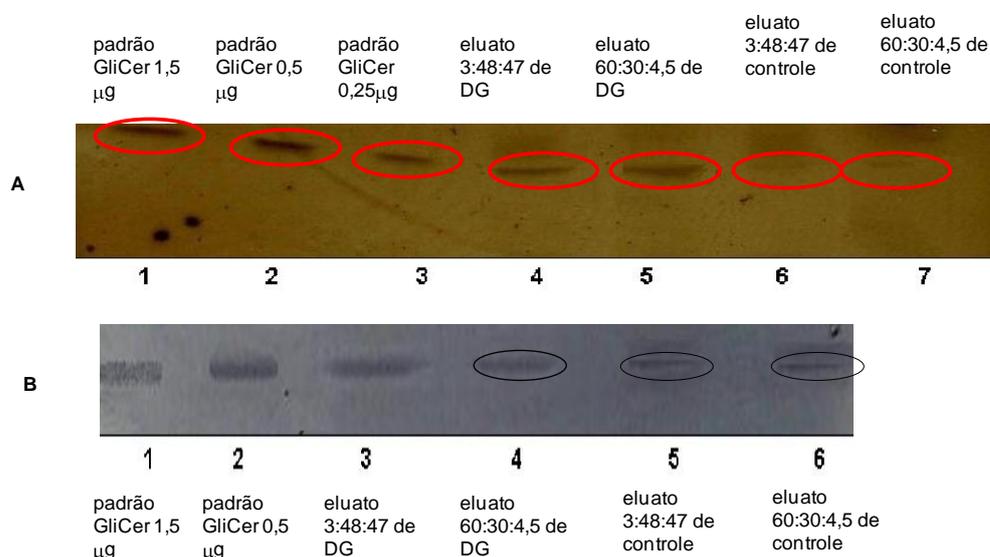


FIGURA 10. Análise por cromatografia em camada delgada de alta resolução (HPTLC) dos resíduos dos eluatos da coluna SepPak<sup>®</sup> obtidos pelo processamento de plasma de paciente com DG sem TRE e de controle. Sistemas de solvente: 1º C/M/água (65:25:4) e 2º hexano/éter etílico/ácido acético (50:50:1).

A) Revelador: CuSO<sub>4</sub> 10%/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 8% a 150°C. 1: padrão GliCer 1,5 µg; 2: padrão GliCer 0,5 µg; 3: padrão GliCer 0,25 µg; 4: eluato 3:48:47 de paciente Gaucher; 5: eluato 60:30:4,5 de paciente Gaucher; 6: eluato 3:48:47 de controle; 7: eluato 60:30:4,5 de controle.

B) Imunorevelação: 1: padrão GliCer 1,5 µg; 2: padrão GliCer 0,5 µg; 3: eluato 3:48:47 de paciente Gaucher; 4: eluato 60:30:4,5 de paciente Gaucher; 5: eluato 3:48:47 de controle; 6: eluato 60:30:4,5 de controle.

Na tentativa de aperfeiçoar a obtenção de glicosilceramida somente no eluato C:M:água (60:30:4,5), primeiramente, aumentou-se os volumes dos sistemas de eluição da coluna SepPak<sup>®</sup>, e posteriormente aumentou-se também a quantidade da

resina (50 mg para 65 mg). Os resultados continuaram sendo semelhantes ao da Figura 10. Portanto, decidiu-se unir os dois eluatos para obter uma maior quantidade de GliCer (coletados no mesmo recipiente) a partir de uma coluna de 65mg de SepPak<sup>®</sup>.

Com objetivo de testar a recuperação de glicosilceramida com adoção deste procedimento realizou-se um protocolo com 4 extratos lipídicos totais de plasma de um mesmo indivíduo normal. Este experimento está detalhado no parágrafo abaixo e está resumido no fluxograma da Figura 11 e documentado na Figura 12.

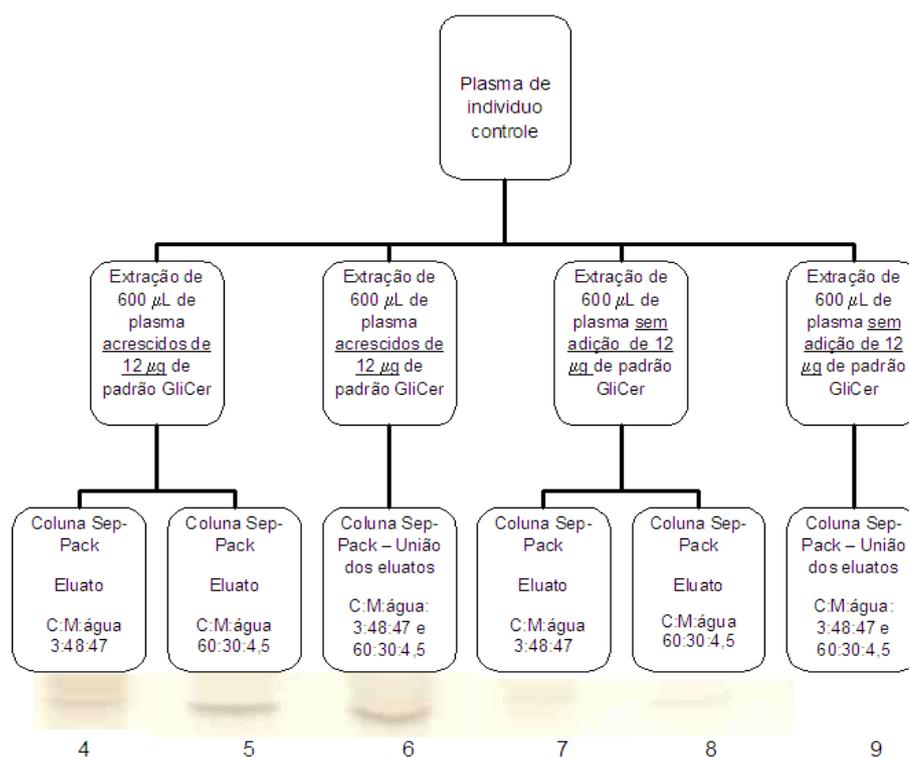


FIGURA 11. Fluxograma resumido da extração e purificação de glicosilceramida de plasma indivíduo normal com e sem adição de 12 µg do padrão glicosilceramida. As bandas correspondentes à glicosilceramida de cada uma das extrações podem ser visualizadas nas linhas abaixo de cada célula obtidas da Figura 12.

Ao primeiro destes extratos adicionou-se 12  $\mu\text{g}$  do padrão glicosilceramida e os eluatos da SepPak<sup>®</sup> C:M:água (3:48:47) e C:M:água (60:30:4,5) foram coletados separadamente. Ao segundo extrato lipídico, também, acrescentou-se 12  $\mu\text{g}$  do padrão glicosilceramida, entretanto os eluatos foram coletados num mesmo recipiente. O terceiro e quarto extratos lipídicos não receberam a adição de glicosilceramida e foram processados como o primeiro e segundo extratos, respectivamente.

A partir da análise visual do esquema da Figura 11 e da cromatografia representada pela Figura 12 foi possível verificar que nos extratos onde foi adicionado glicosilceramida ocorreu uma significativa diferença de intensidade entre as bandas correspondentes a este glicoesfingolípido (Figura 12-linhas 4, 5, 6), quando comparadas às mesmas sem adição do padrão (Figura 12-linhas 7, 8 e 9). Isto corrobora com os resultados da imunorevelação de que estas bandas correspondem ao glicoesfingolípido glicosilceramida extraído de plasma (Figura 14B). A análise densitométrica da migração do padrão em diferentes quantidades (Figura 12- linhas 1, 2 e 3) revelou uma linearidade de detecção (Figura 13). Além disto, permitiu o cálculo do rendimento da metodologia proposta que foi de 12%. Numa primeira interpretação, este valor parece baixo, mas a indicação preponderante é que a metodologia evidencia, proporcionalmente, a banda de GliCer.

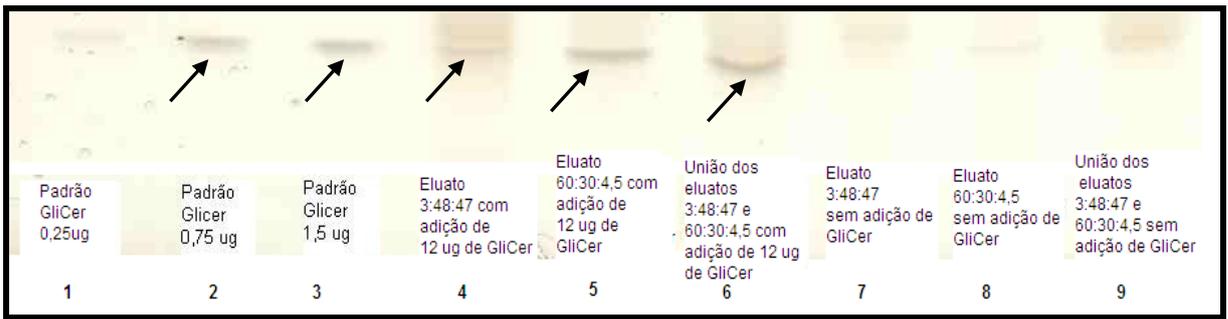


FIGURA 12. Análise por HPTLC dos resíduos obtidos durante a extração e purificação de glicosilceramida de plasma de indivíduo normal com e sem adição de 12  $\mu\text{g}$  de GliCer. Sistemas de solvente: 1º C/M/água (65:25:4) e 2º hexano/éter etílico/ácido acético (50:50:1). Revelador:  $\text{CuSO}_4$  10%/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 8% a 150°C.

1: padrão GliCer 0,25  $\mu\text{g}$ ; 2: padrão GliCer 0,75  $\mu\text{g}$ ; 3: padrão GliCer 1,5  $\mu\text{g}$  4: Eluato 3:48:47 com adição de 12  $\mu\text{g}$  de GliCer; 5: Eluato 60:30:4,5 com adição de 12  $\mu\text{g}$  de GliCer; 6: União dos eluatos 3:48:47 e 60:30:4,5 com adição de 12  $\mu\text{g}$  de GliCer; 7: Eluato 3:48:47 sem adição de GliCer; 8: Eluato 60:30:4,5 sem de GliCer; 9: União dos eluatos 3:48:47 e 60:30:4,5 sem adição de GliCer.

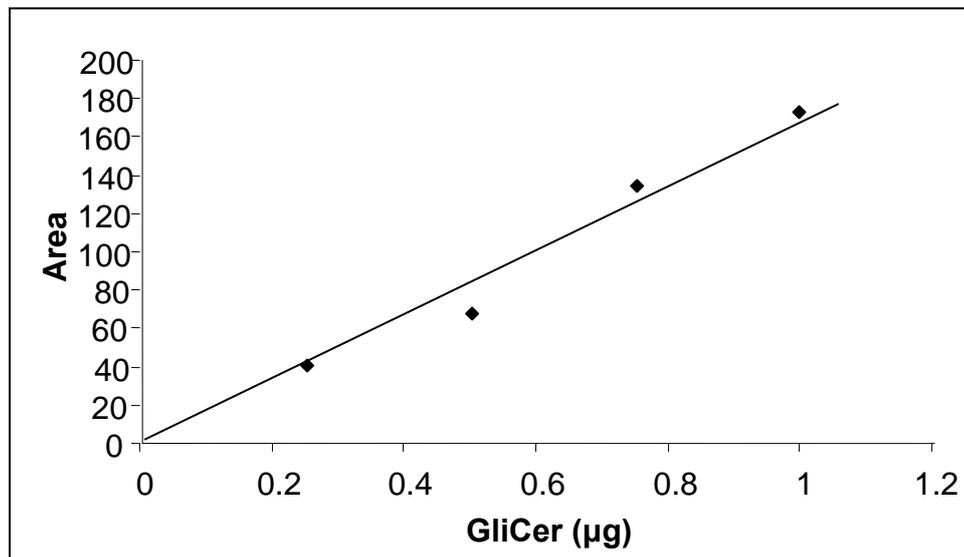


FIGURA 13. Curva Padrão de GliCer. A área foi obtida através de análise densitométrica dos cromatogramas das Figuras 10A e 12.

A linearidade da quantificação de GliCer é mostrada na Figura 13 ( $r = 0.98$ ). Esses dados foram obtidos por densitometria da concentração padrão de GliCer

após corrida cromatográfica. O coeficiente intra-ensaio (n=6) medido nos plasmas dos controles e dos pacientes com DG foi <5.3% para GliCer. O coeficiente inter-ensaio (n=6) foi <9%.

Os resultados acima encaminharam o estabelecimento do protocolo descrito em detalhes no item 3.4.4 desta tese. Resumidamente, a metodologia para a avaliação da GliCer foi padronizada a partir 600 µL de plasma sanguíneo. Este volume foi tratado, seqüencialmente, com 3 misturas de C:M em proporções distintas. Os 3 extratos orgânicos foram reunidos formando o extrato lipídico total. Este extrato foi submetido a uma coluna ácido silícico com eluições de misturas de solventes C:M (98:2) e A:C (9:1). O último eluato sofreu uma metanólise suave e posteriormente foi submetido a uma coluna de SepPak<sup>®</sup> C-18 com eluições de C:M:água(3:48:47) e (60:30:4,5). Estes eluatos foram reunidos, e esta mistura foi denominada de extrato lipídico purificado. Este, por sua vez, foi analisado por HPTLC, onde a banda correspondente a GliCer foi detectada por revelador químico (CuSO<sub>4</sub>/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) e confirmada por imunorevelação com anticorpo primário específico. A quantificação foi realizada por análise densitométrica do cromatograma comparada com quantidades conhecidas de Glicer detectadas na mesma migração.

#### **4.2.2. Quantificação de glicosilceramida em pacientes com e sem tratamento por reposição enzimática**

A metodologia utilizada neste trabalho permitiu extrair (C / M), purificar (coluna de ácido silícico, metanólise e coluna de Sep-Pack<sup>®</sup>) separar, detectar e quantificar (HPTLC com revelação química e densitometria) GliCer no plasma de pacientes com DG com e sem tratamento por TRE, bem como, GliCer de indivíduos normais (Figura 14A - banda 1). A presença de GliCer (banda 1), no cromatograma foi confirmada

pela imunorevelação com anti-glicosilceramida humana (anticorpo primário), seguido de imunoglobulina de cabra anti-coelho (anticorpo secundário) conjugado com peroxidase (Figura 14B, linhas 1b e 2b). Esta banda foi detectada apenas nas amostras das linhas 4, 5 e 7 (Figura 14A), ou seja, nos pacientes com DG sem tratamento.

Nas linhas 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 da Figura 14A observa-se outra banda (banda 2), com velocidade de migração ligeiramente superior a da GliCer padrão (banda 1), com conteúdo semelhante em todas as amostras. A banda 2 também foi imunorevelada (Figura 14B). Esta banda, que está presente em todos os indivíduos analisados, poderia corresponder a outra GliCer com uma cadeia esfingóide diferente, como mencionado no sub-ítem anterior.

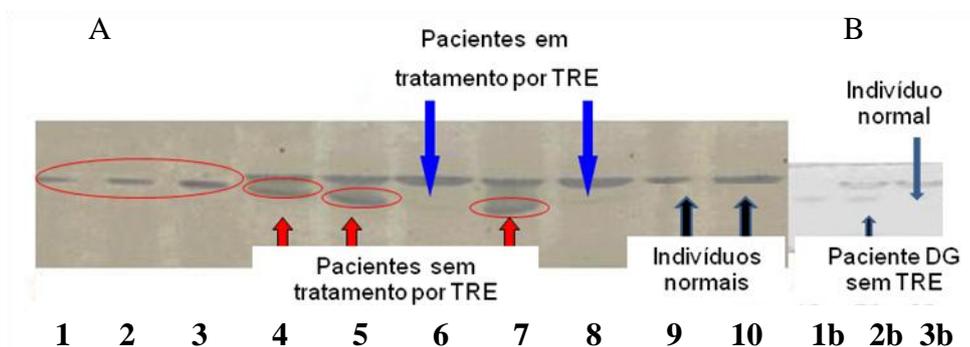


FIGURA 14. Análise por HPTLC dos extratos lipídicos purificados obtidos de plasmas de pacientes com DG sem e com tratamento por TRE, e indivíduos normais.

A. Revelador: CuSO<sub>4</sub> 10% / 8% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1:padrão GliCer 0,25 µg; 2:padrão GliCer 0,5 µg; 3:padrão GliCer 1,5 µg; 4, 5 e 7:pacientes com DG sem tratamento; 6 e 8:pacientes com DG com tratamento por TRE; 9 e 10:Indivíduos normais

B. Imunorevelação: 1b:padrão GliCer 0,5 µg; 2b:paciente com DG sem tratamento; 3b:indivíduo normal.

A Tabela I mostra as concentrações de GliCer obtidas por análise densitométrica em relação ao volume de plasma ou quantidade de proteínas da amostra. A concentração de GliCer expressa em unidades diferentes é significativamente maior ( $p < 0,001$ ) nos pacientes com DG que não estão recebendo tratamento quando comparados a pacientes com DG que estão sendo tratados com TRE ou quando comparados a indivíduos normais. Não há diferença significativa entre os níveis plasmáticos de GliCer de indivíduos normais em comparação com a dos pacientes com DG em tratamento.

TABELA 1. Dados densitométricos da quantificação de glicosilceramida em plasma de pacientes com DG sem e com tratamento por TRE, comparada com indivíduos normais.

<b>Grupos</b>	<b>GliCer</b> ( $\mu\text{g}/600\mu\text{L}$ plasma)	<b>GliCer</b> ( $\mu\text{mol}/\text{L}$ plasma)	<b>GliCer</b> (ng/mg de proteínas)
Normal (n = 5)	$0.03 \pm 0.03^*$	$0.07 \pm 0.07^*$	$0.67 \pm 0.78^*$
Pacientes com DG sem TRE (n = 5)	$0.57 \pm 0.24$	$1.59 \pm 0.27$	$13.7 \pm 1.25$
Pacientes com DG com TRE (n = 5)	$0.05 \pm 0.02^*$	$0.11 \pm 0.04^*$	$1.23 \pm 0.68^*$

Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n = 5).

\* Diferente estatisticamente do grupo DG sem tratamento,  $p < 0.001$  por ANOVA seguida de teste de Tukey.

#### **4.3. Quantificação da quemoquina CCL18/PARC**

Neste estudo foi realizada a quantificação da proteína CCL18/PARC em 5 pacientes com DG sem tratamento, em 5 pacientes com DG em TRE e em 5 indivíduos normais.

Conforme pode ser observado na Figura 15 a média na concentração de CCL18 nos pacientes com DG foi de  $642 \pm 7,84$  ng/mL de plasma, enquanto nos 5 pacientes com DG em tratamento por reposição enzimática foi de  $397 \pm 57,23$  ng/mL de plasma. Nos indivíduos normais (controles) encontramos uma média de  $23,36 \pm 4,13$  ng/mL de plasma.

Após análise estatística ( $F = 350,34$  e  $p < 0,0001$ ), verificamos que os indivíduos com DG apresentam uma concentração de CCL18 significativamente maior que aquela dos controles, bem como aquela dos pacientes em tratamento.

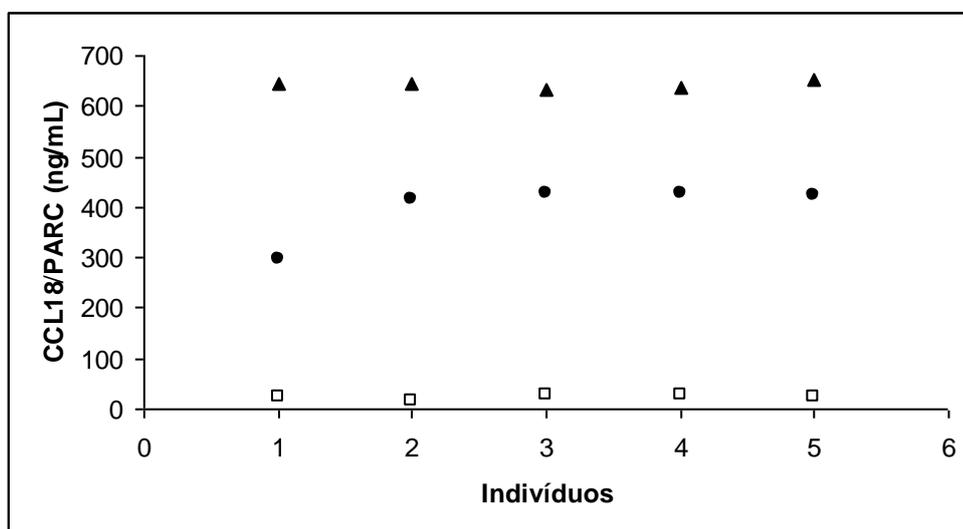


FIGURA 15: Medida da CCL18/PARC (ng/mL) em plasma de pacientes com Doença de Gaucher sem tratamento (▲), pacientes com Doença de Gaucher em tratamento por TRE (●) e indivíduos normais (□), Valores de referência: 33 ng/mL; variação: 10-72 ng/mL.

## 5. DISCUSSÃO

A Doença de Gaucher é uma doença de depósito lisossômico de herança autossômica recessiva, que leva ao acúmulo de glicosilceramida no interior dos lisossomos principalmente em células do sistema retículo-endotelial. Este acúmulo deve-se à ausência ou deficiência da enzima lisossomal  $\beta$ -glicosidase ácida ( $\beta$ -gli, D-glicosil-N-acilesfingosina glicohidrolase, EC 3.2.1.45). Em decorrência da deficiência da atividade da  $\beta$ -gli, fica prejudicada a clivagem da ligação  $\beta$ -glicosídica do glicocerebrosídeo (glicosilceramida) que resulta em glicose e ceramida (Grabowski e Horowitz,1997).

No presente estudo nós desenvolvemos uma metodologia capaz de extrair, purificar e quantificar a GliCer em amostras de plasma de indivíduos com DG comparando-os com amostras de indivíduos normais. Além disso, conseguimos comparar a quantidade de GliCer em indivíduos com DG em tratamento por TRE com aqueles não submetidos ao tratamento. A precisão da metodologia desenvolvida foi determinada pela reprodutibilidade dos experimentos.

### 5.1. Caracterização das amostras através das atividades das enzimas beta glicosidase e quitotriosidase

Este trabalho contou com amostras de plasma de pacientes com Doença de Gaucher, cujo diagnóstico foi confirmado através da determinação enzimática leucocitária da enzima  $\beta$ -glicosidase ( $\beta$ -gli). Este diagnóstico foi realizado utilizando-se tampão-fosfato pH 5,5 e o substrato 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-glicosídeo (Peters et al,1976), como citado por Michelin e colaboradores (2005).

Pacientes homozigotos para a DG tipo I são usualmente diagnosticados pela determinação da atividade enzimática, resultando em uma atividade quase nula ou nula da enzima  $\beta$ -gli (Cheng e Wang, 2008). No presente estudo, observou-se que os indivíduos com DG tipo I apresentaram uma diminuição na atividade da  $\beta$ -glicosidase aproximadamente de 95% em leucócitos em relação à atividade média dos indivíduos normais (Figura 7), o que está de acordo com Michelin e colaboradores (2004). Beutler e Saven (1990) também já haviam observado uma variação na atividade desta enzima na faixa de 10% a 30% abaixo do normal em pacientes com Doença de Gaucher.

Todavia os autores abaixo listados destacam que a deficiência relativa da atividade da  $\beta$ -gli, utilizando-se para essa medida substratos artificiais em leucócitos ou em fibroblastos cutâneos cultivados, não possui valor preditivo confiável para avaliar a gravidade clínica (prognóstico) e tampouco permitem distinguir os subtipos e variantes neurológicos e não neurológicos da DG (Basu et al., 1984; Glew et al., 1985; Grace et al., 1993).

Com ênfase ainda na caracterização das amostras do presente estudo realizamos a avaliação da atividade da enzima quitotriosidase no plasma dos indivíduos analisados.

A quitotriosidase (QT), também conhecida como quitinase humana (EC 3.2.1.14) é uma glicosil hidrolase secretada exclusivamente por macrófagos ativados, está usualmente presente no fígado, rins, baço, pulmão e medula óssea (Hollak et al., 1994; Guo et al., 1995; Korolenko et al., 2000; Aerts et al., 2008). Acredita-se que, por ser sintetizada por macrófagos, a QT reflète processos inflamatórios (Van Eijk et al., 2005), o que está de acordo com achados prévios, demonstrando uma elevada atividade da QT em neonatos com infecções fúngicas e bacterianas

(Labadaridis et al., 2005; Wajner et al, 2007; Muzzarelli, 2010). Estes mesmos autores destacam que apesar dos vários estudos já realizados, não se sabe ainda as funções da QT em seres humanos e tampouco são conhecidos os mecanismos exatos pelos quais a QT é produzida em alta quantidade na DG e em outras esfingolipidoses.

Relativo ao aumento da atividade da QT em doenças lisossomais tem sido postulado que este aumento seja decorrente da ativação de macrófagos em virtude do acúmulo de esfingolipídios que podem gerar ceramida, a qual é considerada imunogênica (Ballou et al., 1996; Lee, 2009; Muzzarelli, 2010).

No presente estudo, verificamos que nos indivíduos com DG a atividade plasmática da QT apresentou-se muito acima da normalidade (em média 500 vezes) (Figura 8), como já havia sido descrito na literatura por Hollak e colaboradores (1994), Wajner e colaboradores (2007) e Muzzarelli (2010).

No trabalho em discussão a caracterização dos pacientes com DG através das atividades enzimáticas da  $\beta$ -gli em leucócitos e da quitotriosidase no plasma foi eficiente, entretanto, convém salientar que a atividade destas enzimas ou outros marcadores bioquímicos não devem ser utilizados isoladamente na avaliação da gravidade da doença (Robinson e Glew, 1980; Giraldo et al., 2000; Cox, 2001; Aerts et al., 2008).

Segundo Rodrigues e colaboradores (2004) e Aerts e colaboradores (2003), aproximadamente 6,5 % da população possuem deficiência na atividade da QT. Nestes pacientes, o uso de outro biomarcador para DG torna-se necessário. Como a GliCer está em concentração aumentada na DG e, conforme o tratamento vai se tornando eficaz, sua concentração diminui (Barton et al., 1990; Fost et al., 2003; Groener et al., 2008) seu uso como biomarcador poderia ser postulado. Sendo

assim, os dados obtidos na quantificação de GliCer poderiam ser usados tanto como um método auxiliar no diagnóstico como um parâmetro de monitoramento do tratamento.

No contexto acima, outros biomarcadores possivelmente úteis para o diagnóstico da DG encontram-se em investigação, como a proteína quemoquina CCL18/PARC (Whitfield et al., 2002; Boot et al., 2004; Chang et al., 2010).

## **5.2. Extração, purificação, detecção e quantificação de glicosilceramida**

A avaliação da GliCer, acumulada na doença de Gaucher, é um forte candidato como biomarcador bioquímico. Neste trabalho nós propomos uma metodologia para avaliação de GliCer, possível de ser desenvolvida em laboratórios clínicos, baseada na extração e purificação deste glicosfingolípido, a partir de 600 µL de plasma e com posterior quantificação densitométrica da banda de GliCer isolada por HPTLC.

Aelson e colaboradores (2009) destacam que a extração de lipídios é uma determinação importante em estudos bioquímicos. Os autores salientam que existem diversos procedimentos para extração de lipídeos, porém todos têm em comum a utilização de solventes orgânicos. Segundo Christie (1993), existe um grande número de procedimentos para extração lipídica, variando, por exemplo, na natureza dos solventes empregados, na sua proporção numa mistura, no método de purificação. O mesmo autor ressalta que a metodologia escolhida deverá ser a mais prática e a que apresentar o melhor rendimento extrativo.

Para Schnaar (1994), outro aspecto crítico na escolha da metodologia para extração e detecção é a natureza do glicosfingolípido a ser isolado. O autor salienta que por razões pragmáticas os glicosfingolípídios podem ser classificados

em 4 categorias: glicoesfingolipídios neutros com poucas unidades de monossacarídeos – 5 ou menos; glicoesfingolipídios neutros com muitas unidades de monossacarídeos – 5 ou mais; glicoesfingolipídios ácidos – gangliosídeos e glicoesfingolipídios sulfatados.

Descrito no trabalho de Aelson e colaboradores (2009), um dos procedimentos de extração mais versáteis e efetivos ainda é a metodologia de Bligh e Dyer (1959) que corresponde a uma versão simplificada do procedimento clássico, usando clorofórmio-metanol, proposto por Folch e colaboradores (1957).

Aelson e colaboradores (2009), Schnaar (1994) e Christie (1993) destacam em seus trabalhos que, apesar de algumas desvantagens, como a toxicidade dos solventes usados e a indesejável extração dos contaminantes não-lipídicos da fase orgânica, os métodos de Folch e colaboradores (1957) e Bligh e Dyer (1959) são largamente utilizados, tanto como propostos originalmente, quanto modificados. Levando isto em consideração, escolhemos basear a extração de GliCer de nossas amostras na utilização de clorofórmio-metanol.

No presente trabalho obtivemos, no processo de extração de GliCer, resultados compatíveis com métodos já estabelecidos encontrados na literatura pertinente, entretanto convém salientar que utilizamos apenas 600  $\mu\text{L}$  de plasma, enquanto que os trabalhos pesquisados utilizaram um volume igual ou superior a 50 mL de plasma. A GliCer foi extraída do plasma conforme descrito previamente por Doering e colaboradores (1999) com adequações necessárias ao volume de 600  $\mu\text{L}$  de plasma de cada amostra analisada. Os três sistemas de solventes, utilizando clorofórmio-metanol, foram eficientes para alcançarmos uma boa extração (Figura 6).

A fim de purificar o extrato lipídico total, eliminando os lipídios neutros e os fosfoglicerídios para o isolamento de GliCer, procedemos as etapas de purificação de

acordo com a metodologia preconizada pelos autores Ullman e McCluer (1977) - Coluna de ácido silícico e Metanólise alcalina - e Williams e McCluer (1980) - Coluna Sep-Pack<sup>®</sup>. Os extratos lipídicos assim purificados foram analisados por HPTLC e a identidade da banda de GliCer foi confirmada por imunorevelação. Isto nos deu segurança de que estávamos realmente trabalhando com o glicolípido de interesse (Figura 9 e Figura 10).

O sistema eluente utilizado na coluna Sep-Pack<sup>®</sup> para eliminação de sais e compostos de baixo peso molecular obtidos na metanólise alcalina foi a mistura C:M:água), comumente utilizado para análise de glicolípídios neutros (Lepage, 1964). As proporções utilizadas neste sistema foram 3:48:47 e 60:30:4,5 (Williams e McCluer, 1980). No primeiro sistema são eluídos íons e compostos polares de baixa massa molecular (palmitato, estearato, fosfato, colina, etanol-amina, etc) enquanto no segundo sistema são eluídos compostos menos polares de massa molecular superior aos do primeiro eluato (glicolípídios e esfingomielina). As Figuras 11 e 12 demonstram que a GliCer em baixa quantidade é eluída com o sistema C:M:água (60:30:4,5). Entretanto, quando a quantidade de GliCer no plasma é elevada, como no caso de DG, parte da GliCer também é eluída no primeiro sistema (C:M:água - 3:48:47). Por isto os dois eluatos foram reunidos, e esta mistura foi denominada de extrato lipídico purificado o qual foi analisado por HPTLC. A interferência dos sais na migração cromatográfica foi pequena e não prejudicou a revelação e quantificação da GliCer. Este procedimento mostrou-se eficiente nas condições padronizadas uma vez que eluiu GliCer.

Para análise por cromatografia em camada delgada de alta resolução (HPTLC), do extrato lipídico purificado obtido da coluna Sep-Pack<sup>®</sup>, foram utilizados dois sistemas de solventes: o primeiro consistiu em C:M:água (65:25:4) e o segundo em

hexano / éter etílico / ácido acético (50:50:1). Estes sistemas de solventes, documentados na literatura por Tani-ichi e colaboradores (2005), são utilizados para separação cromatográfica de lipídios neutros, dentre eles GliCer. Estes sistemas de solventes mostraram ser eficientes uma vez que a banda correspondente a GliCer foi separada das demais bandas correspondentes a outros glicolipídios. A confirmação da identidade da banda de GliCer foi realizada por imunorevelação, usando anticorpo primário feito em coelho anti-glicosilceramida humana e anticorpo secundário anti-coelho (IgG) conjugado com peroxidase obtido em cabra.

De acordo com Morrison (1986), a diferente mobilidade cromatográfica observada para glicosfingolipídios neutros está relacionada ao número de oses constituintes, à natureza dos ácidos graxos presentes, bem como ao tipo de álcool ou base aminada presente. Neste trabalho verificamos uma mobilidade diferenciada na migração do padrão de GliCer no sistema eluente recomendado para lipídios neutros, bem como na migração das bandas correspondentes a GliCer de plasma.

Considerando-se que foram tomadas todas as precauções no intuito de padronizar todos os parâmetros para o isolamento e identificação cromatográfica de GliCer, a qual foi ainda confirmada por imunorevelação, sugerimos que esta diferença no perfil (Rf) de migração deve-se, principalmente, a diferenças na concentração do glicosfingolipídio nas bandas analisadas.

Após os ajustes na purificação de GliCer numa única fração, conforme observado na figura 14, associado ao estudo da linearidade da detecção e quantificação de GliCer (Figura 13), testamos se as condições experimentais estipuladas poderiam ser utilizadas como diagnóstico complementar e como monitoramento do tratamento da DG.

Os resultados apresentados na Figura 14 e Tabela 1 demonstram um

aumento nos níveis plasmáticos de GliCer em pacientes com DG sem tratamento por TRE (linhas 4, 5 e 7) enquanto os níveis plasmáticos de GliCer em indivíduos normais (linhas 9 e 10) e em indivíduos com DG em tratamento por reposição enzimática (linhas 6 e 8) foram similares estatisticamente, apresentando comparativamente aos pacientes sem tratamento uma redução na concentração do glicosfingolípido. Todos os grupos analisados mostraram um comportamento semelhante ao discutido na literatura (Vance and Sweeley 1967; Ullman and McCluer 1977; Gornati et al., 2002).

Com a metodologia aqui proposta, nós conseguimos diferenciar indivíduos normais daqueles pacientes com DG submetidos ou não ao tratamento por TRE. A metodologia testada não necessita utilização de equipamentos especializados e caros e pode ser aplicada simultaneamente em um número considerável de amostras. Outra vantagem do nosso método quando comparado a metodologias mais antigas (Vance and Sweeley 1967), foi a padronização para análise de pequeno volume de plasma e a reprodutibilidade nos experimentos realizados.

Alguns autores mencionam que os níveis de GliCer, em pacientes com DG, podem estar modificados, tanto em concentração quanto em distribuição percentual, como consequência na mobilização de GliCer entre lipoproteínas plasmáticas, eritrócitos e células brancas do sangue. Este fato sugere alterações nos componentes sangüíneos como hemácias e plaquetas modificando desta maneira o padrão de distribuição de glicolípídeos no plasma (Dawson et al., 1976; Van Den Bergh e Tager 1976; G. Dawson e Oh 1977; Wennekes, 2009). No presente trabalho, observamos uma concentração de GliCer no plasma de pacientes com GD sem tratamento em torno de 17 vezes maior do que aquela de indivíduos normais.

Segundo Whitfield e colaboradores (2002), pacientes com DG apresentam, em média, 16,3  $\mu\text{mol/L}$  de GliCer no plasma enquanto indivíduos normais apresentam 7,4  $\mu\text{mol/L}$ . Para Groener e colaboradores (2008) a concentração de GliCer em plasma de pacientes não tratados ficou em 17,5 nmol/mL, com intervalo de 6,5-45,5 nmol/mL, sendo que a média do grupo controle foi estabelecida em 5,9 nmol/mL e o intervalo de 4,0-8,6 nmol/mL. Estes valores evidenciam uma sobreposição entre pacientes e controles, dificultando assim a avaliação entre os grupos analisados. Nosso método não demonstrou sobreposição da concentração de GliCer entre os indivíduos normais (0 a 0,15  $\mu\text{mol/L}$ ) e pacientes com DG sem tratamento (0,44 a 1,77  $\mu\text{mol/L}$ ).

Nossos resultados mostraram que indivíduos com DG sem TRE possuem em média 1,59  $\mu\text{mol/L}$  e indivíduos normais 0,07  $\mu\text{mol/L}$  de GliCer no plasma. Embora estes resultados sejam 10 vezes menores que aqueles encontrados por Whitfield e colaboradores (2002) e tendo uma recuperação de GliCer de aproximadamente 12%, a metodologia aqui descrita permite a observação de uma grande diferença entre os grupos estudados em relação ao conteúdo de GliCer. A literatura pertinente mostra que existem métodos de detecção que determinam quantidades menores de GliCer (Groener et al., 2007; Ghauharali-van Der Vlugt et al., 2008 ). No entanto, ressaltamos que o método descrito no presente trabalho permitiu com a extração de pequeno volume de plasma (600  $\mu\text{L}$ ) detectar diferenças entre controles e pacientes DG com e sem tratamento por TRE, dados importantes que podem ser utilizados na comprovação do diagnóstico bem como parâmetro no monitoramento do tratamento da doença.

### **5.3. Quantificação da quemoquina CCL18/PARC**

Loetscher e colaboradores (2000) pontuam que quemoquinas são citocinas quimiotáticas de baixo peso molecular (7 – 12K Da) envolvidas entre outras funções com a migração de leucócitos durante a resposta inflamatória, a maturação de linfócitos, a angiogênese e o crescimento tumoral. Zlotnik e Yoshie (2000) e Gerard e Rollins (2001) lembram que já foram descritas mais de 50 quemoquinas humanas, sendo classificadas em 4 famílias com base no número e na localização dos resíduos de cisteína N-terminais

As quemoquinas, de acordo com os autores acima citados, podem ainda ser separadas em duas categorias dependendo da forma como são expressas: 1) constitutivas ou, 2) induzidas. As quemoquinas constitutivas são produzidas normalmente em vários tecidos e recrutam leucócitos, principalmente linfócitos, para esses tecidos na ausência de inflamação. As quemoquinas induzidas (ou inflamatórias) são produzidas por várias células em resposta a estímulos inflamatórios e recrutam leucócitos para locais de inflamação.

Quemoquinas atuam através de receptores trans-membranas de alta afinidade expostos na superfície de células circulantes. Onze receptores diferentes para quemoquinas CC (chamadas CCR1 a CCR11) e seis para quemoquinas CXC (chamadas CXCR1 a CXCR6) já foram identificados. Os receptores de quemoquinas possuem sítios de ligação que podem ser específicos (CCR9, CXCR6), mas, comumente, o mesmo receptor pode ser alvo de ligação de várias quemoquinas do mesmo grupo (Murphy et al., 2000).

Segundo Murphy e colaboradores (2000) o estudo das quemoquinas tem mostrado uma possibilidade de utilização destas substâncias como marcadores da atividade inflamatória de determinada doença de forma mais específica do que os

marcadores atualmente utilizados, como a proteína C.

Os autores citados abaixo sugerem que a quemoquina CCL18/PARC pode ser uma provável marcadora para pacientes diagnosticados com doença de Gaucher e de importância fundamental para o acompanhamento clínico daqueles pacientes que são deficientes na atividade da enzima quitotriosidase (Moran et al., 2000; Boven et al., 2004; Boot et al., 2004; Deegan et al., 2005; Kzhyshkowska et al., 2007; Chang et al., 2010).

Os resultados experimentais obtidos com avaliação da quemoquina CCL18/PARC em nosso trabalho está documentado no item 4.3. e na figura 15. Nossos resultados reforçam os dados encontrados pelos autores acima mencionados os quais, também, encontraram níveis de CCL18/PARC bastante elevados no plasma de pacientes com doença de Gaucher.

Nossos resultados referentes à análise da concentração da quemoquina CCL18/PARC realizada em plasma de indivíduos normais e pacientes com DG com e sem tratamento por TRE corrobora com o trabalho de Boot e colaboradores (2004), onde os valores encontrados para concentração da quemoquina em pacientes com DG sem tratamento foi 29 vezes superior aos valores de indivíduos normais.

Em nosso trabalho os pacientes com DG sem e com tratamento por TRE mostraram um aumento na concentração plasmática da CCL18/PARC de 28 e 17 vezes, respectivamente, quando comparadas aos indivíduos normais. Outro dado importante no presente estudo foi que não ocorreu sobreposição entre os valores encontrados para os grupos analisados (pacientes com DG sem e com TRE e indivíduos normais). Esta reprodução dos resultados, comparativamente aos resultados de Boot e colaboradores (2004) fornecem evidência importante e reforçam

nossa expectativa de que esta proteína possa atuar como importante marcador para DG no monitoramento da intervenção terapêutica adotada.

#### **5.4. Correlação entre as avaliações realizadas neste trabalho (quitotriosidase, GliCer e CCL18/PARC)**

Apesar da importância já demonstrada da quitotriosidase e da possibilidade da utilização da CCL18/PARC no monitoramento da DG, estes marcadores precisam de estudos mais intensos no sentido de sua aplicabilidade na fisiopatologia da doença de Gaucher, uma vez que apresentam grande variabilidade nas suas habilidades para refletir idealmente a condição clínica da doença (Chien et al., 2010).

A análise da quitotriosidase como marcador bioquímico esbarra, conforme citado anteriormente, no fato de que aproximadamente 6,5% dos pacientes homocigotos para DG não apresentam nenhuma atividade para esta enzima, como decorrência de mutação no gene da QT, situado no cromossomo 1q31-q32 (Boot et al., 1998; Aguilera et al., 2003).

Após revisão criteriosa na literatura podemos sugerir no que tange a quemoquina CCL18/PARC, que nosso trabalho é um dos poucos relacionados à pesquisa desta proteína em plasma de pacientes com DG (Boot et al., 2004; van Breemen et al., 2006; Maire et al., 2007), sendo o único com pacientes brasileiros. Entretanto, conforme dados da literatura esta condição não é específica para DG. Foram encontrados níveis elevados da CCL18/PARC em trabalhos realizados em pacientes com aterosclerose, hepatite C ativa, hipersensibilidade alérgica de contato, carcinoma séptico, bem como artrite reumatóide (Reape et al., 1999; Goebeler et al., 2001).

Tendo em vista o conjunto de resultados acima descritos e levando-se em consideração as peculiaridades dos marcadores já estabelecidos e os que ainda necessitam de mais pesquisas, sugerimos que os dados obtidos na quantificação de GliCer de pacientes com DG poderiam ser usados tanto como um método auxiliar no diagnóstico e como parâmetro de monitoramento do tratamento.

De acordo com Meikle e colaboradores (2008) a análise de lipídios na doença de Gaucher pode ser utilizada para monitorar a terapia e correlacioná-la com a severidade da doença. Devemos salientar também que o nível elevado de GliCer em pacientes com DG e sua diminuição nos pacientes em tratamento por TRE reflete condições clínicas exclusivas desta patologia. Em nosso estudo isto também foi comprovado, pois indivíduos com DG em tratamento apresentaram um nível inferior de GliCer comparado com aqueles com DG sem tratamento. Além disso neste trabalho foi possível detectar uma redução de 90% da concentração de GliCer e de 40% na concentração de CCL18/PARC nos pacientes com DG com TRE em comparação com as respectivas concentrações nos paciente com DG sem tratamento.

Finalmente, a metodologia estabelecida neste trabalho permitiu extrair, purificar, separar, detectar e quantificar glicosilceramida no plasma de pacientes com DG com e sem tratamento por TRE, bem como, GliCer de indivíduos normais. Tanto a quantificação da GliCer quanto a dosagem de CCL18/PARC permitiram identificar, através dos respectivos valores obtidos de plasma, os diferentes grupos de indivíduos analisados. Portanto, estas duas avaliações podem ser associadas às determinações da atividade enzimática da quitotriosidase como biomarcadores da DG.

## **6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS:**

### **6.1. Conclusões:**

De acordo com os objetivos estabelecidos para este trabalho, obtivemos as seguintes conclusões:

#### **Objetivo 1:**

Medir a atividade das enzimas beta-glicosidase e quitotriosidase em plasma de pacientes com Doença de Gaucher sob tratamento ou não por reposição enzimática (TRE) e em plasma de indivíduos normais, de modo a caracterizar nossa amostra.

#### **Conclusões:**

1. A atividade em leucócitos da beta-glicosidase nos pacientes com DG mostrou-se aproximadamente 95% menor em relação à atividade média dos indivíduos normais, confirmando o diagnóstico inicial dos pacientes;
2. A atividade da enzima quitotriosidase mostrou-se muito aumentada em plasma de pacientes com DG, cerca de 500 vezes, auxiliando na confirmação do diagnóstico.

**Objetivo 2:**

Extrair, purificar e quantificar a glicosilceramida de amostras de plasma de pacientes com doença de Gaucher com e sem tratamento por reposição enzimática (TRE) e de plasma de indivíduos normais.

**Conclusões:**

1. Baseado na literatura estabeleceu-se um método de extração lipídica total a partir de um volume pequeno de plasma (600 µL) usando 3 misturas diferentes de clorofórmio-metanol;
2. Utilizando uma coluna de ácido silícico, metanólise alcalina e uma Coluna Sep-Pack<sup>®</sup> purificou-se o extrato lipídico total, eliminando lipídios neutros e fosfoglicerídios;
3. A partir de uma cromatografia por HPTLC, separou-se a banda correspondente a GliCer das bandas correspondentes a outros glicolipídios. A banda de GliCer foi detectada por revelação química e foi confirmada por imunorevelação usando anticorpo primário específico;
4. Foi possível identificar-se a banda correspondente à GliCer em plasma de indivíduos normais e pacientes com DG submetidos ou não à TRE. A quantificação da GliCer foi realizada por comparação das densitometrias do cromatograma de cada amostra com as densitometrias de quantidades conhecidas de GliCer submetidas simultaneamente a HPTLC.

**Objetivo 3:**

Comparar o conteúdo de glicosilceramida de pacientes com Doença de Gaucher sob tratamento por TRE com aqueles sem TRE e indivíduos normais de modo a verificar-se se este é um bom parâmetro na separação entre estes grupos de indivíduos.

**Conclusões:**

1. Plasma de pacientes com DG sem tratamento possuem aproximadamente 20 vezes mais GliCer que plasma de indivíduos normais e 11 vezes mais GliCer que indivíduos com DG em tratamento;
2. Plasma de pacientes com DG em tratamento não diferem na concentração de GliCer quando comparados com plasma de indivíduos normais;
3. A técnica de extração, purificação e quantificação de GliCer proposta permitiu diferenciar os 3 grupos de indivíduos.

**Objetivo 4:**

Medir e comparar a concentração de quemoquina CCL18/PARC em plasma de pacientes com Doença de Gaucher sob tratamento ou não por reposição enzimática (TRE) e em plasma de indivíduos normais.

**Conclusões:**

1. Os valores encontrados para concentração da quemoquina em pacientes com DG sem tratamento foram 28 vezes superiores aos valores de indivíduos normais;

2. A concentração de quemoquina CCL18/PARC em plasma de pacientes com DG em tratamento por TRE foi 17 vezes maior que aquela de indivíduos normais;
3. A avaliação da concentração de CCL18/PARC permitiu diferenciar os 3 grupos de indivíduos.

**Objetivo 5:**

Correlacionar a avaliação da quitotriosidase, análise quantitativa da glicosilceramida e níveis plasmáticos da quemoquina CCL18/PARC obtidos neste trabalho.

**Conclusões:**

1. As três avaliações permitiram distinguir indivíduos normais de pacientes com DG;
2. A concentrações plasmáticas de GliCer e CCL18/PARC podem ser associadas à atividade enzimática da quitotriosidase como biomarcadores da DG.

## **6.2. Perspectivas:**

1. Determinar outros fatores pró-inflamatórios séricos em plasma de pacientes com Doença de Gaucher com e sem tratamento, comparando-os com a quemoquina CCL18/PARC.
2. Estabelecer correlações entre os resultados da análise quantitativa do glicocerebrosídeo e dos níveis plasmáticos da quemoquina CCL18/PARC, com o genótipo e as manifestações clínicas da doença;
3. Estabelecer correlações entre os resultados da análise quantitativa do glicocerebrosídeo, da atividade da quitotriosidase e dos níveis plasmáticos da quemoquina CCL18/PARC em diferentes tempos de tratamento por TRE: tempo zero e nos tempos 3, 6, e 9 meses;
4. Medir a quemoquina CCL18/PARC em plasma de pacientes com Doença de Niemann-Pick, uma doença lisossômica com manifestações clínicas muito parecidas com a Doença de Gaucher.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aelson ASB, Arruda LF, Regitano-d'Arce MAB. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. *Quim. Nova*, 32: 849-854; 2009.
- Aerts JM, Hollak C, Boot R, Groener A. Biochemistry of glycosphingolipid storage disorders: implications for therapeutic intervention. *Trans. R. Soc. Lond. B.*; 358: 905-914; 2003.
- Aerts JM, Van Breemen MJ, Bussink AP, Ghauharali K, Sprenger R, Boot RG, Groener JE, Hollak CE, Maas M, Smit S, Hoefsloot HC, Smilde AK, Vissers JP, de Jong S, Speijer D, de Koster CG. Biomarkers for lysosomal storage disorders: identification and application as exemplified by chitotriosidase in Gaucher disease. *Acta Paediatr Suppl.*; 97: 7-14; 2008.
- Aguilera B, Ghauharali-van der Vlugt K, Helmond MT, Out JM, Donker-Koopman WE, Groener JE, Boot RG, Renkema GH, van der Marel GA, van Boom JH, Overkleeft HS, Aerts JM. Transglycosidase activity of chitotriosidase improved enzymatic assay for the human macrophage chitinase. *J Biol Chem.*, 278: 40911-40916; 2003.
- Allen MJ, Myer BJ, Khokher AM, Rushton N, Cox TM. Pro-inflammatory cytokines and the pathogenesis of Gaucher's disease: increased release of interleukin-6 and interleukin-10. *Q J Med.*; 90: 19-25; 1997.
- Allende ML, Proia RL. Lubricating cell signaling pathways with gangliosides. *Carbohydrates and glycoconjugates*; 587-592; 2002.
- Aghion H. La maladie de Gaucher dans l'enfance. Ph.D. Thesis. Paris, 1934.
- Ballabio A. Disease pathogenesis explained by basic science: lysosomal storage diseases as autophagocytic disorders. *Int J Clin Pharmacol Ther.*; 47: 34-38; 2009.

- Ballou LR, Lauderkind SJF, Rosloniec EF, Raghov R. Ceramide-signalling and the immune response. *Biochim Biophys Acta*; 1301: 273–287; 1996.
- Barton NW, Furbish FS, Murray GJ, Garfield M, Brady RO. Therapeutic response to intravenous infusions of glucocerebrosidase in patient with Gaucher disease. *Proc Nat Acad Sci USA.*; 87: 1913-1916; 1990.
- Basu A, Glew RH, Daniels LB, Clark LS. Activators of spleen glucocerebrosidase from controls and patients with various forms of Gaucher's disease. *J Biol Chem.*; 259: 1714-1714; 1984.
- Beutler E. Gaucher disease. *Arch Intern Med.*, 159: 881-882; 1999.
- Beutler E, Grabowski GA. 1995 Gaucher's disease. In *The metabolic basis of inherited disease* (ed. C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly & D. Vall), pp. 2641–2670. New York: McGraw-Hill.
- Beutler E, Grabowski GA. in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (Scriver, C. R., Sly, W. S., Childs, B., Beaudet, A. L., Valle, D, Kinzler, K. W., and Vogelstein, B., eds) 8th Ed., pp. 3635–3668, McGraw-Hill Inc., New York; 2001.
- Beutler E, Saven A. Missue of marrow examination in the diagnosis of Gaucher disease. *Blood.*; 76: 646-648; 1990.
- Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*; 37: 911-917; 1959.
- Boot RG, van Breemen MJ, Wegdam W, Sprenger RR, de Jong S, Speijer D, Hollak CE, van Dussen L, Hoefsloot HC, Smilde AK, de Koster CG, Vissers JP, Aerts JM. Gaucher disease: a model disorder for biomarker discovery. *Expert Rev Proteomics*; 6: 411-419; 2009.

- Boot RG, Verhoek M, de Fost M, Hollack CE, Maas M, Bleijleijlevens B, van Breemen MJ, van Meurs M, Boven LA, Laman JD, Moran MT, Cox TM, Aerts JM. Marked elevation of chemokine CCL18/PARC in Gaucher disease: a novel surrogate marker for assessing therapeutic intervention. *Blood.*; 103: 33-39; 2004.
- Boot RG, Renkema GH, Verhoek M, Strijland A, Blik J, de Meulemeester TM, Mannens MM, Aerts JM. The human chitotriosidase gene. Nature of inherited enzyme deficiency. *J Biol Chem.*; 273: 25680-25685; 1998.
- Bourteele S, Hausser A, Doppler H, Horn-Muller J, Ropke C, Schwarzmann G, Pfizenmaier K, Muller G. Tumor necrosis factor induces ceramide oscillations and negatively controls sphingolipid synthases by caspases in apoptotic Kym-1 cells. *J Biol Chem.*; 273: 31245-31251; 1998.
- Boven LA, Van Meurs M, Boot RG, Mehta A, Boon L, Aerts JM, Laman JD. Gaucher cells demonstrate a distinct macrophage phenotype and resemble alternatively activated macrophages. *Am. J. Clin. Pathol.*; 122, 359–369; 2004.
- Brade L, Vielhaber G, Heinz E, Brade H. In vitro characterization of anti-glucosylceramide rabbit antisera. *Glycobiology, Oxford.*; 10: 629-636; 2000.
- Brady RO, Kanfer JN, Bradley RM, Shapiro D. Demonstration of a deficiency of glucocerebroside-cleaving enzyme in Gaucher's disease. *Clin. Invest.*; 45, 1112–1115; 1966.
- Brady RO. Enzyme replacement therapy: conception, chaos and culmination. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*; 358, 915-919; 2003.
- Butters TD. New therapeutics for the treatment of glycosphingolipid lysosomal diseases. *Adv. Exp Med Biol.*; 535: 219-226; 2003.
- Chang KL, Hwu WL, Yeh HY, Lee NC, Chien YH. CCL18 as an alternative marker in Gaucher and Niemann-Pick disease with chitotriosidase deficiency. *Blood Cells Mol Dis.*; 15: 38-40; 2010.

- Charrow J, Andersson HC, Kaplan P, Kolodny EH, Mistry P, Pastores G, Rosenbloom BE, Scott CR, Wappner RS, Weinreb NJ, Zimran A. The Gaucher registry: demographics and disease characteristics of 1698 patients with Gaucher disease. *Arch Intern Med.*; 160: 2835-2843; 2000.
- Cheng M, Wang J. Gaucher disease: review of the literature. *Arch Pathol Lab Med.*, 132: 851-853; 2008.
- Chester MA. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) – nomenclature of glycolipids-recommendations. *Glycoconjugate J.*; 16: 1-6; 1999.
- Chien YH, Lee NC, Tsai FJ, Chao MC, Hwu WL. Reduction in imiglucerase dosage causes immediate rise of chitotriosidase activity in patients with Gaucher disease. *Mol Genet Metab.* 2010 *in press*.
- Christie WW. *Advances in Lipid Methodology – Two*, pp. 195-213; 1993. *Clin Biochem.*, 40: 365-369; 1993.
- Cowart LA, Hannun YA. Using genomic and lipidomic strategies to investigate sphingolipids functions in the yeast heat-stress response. *Biochem Soc Trans.*; 33: 1166-1169; 2005.
- Cox TM. Gaucher disease: understanding the molecular pathogenesis of sphingolipidoses. *J. Inherit. Metab. Dis.*; 24, 106–121; 2001.
- Cox TM, Schofield JP. Gaucher's disease: clinical features and natural history. *Baillieres Clin Haematol.*; 10: 657-689; 1997.
- Christie WW. Methods for lipid extraction. *Lipid Technology*, 5, 18-19, W.W. Christie 1993.
- Danks DM. Inborn errors of metabolism--a review of some general concepts. *Aust N Z J Med.*; 11: 309-320; 1981.

- Dawson G, Kruski AW, Scanu AM. Distribution of glycosphingolipids in the serum lipoproteins of normal human subjects and patients with hypo- and hyperlipidemias. *J. Lipid Res.*; 17: 125-131; 1976.
- Dawson G, OH JY. Blood glucosylceramide levels in Gaucher's disease and its distribution amongst lipoprotein fractions. *Clin. Chim. Acta., Amsterdam.*; 75: 149-153, 1977.
- Deegan PB, Moran MT, McFarlane I, Schofield JP, Boot RG, Aerts JM, Cox TM. Clinical evaluation of chemokine and enzymatic biomarkers of Gaucher disease. *Blood Cells Mol. Dis.*; 35: 259–267; 2005.
- Degroote S, Wolthoorn J, van Meer G. The cell biology of glycosphingolipids. *Semin Cell Dev Biol.*; 15: 375-387; 2004.
- Desnick RJ. Enzyme replacement and enhancement for lysosomal diseases. *J Inherit Metab Dis.*; 27: 385-410; 2004.
- Doering T, Holleran WM, Potratz A, Vielhaber G, Suzuki K, Elias PM, Sandhoff K. Sphingolipid activator proteins (SAPs) are required for epidermal permeability barrier formation. *J Biol Chem.*; 274: 11038:11045; 1999.
- Dvir H, Harel M, McCarthy AA, Toker L, Silman I, Futerman AH and Sussman JL. X-ray structure of human acid  $\beta$ -glucosidase, the defective enzyme in Gaucher disease. *EMBO*, 4: 704-709; 2003.
- Emre S, Gürakan F, Yüce A, Rolf A, Scott R, Ozen H. Molecular analysis of Turkish Gaucher disease patients: identification of novel mutations in glucocerebrosidase (GBA) gene. *Eur J Med Genet.*; 51: 315-321; 2008.
- Folch J, Lees M, Stanley GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.*; 226, 497-509 ;1957.

- Fost M, Aerts JM, Hollak CE. Gaucher disease: from fundamental research to effective therapeutic interventions. *Neth J. Med.*; 61: 3-8; 2003.
- Fost M, Hollak CE, Groener JE, Aerts JM, Maas M, Poll LW, Wiersma MG, Häussinger D, Brett S, Brill N, vom Dahl S. Superior effects of high-dose enzyme replacement therapy in type 1 Gaucher disease on bone marrow involvement and chitotriosidase levels: a 2-center retrospective analysis. *Blood*, 108: 830–835; 2006.
- Furukawa K. Glycosphingolipids in engineered mice: insights into function and generation of disease models. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 15; 2004.
- Futerman AH, Hannun YA. The complex life of sphingolipids. *EMBO Rep.*; 5: 777-782; 2004.
- Futerman HA, Sussman LJ, Horowitz M, Silman I, Ziram A. New directions in treatment of Gaucher disease. *Trends Pharmacol. Sci.*; 25 : 146-151; 2004.
- Futerman AH, Riezman H. The ins and outs of sphingolipids synthesis. *Trends Cell Biol.*; 15; 312-318; 2005.
- Futerman AH, van Meer G. The cell biology of lysosomal storage diseases. *Nature Rev Mol Cell Biol.*; 5: 554-565; 2004.
- Gerard C, Rollins BJ. Chemokines and disease. *Nat Immunol.*; 2: 108–115; 2001.
- Germain DP. La maladie de Gaucher: aspects cliniques, génétiques et thérapeutiques Gaucher disease: clinical, genetic and therapeutic aspects. *Pathologie Biologie*, 52: 343-350 ; 2004-a.
- Germain DP. Gaucher's disease: a paradigm for interventional genetics. *Clin Genet.* ; 65: 77-86 ; 2004-b.

- Ghauharali-Van Der Vlugt K, Langeveld M, Poppema A, Kuiper S, Hollak CE, Aerts JM, Groener JE. Prominent increase in plasma ganglioside GM3 is associated with clinical manifestations of type I Gaucher disease. *Clin. Chim. Acta.*, Amsterdam.; 389: 109-113; 2008.
- Giraldo P, Pocovi M, Perez-Calvo J, Rubio-Felix D, Giralto M. Report of the Spanish Gaucher' Disease Registry: Clinical and genetic characteristics. *Haematologica*, 10: 691-709; 2000.
- Glew RH, Basu A, Prenc M, Remaley AT. Lysosomal storage diseases: Biology of Disease. *Lab Invest.*, 53: 250-269; 1985.
- Goebeler M, Trautmann A, Voss A, Brocker EV, Toksoy A, Gillitzer R. Differential and sequential expression of multiple chemokines during elicitation of allergic contact hypersensitivity. *Am J Pathol.*; 158: 431-440; 2001.
- Gornati R, Berra B, Montorfano G, Martini C, Ciana G, Ferrari P, Romano M, Bembi B. Glycolipid analysis of different tissues and cerebrospinal fluid in type II Gaucher disease. *J Inherit Metab Dis.*; 25: 47-55; 2002.
- Gornal AG, Bardawill CJ, David MM. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, Maryland.; 177: 7 51-766, 1949.
- Grabowski GA, Horowitz M. Gaucher's disease: molecular, genetic and enzymological aspects. *Baillieres Clin Haematol.*; 10: 635-656; 1997.
- Grabowski GA. Gaucher disease: enzymology, genetics and treatment. *Adv Hum Genet.*; 377- 441; 1993.
- Grabowski GA. Genotype-phenotype correlations in Gaucher disease. *NIH Technology Assesment Conference on Gaucher disease: Current issues in diagbnosis and treatment*, 27(1); 1995.

- Grace ME, Newman KM, Scheinkert V, Berg-Fussmann A, Grabowski GA. Analysis of human acid b-glucosidase by site-directed mutagenesis and heterologous expression. *J Biol Chem.*; 296: 2283-2291; 1993.
- Groener JE, Poorthuis BJ, Kuiper S, Helmond MT, Hollak CE, Aerts JM. HPLC for simultaneous quantification of total ceramide, glucosylceramide, and ceramide trihexoside concentrations in plasma. *Clin Chem.*; 53: 742-747; 2007.
- Groener JE, Poorthuis BJ, Kuiper S, Hollak CE, Aerts JM. Plasma glucosylceramide and ceramide in type 1 Gaucher disease patients: Correlations with disease severity and response to therapeutic intervention. *Biochim. Biophys. Acta., Amsterdam.*; 1781: 72-78; 2008.
- Guo Y, He W, Boer AM, Wevers RA, de Bruijn AM, Groener JE, Hollak CE, Aerts JM, Galjaard H, van Diggelen. OP Elevated plasma chitotriosidase activity in various lysosomal storage disorders. *J Inherit Metab Dis.*; 18: 717-722; 1995.
- Hanada K, Kumagai K, Yasuda S, Miura Y, Kawano M, Fukasawa M, Nishijima M. Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature*, 426: 803-809; 2003.
- Hannun YA, Obeid, LM. The ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: Stress encounters of the lipid kind. *J Biol Chem.*; 277: 25847-25850; 2002.
- Hannun YA, Luberto C, Argraves KM. Enzymes of sphingolipid metabolism: from modular to integrative signaling. *Biochemistry*, 40: 4893-4903; 2001.
- Haycock JW. Polyvinylpyrrolidone as a blocking agent in immunochemical studies. *Anal. Biochem., Amsterdam*, 208: 397-399; 1993.
- Haskins M. Gene therapy for lysosomal storage diseases (LSDs) in large animal models. *ILAR J.*; 50: 112-121; 2009.

- Hollak CE, van Weely S, van Oers MH, Aerts JM. Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease. *J Clin Invest.*; 93: 1288-1292; 1994.
- Hollak CE, Evers L, Aerts JM, van Oers MH. Elevated levels of M-CSF, sCD14 and IL8 in type 1 Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis.*; 23: 201-212; 1997.
- Holthuis JC, Pomorski T, Riggers RJ, Sprong H, Van Meer G. The organizing potential of sphingolipids in intracellular membrane transport. *Physiol Rev.*; 81: 1689-1723; 2001.
- Huwiler A, Kolter T, Pfeilschifter J, Sandhoff K. Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling. *Biochim Biophys Acta*, 1485: 63-99; 2000.
- Ioannou YA, Enriquez A, Benjamin C. Gene therapy for lysosomal storage disorders. *Expert Opin Biol Ther.*; 3: 789-801; 2003.
- Iwamori M, Shimomura J, Tsuyuhara S, Nagai Y. Gangliosides of various rat tissues: distribution of ganglio-N-tetraose-containing gangliosides and tissue-characteristic composition of gangliosides. *J Biochem.*; 95: 761-770; 1984.
- Jmoudiak M, Futerman AH. Gaucher disease: pathological mechanisms and modern management. *Br J Haematol.*; 129: 178-188; 2005.
- Khanna R, Benjamin ER, Pellegrino L, Schilling A, Rigat BA, Soska R, Nafar H, Ranes BE, Feng J, Lun Y, Powe AC, Palling DJ, Wustman BA, Schiffmann R, Mahuran DJ, Lockhart DJ, Valenzano KJ. The pharmacological chaperone isofagomine increases the activity of the Gaucher disease L444P mutant form of beta-glucosidase. *FEBS J.*; 277: 1618-1638; 2010.
- Kitatani K, Sheldon K, Rajagopalan V, Anelli V, Jenkins RW, Sun Y, Grabowski GA, Obeid LM, Hannun YA. Involvement of acid beta-glucosidase 1 in the salvage pathway of ceramide formation. *J Biol Chem.*; 284: 12972-12978; 2009.

- Kolesnick, R. The therapeutic potential of modulating the ceramide / sphingomyelin pathway. *J Clin Invest.*; 110: 3-8; 2002.
- Kolter T, Sandhoff K. 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; 2005.
- Kolter T, Sandhoff K. Sphingolipid metabolism diseases. *Biochim Biophys Acta.*; 1758: 2057-2079; 2006.
- Kornhaber GJ, Tropak MB, Maegawa GH, Tuske SJ, Coales SJ, Mahuran DJ, Hamuro Y. Isofagomine induced stabilization of glucocerebrosidase. *Chembiochem*, 9: 2643-2649; 2008.
- Kornfeld R. Trafficking of lysosomal enzymes. *FASEB J.*; 1: 462-468; 1987.
- Korolenko TA, Zhanaeva SY, Falameeva OV, Kaledin VI, Filyushina EE, Buzueva II, Paul GA. Chitotriosidase as a marker of macrophage stimulation. *Bull Exp Biol Med.*; 130: 948-950; 2000.
- Kzhyshkowska J, Gratchev A, Goerdts S. Human chitinases and chitinase-like proteins as indicators for inflammation and cancer. *Biomark Insights.*; 3: 128-146; 2007.
- Labadaridis I, Dimitriou E, Theodorakis M, Kafalidis G, Velegraki A, Michelakakis H. Chitotriosidase in neonates with fungal and bacterial infections. *Arch Dis Child, Fetal Neonatal*, 90: 531–532; 2005.
- Lachmann RH, Platt MF. Substrate reduction therapy for glycosphingolipid storage disorders. *Expert Opin Investg Drugs*, 10: 455-466; 2001.
- Lahiri S, Futerman AH. The metabolism and function of sphingolipids and glycosphingolipids. *Cell Mol Life Sci.*; 64: 2270-2284; 2007.

- Lannert H, Bunning C, Jeckel D, Wieland FT. Lactosylceramide is synthesized in the lumen of the Golgi apparatus. *FEBS Lett.*; 342: 91-96; 1994.
- Lee CG. Chitin, chitinases and chitinase-like proteins in allergic inflammation and tissue remodeling. *Yonsei Med J.*; 28; 50: 22-30; 2009.
- Lepage, M. The separation and identification of plant phospholipids and glycolipids by two-dimensional thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography*, 13: 99-103; 1964.
- Loetscher P, Moser B, Baggiolini M. Chemokines and their receptors in lymphocyte traffic and HIV infection. *Adv Immunol.*; 74: 127–180; 2000.
- Li Y-T, Li S-C. Enzymatic hydrolysis of glycosphingolipids. *Analytical Biochemistry*, 273: 1-11; 1999
- Maaswinkel-Mooij P, Hollak C, van Eysden-Plaisier M, Prins M, Aerts H, Poll R. The natural course of Gaucher disease in The Netherlands: implications for monitoring of disease manifestations. *J Inherit Metab Dis.*; 23: 77-82; 2000.
- Maire I, Guffon N, Froissart R. Current development and usefulness of biomarkers for Gaucher disease follow up. *Rev Med Interne.*; 2: 187-192; 2007.
- Martins AM. Inborn errors of metabolism: a clinical overview. *Sao Paulo Med J/Rev Paul Med.*; 117: 251-265; 1999.
- Masserini M, Ravasi D. Role of sphingolipids in the biogenesis of membrane domains. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1532: 149-161; 2001.
- McEachern KA, Fung J, Komarnitsky S, Siegel CS, Chuang WL, Hutto E, Shayman JA, Grabowski GA, Aerts JM, Cheng SH, Copeland DP, Marshall J. A specific and potent inhibitor of glucosylceramide synthase for substrate inhibition therapy of Gaucher disease. *Mol Genet Metab.*; 91: 259-267; 2007.

- Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA*, 281: 249-254; 1999.
- Meikle PJ, Whitfield PD, Rozaklis T, Blacklock D, Duplock S, Elstein D, Zimran A, Mengel E, Cannell P, Hopwood JJ, Fuller M. Plasma lipids are altered in Gaucher disease: biochemical markers to evaluate therapeutic intervention. *Blood Cells Mol Dis.*; 40 :420-427; 2008.
- Michelin K, Wajner A, Bock H, Fachel A, Rosenberg R, Pires RF, Pereira ML, Giugliani R, Coelho JC. Biochemical properties of beta-glucosidase in leukocytes from patients and obligated heterozygotes for Gaucher disease carriers. *Clin Chim Acta.*; 362: 101-109; 2005.
- Michelin K, Wajner A, Goulart LS, Fachel AA, Pereira MLS, Mello AS, Souza FTS, Pires RF, Giugliani R, Coelho JC. Biochemical study on  $\beta$ -glucosidase in individuals with Gaucher's disease and normal subjects. *Clin Chim Acta.*, 343: 145-153; 2004.
- Mistry PK, Wraight EP, Cox TM. Therapeutic delivery of proteins to macrophages: implications for treatment of Gaucher's disease. *Lancet.*; 348: 1555-1559; 1996.
- Morrison I.M. Glycolipids. In: Chaplin MF, Kennedy, JF (Eds.) *Carbohydrate analysis: a practical approach*. Oxford: IRL, p.205-221. 1986.
- Moran MT, Schofield JP, Hayman AR, Shi GP, Young E, Cox TM. Pathologic gene expression in Gaucher disease: up-regulation of cysteine proteinases including osteoclastic cathepsin K. *Blood*, 96, 1969–1978; 2000.
- Moyses, C. Substrate reduction therapy: clinical evaluation in type 1 Gaucher disease. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*; 358, 955-960; 2003.

- Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, et al. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev.* 2000;52(1):145-76.
- Muzzarelli RA. Chitins and chitosans as immunoadjuvants and non-allergenic drug carriers. *Mar Drugs.*; 21: 292-312; 2010.
- Nadimpalli SK, Amancha PK. Evolution of Mannose 6-Phosphate Receptors (MPR300 and 46): Lysosomal Enzyme Sorting Proteins. *Curr Protein Pept Sci.*; 1: 68-90; 2010.
- Neufeld EF. Lysosomal storage disorders. *A Rev. Biochem.*; 60: 257-280; 1991.
- Niederau C, Birkhahn A, Ehlen C, Dieter H. Facts and fiction of modern diagnosis of type 1 Gaucher disease: the german experience in 1996. *Gaucher Clin Perspect.*; 4: 1-12; 1996.
- Ohanian J, Ohanian V. Sphingolipids in mammalian cell signalling. *Cell Mol Life Sci.*; 58: 2053-2068; 2001.
- Ozkara HA. Recent advances in the biochemistry and genetics of sphingolipidoses. *Brain Dev.*; 26: 497-505; 2004.
- Portaria SAS/MS nº 449, de 08 de julho de 2002 - Equipe Técnica: Paulo D. Picon e Karine Medeiros Amaral; Consultora no Brasil: Patrícia Ashton Prolla; Consultores Internacionais: Ernest Beutler, MD, PhD e Ari Zimran, MD; Editores: Paulo Dornelles Picon e Alberto Beltrame; 2002.
- Parenti G. Treating lysosomal storage diseases with pharmacological chaperones: from concept to clinics. *EMBO Mol Med.*; 1: 268-279; 2009.
- Pastores GM, Barnett NL. Current and emerging therapies for the lysosomal storage disorders. *Expert Opin. Emerg. Drugs*, 10: 891–902; 2005.

- Pastores GM, Barnett NL, Kolodny EH. An open-label, noncomparative study of miglustat in type I Gaucher disease: efficacy and tolerability over 24 months of treatment. *Clin. Ther.*; 27: 1215–1227; 2005.
- Patrick AD. A deficiency of glucocerebrosidase in Gaucher's disease. *Biochem. J.*; 97, 17c–18c; 1965.
- Peters SP, Coyle P, Glew RH. Differentiation of beta-glucocerebrosidase from beta-glucosidase in human tissues using sodium taurocholate. *Arch Biochem Biophys.*; 175: 569-571; 1976.
- Pires R, Sobreira EAP. Enfermedad de Gaucher tipo 1: Características clínicas em Brasil. In: Giraldo P, Giralt M, Pérez Calvo JL and Pocoví M. *Enfermedad de Gaucher. 2ª Edición.*; 247-254; 2004.
- Platt FM, Butters TD. Substrate deprivation: a new therapeutic approach for the glycosphingolipid lysosomal storage diseases. *Expert Rev Mol Med.*; 1:1-17; 2000.
- Platt MF. Substrate reduction therapy in mouse models of the glycosphingolipidoses. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*; 358, 947-954; 2003.
- Pollitt RS, Green A, McCabe CJ, Booth A, Coopler NJ, Leonard JV, Nicholl J, Nicholson P, Tunaley JR, Virdi NK. Neonatal screening for inborn errors of metabolism. *Hearth Technol Assess*, 1997; 1(7): 1-202. Online Copyright © - World Wide Web URL: <http://www.hta.nhsweb.nhs.uk>.
- Reape TJ, Wilson VJ, Kanczler JM, Ward JP, Burnand KG, Thomas CR. Detection and cellular localization of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor mRNA and protein in human atherosclerotic tissue. *J Mol Cell Cardiol.*; 29:1639-1648; 1997.
- Robinson DB, Glew RH. Acid phosphatase in Gaucher's disease. *Clin Chem.*; 26: 371-382; 1980.

- Rodrigues MR, Sá Miranda MC, Amaral O. Allelic frequency determination of the 24-bp chitotriosidase duplication in the Portuguese population by real-time PCR. *Blood Cells Mol Dis.*; 33: 362-364; 2004.
- Sandhoff K, Kolter T. Biosynthesis and degradation of mammalian glycosphingolipids. *Phil Trans R Soc Lond B.*; 358: 847-861; 2003.
- Sawkar AR, D'Haese W, Kelly JW. Therapeutic strategies to ameliorate lysosomal storage disorders- focus on Gaucher disease. *Cel. Mol. Life. Science*, 63: 1179-1192; 2006.
- Saudubray JM, Charpentier C. Clinical phenotypes: Diagnosis/Algorithms. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly W, Valle D. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 7th edition. McGraw-Hill; 1995.
- Schiffmann R, Fitzgibbon EJ, Harris C, DeVile C, Davies EH, Abel L, van Schaik IN, Benko W, Timmons M, Ries M, Vellodi A. Randomized, controlled trial of miglustat in Gaucher's disease type 3. *Ann Neurol.*; 64: 514-522; 2008.
- Schnaar RL. Isolation of glycosphingolipids. *Methods Enzymol.*; 230: 348–370; 1994.
- Schueler UH, Kolter T, Kaneski CR, Zirzow GC, Sandhoff K, Brady RO. Correlation between enzyme activity and substrate storage in a cell culture model system for Gaucher disease. *J Inherit Metab Dis.*; 27: 649-658; 2004.
- Schwarzmann, G. Uptake and metabolism of exogenous glycosphingolipids by cultured cells. *Cell & Developmental Biology.*; 12: 163-171; 2001.
- Seashore MR, Rinaldo P. Metabolic disease of neonate and young infant. *Semin. Perinatol.*; 17 (5): 318-329; 1993.

- Shaner RL, Allegood JC, Park H, Wang E, Kelly S, Haynes CA, Sullards MC, Merrill AH Jr. Quantitative analysis of sphingolipids for lipidomics using triple quadrupole and quadrupole linear ion trap mass spectrometers. *J Lipid Res.*; 50:1692-1707; 2009.
- Sillence D, Platt FM. Glycosphingolipids and endocytic sorting. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 15; 2004.
- Smith WL, Merrill AH Jr. Sphingolipid metabolism and signaling minireview series. *J Biol Chem.*; 277: 25841-25842; 2002.
- Skoog WA, Beck WS. Studies on the fibrinogen, dextran and phytohemagglutinin methods of isolating leukocytes. *Blood*, 11: 436-454; 1956.
- Tani-ichi S, Maruyama K, Kondo N, Nagafuku M, Kabayama K, Inokuchi J, Shimada Y, Ohno-Iwashita Y, Yagita H, Kawano S, Kosugi A. Structure and function of lipid rafts in human activated T cells. *International Immunology*, 17: 749-758; 2005.
- Tropak MB, Kornhaber GJ, Rigat BA, Maegawa GH, Buttner JD, Blanchard JE, Murphy C, Tuske SJ, Coales SJ, Hamuro Y, Brown ED, Mahuran DJ. Identification of pharmacological chaperones for Gaucher disease and characterization of their effects on beta-glucocerebrosidase by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Chembiochem.*; 9: 2650-2662; 2008.
- Ullman M.D, McCluer RH. Quantitative analysis of plasma neutral glycosphingolipids by high performance liquid chromatography of their perbenzoyl derivatives. *Journal of Lipid Research.*; 18: 371-378; 1977.

- Van Breemen MJ, Bleijlevens B, de Koster CG, Aerts JM. Limitations in quantitation of the biomarker CCL18 in Gaucher disease blood samples by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta*. Oct.; 1764: 1626-1632; 2006.
- Van Den Bergh FAJTM, Tager JM. Localization of neutral glycosphingolipids in human plasma. *Biochim. Biophys. Acta.*, 441: 391-402; 1976.
- Van Eijk M, van Roomen CP, Renkema GH, Bussink AP, Andrews L, Blommaart EF, Sugar A, Verhoeven AJ, Boot RG, Aerts JM. Characterization of human phagocyte-derived chitotriosidase, a component of innate immunity. *Int Immunol.*; 17:1505-1512; 2005.
- Vance DE, Sweeley CC. Quantitative determination of the neutral glycosyl ceramides in human blood. *J Lipid Res.*, 8: 621-630; 1967.
- Vunnam RR, Radin NS. Analogs of ceramide that inhibit glucocerebrosidase synthetase in mouse brain. *Chem Phys Lipids*, 26: 265-278; 1980.
- Waber, L. Inborn Errors of Metabolism. *Ped. Ann.*; 19: 105-117; 1990.
- Wajner A, Michelin K, Burin MG, Pires RF, Pereira ML, Giugliani R, Coelho JC. Comparison between the biochemical properties of plasma chitotriosidase from normal individuals and from patients with Gaucher disease, GM1-gangliosidosis, Krabbe disease and heterozygotes for Gaucher disease. *Clin Biochem.*; 40: 365-369; 2007.
- Walkley SU, Vanier MT. Secondary lipid accumulation in lysosomal disease. *Biochim Biophys Acta.*; 1793: 726-736; 2009.
- Wappner, RS *Biochemical Diagnosis of Genetic Diseases*. *Ped. Ann.*; 22: 282-297; 1993.
- Watts RWE. A historical perspective of the glycosphingolipids and sphingolipidoses. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*; 358, 975-983; 2003.

- Weinreb NJ, Barranger JA, Charrow J, Grabowski GA, Mankin HJ, Mistry P. Guidance on the use of miglustat for treating patients with type 1 Gaucher disease. *Am J Hematol.*; 80 :223-229; 2005.
- Wennekes T, van den Berg RJ, Boot RG, van der Marel GA, Overkleeft HS, Aerts JM. Glycosphingolipids--nature, function, and pharmacological modulation. *Angew Chem Int Ed Engl.*; 48: 8848-8869; 2009.
- Whitfield PD, Nelson P, Sharp PC, Bindloss CA, Dean C, Ravenscroft EM, Fong BA, Fietz MJ, Hopwood JJ, Meikle PJ. Correlation among genotype, phenotype, and biochemical markers in Gaucher disease: Implications for the prediction of disease severity. *Mol Genet Metab.*; 75: 46-55; 2002.
- Wilcox WR. Inborn errors of metabolism. Online Copyright (c) 1995 – World Wide Web URL: <http://www.neonatology.org/syllabus/iem.html>.
- Williams MA, McCluer RH. The use of Sep-Pak C18 cartridges during the isolation of gangliosides. *J Neurochem.*; 35 :266-269; 1980.
- Xu YH, Barnes S, Sun Y, Grabowski GA. Multi-system disorders of glycosphingolipid and ganglioside metabolism. *J Lipid Res.* 2010. Downloaded from [www.jlr.org](http://www.jlr.org)
- Yamashita T, Wada R, sasaki T, Deng C, Bierfreund U, Sandhoff K. A vital role for glycosphingolipid synthesis during development and differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA.*; 96: 9142-9147; 1999.
- Zimran A, Gelbart T, Westwood B, Grabowski GA, Beutler E. High frequency of the Gaucher disease mutation at nucleotide 1226 among Ashkenazi Jews. *Am J Hum Genet.* ;49: 855-859; 1991.
- Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*, 12: 121–127; 2000.

## 8. LISTA DE TABELAS E FIGURAS

### Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Dados densitométricos da quantificação de glicosilceramida em plasma de pacientes com DG sem e com tratamento por TRE, comparada com indivíduos normais.....	<b>54</b>
---	-----------

### Figuras

<b>Figura 1.</b> Estrutura dos esfingolípídios mais comuns.....	<b>10</b>
<b>Figura 2.</b> Topologia intracelular da biosíntese e fluxo dos GSLs.....	<b>12</b>
<b>Figura 3.</b> Biosíntese de glicosfingolípídeo (GSLs) em humanos.....	<b>14</b>
<b>Figura 4.</b> Degradação de glicosfingolípídeos (GSLs) nos lisossomos humanos: enzimas envolvidas e enzimas relacionadas às doenças de depósito.....	<b>15</b>
<b>Figura 5.</b> Clivagem da glicosilceramida.....	<b>18</b>
<b>Figura 6.</b> Fluxograma da metodologia utilizada.....	<b>36</b>

<b>Figura 7.</b> Atividade da $\beta$ -glicosidase em leucócitos de pacientes com Doença de Gaucher e indivíduos normais.....	<b>43</b>
<b>Figura 8.</b> Atividade da quitotriosidase em plasma de pacientes com Doença de Gaucher sem tratamento.....	<b>45</b>
<b>Figura 9.</b> Análise por cromatografia em camada delgada de alta resolução (HPTLC) das frações obtidas durante a extração e purificação de glicosilceramida de extrato lipídico de plasma de paciente com Gaucher.....	<b>47</b>
<b>Figura 10.</b> Análise por cromatografia em camada delgada de alta resolução (HPTLC) dos resíduos dos eluatos da coluna SepPak <sup>®</sup> obtidos pelo processamento de plasma de paciente com DG sem TRE e de controle.....	<b>48</b>
<b>Figura 11.</b> Fluxograma resumido da extração e purificação de glicosilceramida de plasma de indivíduo normal com e sem adição de 12 $\mu$ g do padrão glicosilceramida.....	<b>49</b>
<b>Figura 12.</b> Análise por HPTLC dos resíduos obtidos durante a extração e purificação de glicosilceramida de plasma de indivíduo normal com e sem adição de 12 $\mu$ g de GliCer.....	<b>51</b>
<b>Figura 13.</b> Curva Padrão de GliCer.....	<b>51</b>

**Figura 14.** Análise por HPTLC dos extratos lipídicos purificados obtidos de plasmas de pacientes com DG sem e com tratamento por TRE, e indivíduos normais.....**53**

**Figura 15.** Medida da CCL18/PARC (ng/mL) em plasma de pacientes com Doença de Gaucher sem tratamento, pacientes com Doença de Gaucher em tratamento por TRE e indivíduos normais.....**55**

## 9. ANEXOS



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE**  
**Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação**  
**COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE**

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB0000921) analisaram o projeto:

**Projeto:** 05-103

**Versão do Projeto:** 13/06/2005

**Versão do TCLE:** 22/06/2005

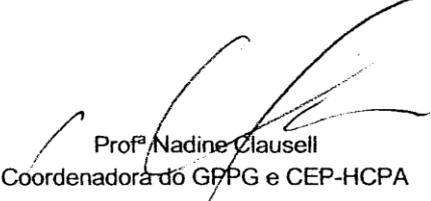
**Pesquisadores:**

JANICE CARNEIRO COELHO  
MARIA VIVIANE GOMES MÜLLER  
RICARDO FLORES PIRES  
KRISTIANE MICHELIM  
ALESSANDRO WAJNER  
MARIA LUIZA SARAIVA PEREIRA  
ROBERTO GIUGLIANI  
FERNANDA TIMM SEABRA SOUZA  
BELISA GOMES MULLER

**Título:** COMPARAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLICOCEREBROSÍDEO E DA QUEMOQUINA CCL18/PARC EM PACIENTES E HETEROZIGOTOS PARA DOENÇA DE GAUCHER E INDIVÍDUOS NORMAIS

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, inclusive quanto ao seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente ao CEP/HCPA. Somente poderão ser utilizados os Termos de Consentimento onde conste a aprovação do GPPG/HCPA.

Porto Alegre, 22 de junho de 2005.

  
Prof. Nadine Clausell  
Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA

## Anexo 2

### TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Título da Pesquisa:

“Comparação entre níveis de glicocerebrosideo e de quemoquina CCL18/PARC em pacientes e heterozigotos para a Doença de Gaucher e indivíduos normais“.

Responsáveis: Maria Viviane Gomes Müller e Janice Carneiro Coelho

O objetivo geral deste projeto de pesquisa é o de:

Extrair, purificar e quantificar a glicosilceramida de amostras de plasma de pacientes com doença de Gaucher com e sem tratamento por reposição enzimática (TRE) e de plasma de indivíduos normais e após comparar o conteúdo de glicosilceramida de pacientes com Doença de Gaucher sob tratamento por TRE com aqueles sem TRE e indivíduos normais de modo a verificar-se se este é um bom parâmetro na separação entre estes grupos de indivíduos.

O material a ser coletado consistirá de uma amostra de 10 mL de sangue, de indivíduos com Doença de Gaucher com e sem tratamento por terapia de reposição enzimática (TRE) e indivíduos normais. Desse material serão separados os leucócitos, para avaliação da atividade da enzima  $\beta$ -glucosidase, e o plasma para realizar as demais pesquisas, que consistirão na identificação de glicosilceramida, avaliação da atividade da quitotriosidase e dosagem da proteína CCL18/PARC.

O material coletado será identificado somente com as letras iniciais dos integrantes, garantindo, desta forma, o sigilo em sua identificação. O material será utilizado exclusivamente para fins do projeto de pesquisa, sendo assegurado ao paciente ou a seus familiares acesso necessário aos resultados alcançados.

Pelo presente termo de consentimento, declaro que fui informado, de maneira clara e detalhada, acerca do Projeto de Pesquisa. Os pesquisadores responsáveis pelo trabalho são a bióloga Maria Viviane Gomes Müller e a professora Janice Carneiro Coelho (tel 51 – 21018309). Igualmente fui informado da garantia de receber respostas ou esclarecimentos sobre a pesquisa a ser realizada, da liberdade de não participar do estudo e, ainda, da segurança, do sigilo e do caráter confidencial das informações.

Data:

Nome do responsável legal:

Pesquisador responsável:

**Janice Carneiro Coelho**

---

**De:** Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences [bjps@usp.br]

**Enviado em:** segunda-feira, 10 de maio de 2010 13:33

**Para:** janice.coelho@ufrgs.br

**Assunto:** Publicação BJPS - 2010

**Prioridade:** Alta

Prezado autor,

Informamos que o artigo: "**Quantification of glucosylceramide in plasma of Gaucher disease patients**" e será incluído em um dos próximos fascículos a serem editados.

Tão logo dispusermos da prova diagramada, enviaremos para revisão final.

Estamos satisfeitos com a publicação do artigo e esperamos por novas contribuições.

Meus cumprimentos.

Leila R. de Carvalho Aranha

Editora Executiva

Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences

## **Anexo 4**

### **Quantification of Glucosylceramide in Plasma of Gaucher Disease Patients**

**Maria Viviane Gomes Muller<sup>1,3</sup>, André Petry<sup>2</sup>, Luciene Pinheiro Vianna<sup>1</sup>, Ana Carolina Breier<sup>1</sup>, Kristiane Michelin-Tirelli<sup>4</sup>, Ricardo Flores Pires<sup>5</sup>, Vera Maria Treis Trindade<sup>1,2</sup>, Janice Carneiro Coelho<sup>1,2\*</sup>**

*<sup>1</sup> Postgraduate Program of Biological Sciences: Biochemistry, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre; <sup>2</sup> Biochemistry Department, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre; <sup>3</sup> Pharmacy and Biology Department, University of Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul; <sup>4</sup> Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre; <sup>5</sup> Medicine Course, Luteran University of Brazil; RS, Brazil*

#### **\*Correspondence:**

J. C. Coelho

Departamento de Bioquímica - ICBS

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rua Ramiro Barcelos, 2600 - anexo

90035-003 - Porto Alegre – RS, Brazil

Tel.: +55 51 33085546

Fax: +55 51 33085535

E-mail: janice.coelho@ufrgs.br

Gaucher disease is a sphingolipidose that leads to an accumulation of glucosylceramide. The objective of this study was to develop a methodology based on the extraction, purification and quantification of glucosylceramide from blood plasma which could be used in clinical research laboratories. It was also proposed the comparison of the glucosylceramide content in plasma from Gaucher disease patients submitted or not to enzyme replacement therapy with that from normal individuals. The glucosylceramide,

separated from other glycosphingolipids by high performance thin layer chromatography (HPTLC) was chemically developed ( $\text{CuSO}_4 / \text{H}_3\text{PO}_4$ ) and the respective band confirmed by immunostaining (human anti-glucosylceramide antibody / peroxidase-conjugated secondary antibody). The chromatogram quantification by densitometry demonstrated that the glucosylceramide content in Gaucher disease patients was seventeen times higher than that in normal individuals, and seven times higher than that in patients on enzyme replacement therapy. The results obtained indicate that the methodology established can be used in complementary diagnosis and in the treatment monitoring of Gaucher disease patients.

**Uniterms:** Glucosylceramide. Blood plasma analysis. Gaucher Disease.

A doença de Gaucher é uma esfingolipidose caracterizada pelo acúmulo de glicosilceramida. O objetivo deste estudo foi desenvolver uma metodologia baseada na extração, purificação e quantificação da glicosilceramida plasmática a qual possa ser usada em laboratórios de pesquisa clínica. Após o desenvolvimento desta metodologia, foi proposto, também, comparar o conteúdo de glicosilceramida presente no plasma de pacientes com doença de Gaucher submetidos ou não a tratamento com aquele de indivíduos normais. A glicosilceramida, separada de outros glicoesfingolipídios por cromatografia de camada delgada de alta performance (HPTLC), foi revelada quimicamente ( $\text{CuSO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ ) e a respectiva banda foi confirmada por imunorevelação (anticorpo anti-glicosilceramida humana/anticorpo secundário conjugado à peroxidase). A quantificação do cromatograma por densitometria demonstrou que o conteúdo de glicosilceramida nos pacientes com doença de Gaucher era 17 vezes maior que aquele de indivíduos normais e 7 vezes maior que aquele dos pacientes com doença de Gaucher submetidos a tratamento com terapia de reposição enzimática. Os resultados obtidos demonstram que a metodologia estabelecida pode ser usada como

diagnóstico complementar e como monitoração do tratamento de pacientes com doença de Gaucher.

**Unitermos:** Glicosilceramida. Análise plasmática. Doença de Gaucher.

## INTRODUCTION

Gaucher Disease (GD) is a sphingolipidosis caused by a disorder in the metabolism of glycosphingolipids due to a recessive autosomal mutation in the gene of the acid beta-glucosidase ( $\beta$ -glu) enzyme. This defect results in the progressive storage of glucosylceramide (GluCer) in the cells of the mononuclear phagocyte system, which are then called Gaucher cells (Beutler and Grabowski 2001; de Fost *et al* 2003; Futerman *et al* 2004; Moyses 2003). Three different phenotypes are recognized based on the presence (types 2 and 3) or absence (type 1) of neurological involvement. Gaucher Disease Type 1, defined as non-neuropathic, is the most common, occurring in about 99% of diagnosed cases (Aerts *et al* 2003; Jakóbkiewicz-Banecka *et al* 2007).

Treatment of GD is based on enzyme replacement therapy (ERT) and, more recently, on substrate reduction therapy (SRT) (Aerts *et al* 2003; Brady 2003; Jakóbkiewicz-Banecka *et al* 2007). In ERT the recombinant enzyme imiglucerase replaces the defective enzyme and splits the accumulated glucocerebroside, while in SRT a small molecule, miglustat (N-butyldeoxynojirimycin), inhibits the synthesis of substrates accumulated in GD. This guarantees that the residual activity of the mutant enzyme is sufficient to avoid the formation of pathological storage (Germain 2004; Hollak *et al* 1994; Zimran and Elstein 2003).

The methods used to confirm the diagnosis of GD are (i) determination of the  $\beta$ -glu activity and (ii) molecular characterization (Beutler and Grabowski 2001; de Fost *et al* 2003; Guo *et al* 1995; Wajner *et al* 2007). Although chitotriosidase (CT) is often used as a biomarker

in GD, mainly in treatment monitoring, Moyses (2003) and Aerts *et al* (2003) state that elevated enzyme activity is not a condition specific to this pathology. It has been demonstrated that a mutation in the CT gene, consisting of a duplication of 24 base pairs in exon 10, causes a deficiency of CT activity in 6% of the world's population, which invalidates its use as a specific biomarker (Guo *et al* 1995; Hollak *et al* 1994). In this scenario, it is clear that other biomarkers are necessary.

The quantification of glucosylceramide (GluCer) accumulated in GD is a strong candidate as a biomarker for this pathology (Gornati *et al* 1998). However, it is not widely used in practical biochemistry because of the difficulties in the quantification methods. According to Groener *et al* (2007), the quantification of GluCer by mass spectrometry is very laborious and costly, and requires sophisticated equipment and specialized operators. These same authors suggest that GluCer could be quantified by HPLC (High performance liquid chromatography), but this technique also requires sophisticated and costly equipment, which is not always available in clinical analyses laboratories.

In this study, we proposed a methodology for GluCer evaluation that can be carried out in clinical laboratories. It is based on the extraction and purification of this glycosphingolipid from blood plasma, with the subsequent quantification by densitometry of the GluCer band separated by HPTLC. We also compared the GluCer content from plasma of GD patients submitted or not to ERT with that of normal individuals.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Samples**

Peripheral venal blood (5 mL) was collected from 15 individuals using heparinized syringes. Blood plasma was separated by centrifugation at 600 x g for 10 minutes and stored at

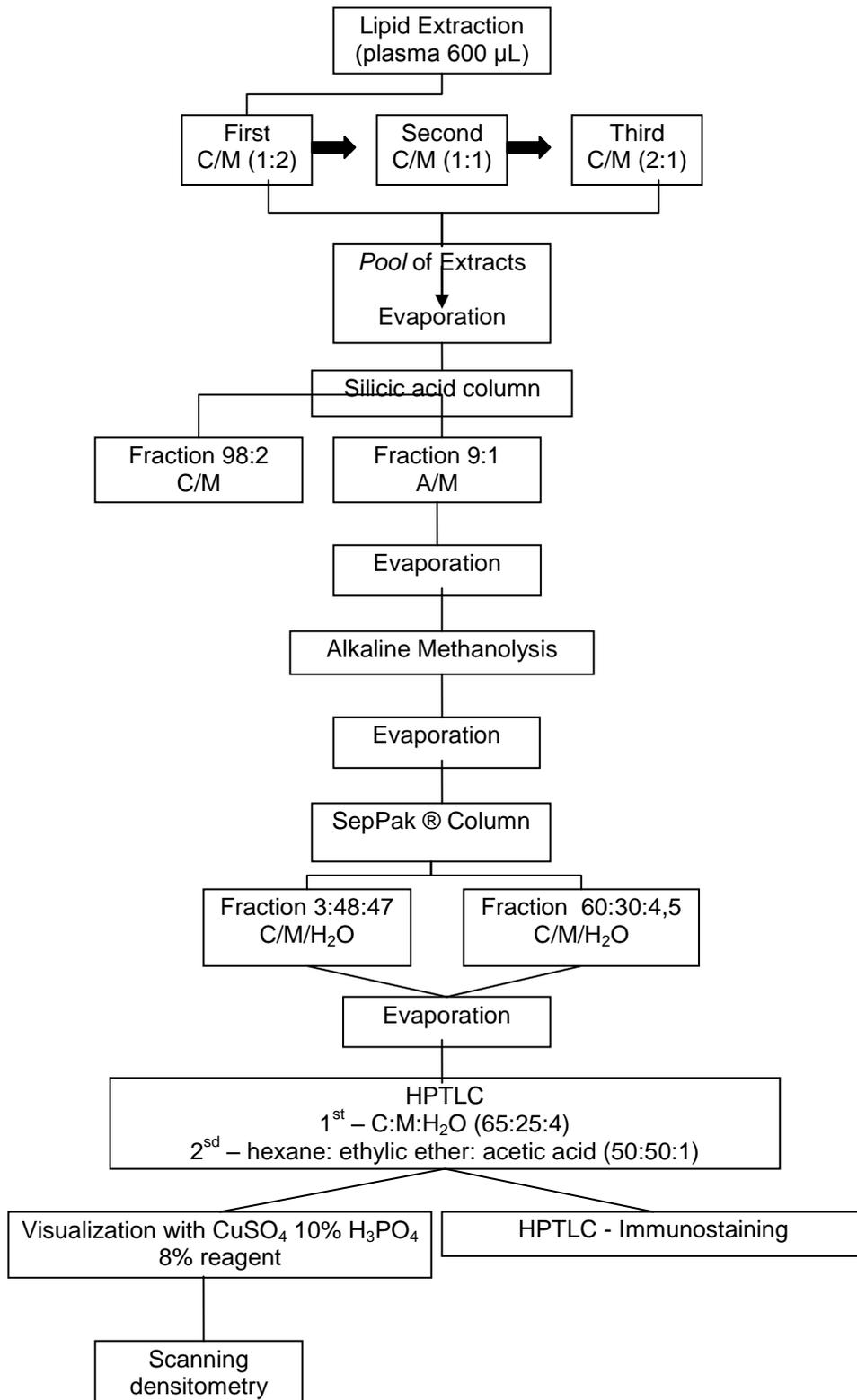
-40° C until required. The samples of normal individuals (n = 5) came from a blood bank supplied by voluntary donors, while the samples of individuals with GD (n = 10) were collected from patients diagnosed in the Genetic Medical Service of the Hospital de Clinicas de Porto Alegre (HCPA), Rio Grande do Sul, Brazil according to  $\beta$ -glucosidase activity.  $\beta$ -glucosidase activity in all GD patients was between 0 and 5 nmol/h/mg of protein (normal values are between 10 and 45 nmol/h/mg of protein). The study was conducted in conformity with the Helsinki Declaration of the World Medical Association and was approved by the Committee of Ethics of HCPA. All the participating individuals signed an informed consent.

## **Methods**

Figure 1 shows a flow-chart of the methodology used in this study. This methodology will be described in details below.

### **Total Lipid Extraction**

Total lipids were extracted according to Doering *et al* (1999) with the modifications required to use plasma samples. Plasma (600  $\mu$ L) of each individual was sequentially treated with chlorophorm: methanol (C:M) mixtures in the proportions of 1:2 (1800  $\mu$ L), 1:1 (1200  $\mu$ L) and 2:1 (1800  $\mu$ L), at 37°C, for 2 hours under constant shaking. These three extracts were mixed and solvent mixtures evaporated. The dry residue obtained was named total lipid extract.



**FIGURE 1** – Flow-chart of the methodology utilized. The details are described in the text.

## **Purification and Isolation of the GluCer**

Silicic acid column (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA): the total lipid extract residue was suspended in 1 mL of chloroform (C) / methanol (M) (98:2) mixture and submitted to a silicic acid (500mg) column according to Ullman and McCluer (1977). The C/M (98:2) eluate (apolar fraction) (2000  $\mu$ L) was discarded. The acetone (A) / methanol (M) (9:1) eluate (polar fraction) (2000  $\mu$ L) was evaporated and the dry residue was submitted to gentle alkaline methanolysis.

Alkaline methanolysis: The dry residue of the A/M (9:1) fraction obtained from silicic acid column was suspended in 1 mL of a 0.6 N NaOH methanolic solution and incubated during 90 minutes at 37°C, as described by Ullman and Mc Cluer (1977). This procedure hydrolyzes phosphoglycerolipids, but not glycosphingolipids.

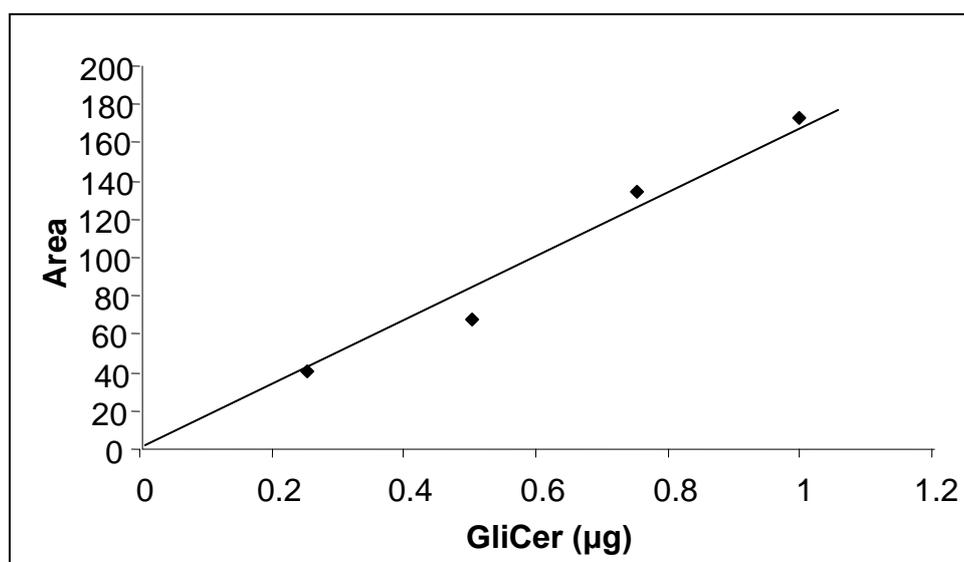
Sep-pack® with C18 cartridges column (Waters, Milford, MA, USA): The material obtained by alkaline methanolysis was evaporated under flowing of nitrogen gas. The residue was suspended in C:M (1:1) (1000  $\mu$ L) and submitted to the Sep-Pack® column (65 mg) to eliminated salts and low molecular mass compounds and purify glycosphingolipids (Williams and McCluer, 1980). Two eluates of C/M/water (3:48:47) (3000  $\mu$  L) and (60:30:4.5) (1600  $\mu$ L) were collected from the Sep-Pack® column and stored as a pool. This purified material was evaporated under flowing of gas nitrogen at 37°C and the residue analyzed by chromatography.

## **Analysis by High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC)**

The purified glycosphingolipid fraction was analyzed by HPTLC (Silica Gel 60 A, 20 x 10 cm plates, Merck, Darmstadt, Germany). In order to allow the application, each residue was suspended in 50  $\mu$ l of C/M (1:1). Two solvent systems were used, according to Tani-ichi *et al* (2005). The first consisted of C/M/water (65:25:4), and the second of hexane/ethylic ether/acetic acid (50:50:1). The chromatogram was visualized by spraying with 10% CuSO<sub>4</sub> and 8% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> in water and heating at 150°C (Doering *et al* 1999). GluCer (Sigma-Aldrich,

Saint Louis, MO, USA) was used as standard. GluCer was quantified by **densitometry scanning** of the chromatogram with a CS 930 Shimadzu UV/vis densitometer. These results were compared with a chromatogram obtained from known quantities of GluCer, according to Gonarti *et al* (2002). We measured recoveries of GluCer by standard addition of this lipid to normal plasma. The amount of GluCer was a linear function of the amounts added, and the recovery was about 11.2%.

The linearity of GluCer quantification is shown in Figure 2 ( $r = 0.98$ ). These data were obtained by densitometric scanning of standard GluCer content after chromatographic running. The intra-assay CV (n=6) measured in control and GD plasma was <5.3% for GluCer. The inter-assay CV (n=6) was <9%.



**FIGURE 2** - Linearity of the measurement of GluCer in plasma. Area was determined by densitometric scanning of GluCer band from chromatogram.

## **Protein quantification**

The proteins were determined from each plasma sample by the Biuret method according to the manufacturer's instructions (Biuret Reagent – total proteins, Labtest, Lagoa Santa, MG, Brazil) and described by Gornal *et al* (1949).

## **HPTLC-Immunostaining**

The confirmation of the GluCer band identity was carried out by immunostaining using the procedure described by Brade *et al* (2000) with modifications for the blocking buffer (Haycock 2003). The immunostaining was started by the chromatogram incubation in a blocking buffer (50mM Tris-HCl pH 7.4; 200 mM NaCl; 0.1% Polyvinylpyrrolidone, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) for two hours at 24 °C with gentle shaking. Next, the chromatogram was incubated with the primary antibody (human **anti-glucosylceramide** rabbit antibody) (Glyco-Tech Produktions und Handelsgesellschaft mbH, Kuelkels, Germany) diluted to 1:500 in a washing buffer (50mM Tris-HCl pH 7.4; 200 mM NaCl) for four hours at 24 °C with gentle shaking.

After five washings with the washing buffer, the chromatogram was incubated with peroxidase-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin (IgG) (heavy and light chain specific, Dianova, Sigma- Aldrich, Saint Louis, MO, USA), diluted in a washing buffer (1:1000) for two hours, at 24°C with gentle shaking. Next, four washings as described above were performed and a fifth washing was conducted with the substrate buffer (0.1 M sodium citrate, pH 4.5).

Bound antibody was then detected by incubation of the chromatogram for 30 minutes at 24 °C in a substrate solution (10 mL) freshly prepared and composed of 8.33 mL of substrate buffer; 1.6 mL 4-chloro-1-naphthol (3 mg/mL in MeOH) and hydrogen peroxide (3.3 µL in a 30% solution) (Haycock 2003). The immunoassay results are shown in Figure 3B, lines 1b, 2b and 3b.

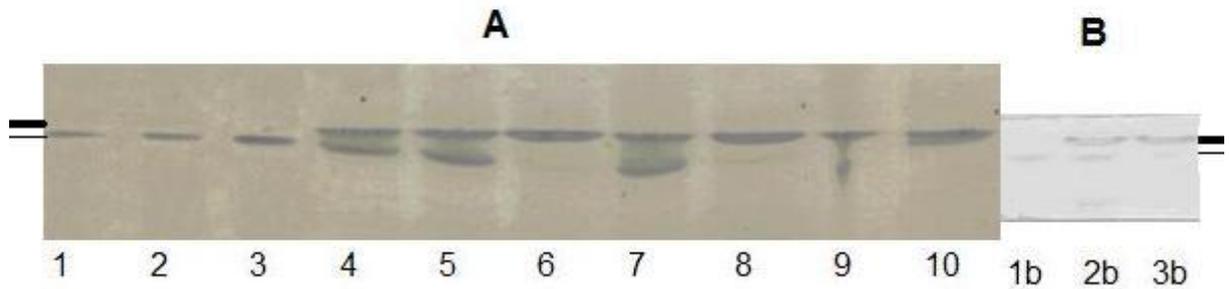
## **Statistical Analysis**

To determine significant differences between groups ( $p < 0.05$ ) we used the one-way **ANOVA** followed by the Tukey test, when necessary. The tests were conducted using the SPSS-PC version 12.

## **RESULTS**

The methodology utilized in this work allowed to extract (C/M), purify (Silicic Acid Column, Methanolysis and Sep-Pack column), separate and detect (HPTLC with chemical developing) GluCer in the plasma of GD patients receiving and not receiving ERT, as well as GluCer of normal individuals (Figure 3A, band 1). The presence of GluCer (band 1) in the chromatogram was confirmed by immunostaining with human anti-glucosylceramide (primary antibody), followed by goat anti-rabbit immunoglobulin (secondary antibody) conjugated with peroxidase (Figure 3B, lines 1b and 2b). This band was detected only in the subjects from lines 4, 5 and 7 (Figure 3A), patients with GD without treatment.

Figure 3A, lines 4, 5, 6, 7, 8, 9 and 10 shows another band (band 2) with migration velocity slightly higher than GluCer standard (band 1), with similar content in all samples. Band 2 was also immunostained (Figure 3B). This band could be another glucocerebroside with a different sphingoid chain that is present in all individuals.



**FIGURE 3** - Analysis by HPTLC of the purified lipic extracts of plasmas obtained from the GD patients on ERT or not, and normal individuals. Band 1 (—), band 2 (—).

- A.** Processing in  $\text{CuSO}_4$  10%/ $\text{H}_3\text{PO}_4$  8% (lines 1, 2 and 3 correspond to the GluCer standard 0.25  $\mu\text{g}$ , 0.5  $\mu\text{g}$  and 1.5  $\mu\text{g}$ , respectively). Lines 4, 5 and 7 refer to patients with GD without treatment while lines 6 and 8 represent patients with GD on ERT. Lines 9 and 10 represent samples from normal individuals.
- B.** Immunoprocessing (**1b** standard GluCer 0.5  $\mu\text{g}$ ; **2b** GD patient without treatment and **3b** normal individual).

Table I shows the GluCer concentrations (relation of GluCer content obtained by densitometric analysis and plasma volume or protein content). The data confirm previous findings, that is, the concentration of GluCer expressed in different units is significantly higher ( $p < 0.001$ ) in GD patients who are not receiving treatment when compared to normal individuals or to GD patients who are being treated with ERT. There is no significant difference between the plasmatic GluCer levels of normal individuals as compared to that of GD patients on treatment.

**TABLE I** - Concentration of GluCer in the plasma of GD patients with and without ERT, compared to normal individuals

<b>Groups</b>	<b>GluCer</b> ( $\mu\text{g}/600\mu\text{L}$ plasma)	<b>GluCer</b> ( $\mu\text{mol}/\text{L}$ plasma)	<b>GluCer</b> ( $\text{ng}/\text{mg}$ protein)
Normal (n = 5)	$0.03 \pm 0.03^*$	$0.07 \pm 0.07^*$	$0.67 \pm 0.78^*$
GD without treatment (n = 5)	$0.57 \pm 0.24$	$1.59 \pm 0.27$	$13.7 \pm 1.25$
<b>GD with ERT (n = 5)</b>	$0.05 \pm 0.02^*$	$0.11 \pm 0.04^*$	$1.23 \pm 0.68^*$

Results are expressed as mean  $\pm$  SD (n = 5).

\* Statistically different from GD without treatment group,  $p < 0.001$  by ANOVA followed by Tukey test.

## DISCUSSION

Gaucher Disease is the most common lysosomal storage disease. It is an autosomal recessive disorder caused by a deficiency in  $\beta$ -glu enzyme that leads to an accumulation of GluCer in the lysosomes, mainly in cells of the **reticuloendothelial system**. In the present study, we describe a methodology capable to extract, purify and quantify GluCer in plasma of GD patients, and we compare these results with those of normal individuals. In addition, we compare the quantity of GluCer of patients with GD receiving treatment with that of patients who are not under any form of treatment.

The procedures described in this work are simple to apply and are economically viable for use in clinical analysis laboratories, where equipment required to work with different glycosphingolipids is not always available, like mass spectrometer, for example (Groener *et al* 2007; Whitfield *et al* 2002) and HPLC (Ullman and McCluer 1977). The technology herein

tested can be applied simultaneously in a considerable number of samples. Also, our method is advantageous when compared with other older thin-layer approaches (Vance and Sweeley 1967), because it was standardized for a small sample volume.

The results presented in Figure 3 and Table I demonstrate an increased plasmatic GluCer levels of GD patients not receiving treatment (lines 4, 5 and 7) while the plasmatic GluCer levels of normal individuals (lines 9 and 10) and patients undergoing treatment by ERT (lines 6 and 8) are similar. All groups demonstrate the same behavior discussed in the literature (Gornati *et al* 2002; Ullman and McCluer 1977; Vance and Sweeley 1967).

Some authors have mentioned that the glucosylceramide levels in GD patients might show variations both in concentration and in distribution percentage, as a consequence of the mobility of GluCer between the plasmatic and erythrocyte lipoproteins and the white blood cells (van den Bergh and Tager 1976; G. Dawson and Oh 1977). This fact suggests that alterations in the components of the blood such as erythrocytes and platelets can modify the plasmatic distribution pattern of glycolipids. In this present paper, plasmatic GluCer levels of GD patients without treatment was about 17 times as high as that of normal individuals.

According to Whitfeld *et al* (2002), mean plasmatic GluCer levels of GD patients is 16.3  $\mu\text{mol/L}$ , while in normal individuals the value is 7.4  $\mu\text{mol/L}$ . In Groener *et al* (2008) GluCer concentration in non-treated patients was observed to vary between 6.5 and 45.5  $\text{nmol/mL}$  (mean = 17.5  $\text{nmol/mL}$ ), while for the control group it varied between 4.0 and 8.6  $\text{nmol/mL}$  (mean = 5.9  $\text{nmol/mL}$ ).

Our results show that the mean plasmatic GluCer level is 1.31  $\mu\text{mol/L}$  for individuals with GD without ERT and 0.07 $\mu\text{mol/L}$  for healthy individuals. In spite of the fact that these values are 10 times lower than those found by Whitfeld *et al* (2002) and that the recovery of GluCer was about 11.2%, the methodology herein described afforded to observe a considerable difference between the groups studied. We know that there are detection methods that

determine smaller GluCer quantities (Groener *et al* 2007). Nevertheless, we emphasize that the method described in the present paper allowed to detect differences between controls and GD patients with and without ERT treatment.

The method developed in the present study did not reveal overlapping GluCer levels between healthy individuals and GD patients (0 to 0.15  $\mu\text{mol/L}$  and 0.44 to 1.76  $\mu\text{mol/L}$ , respectively). Yet, GluCer concentration overlapping was indeed observed in a study that resorted to mass spectrometry to compare GluCer levels between GD patients (0.2 to 54.2  $\mu\text{mol/L}$ ) and healthy individuals (3.7 to 14.7  $\mu\text{mol/L}$ ) (Ghauharali-van der Vlugt *et al* 2008).

According to Meikle *et al* (2008) the lipid analysis in GD may be used to monitor the therapy and correlate it with the severity of the disease. This approach was corroborated by the findings of our study, as GD individuals on treatment showed a lower GluCer level than those not being treated. Although plasmatic chitotriosidase level is a good biomarker of GD, GD patients with deficient chitotriosidase activity have been reported in the literature (Guo *et al*, 1995). In these patients, GluCer quantification gains considerable importance. GluCer levels can be used both as an auxiliary diagnosis method for GD and as treatment monitoring parameter.

Our experiments with primary rabbit anti-bodies for human anti-glucosylceramide indicate that the bands observed in the chromatography in fact belong to GluCer (Figure 3B). After several repetitions of extraction, purification and quantification steps with one sample, the same results were obtained, demonstrating the reproducibility of the techniques.

## **CONCLUSIONS**

In our study, we developed a methodology capable to extract, purify and quantify GluCer in plasma from GD patients, and to distinguish values considered pathological from

those seen as normal. Also, the technique affords to measure the reduction in the concentration of glucocerebroside in response to ERT. Therefore, the evaluation of GluCer concentration in symptomatic and asymptomatic GD patients could be used in complementary diagnosis and as a means of monitoring the treatment. Our method seems to be advantageous when we compared with older thin layer approaches used in the quantification of GluCer.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by FAPERGS, CNPq and GPPG-HCPA.

We are grateful to Dr. Fernando Irazoqui - *Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba- Republica Argentina (CIQUIBIC, UNC-CONICET)*.

## REFERENCES

- AERTS, J. M.; HOLLAK, C.; BOOT, R.; GROENER, A. Biochemistry of glycosphingolipid storage disorders: implications for therapeutic intervention. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, London, v.358, n.1453 p.905-914, 2003.
- BEUTLER, E.; GRABOWSKI, G. A. Gaucher Disease. In: SCRIVER, C. R.; BEAUDET, A. L.; SLY, W. S.; VALLE, D. (eds.). *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. 8.ed. New York: McGraw Hill, 2001. p.3635-3667.
- BRADE, L.; VIELHABER, G.; HEINZ, E.; BRADE, H. In vitro characterization of anti-glucosylceramide rabbit antisera. *Glycobiology*, Oxford, v.10, n.6, p.629-636, 2000.
- BRADY, R. O. Enzyme replacement therapy: conception, chaos and culmination. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, London, v.358, n.1433 p.915-919, 2003.
- DAWSON, G.; OH, J. Y. Blood glucosylceramide levels in Gaucher's disease and its distribution amongst lipoprotein fractions. *Clin. Chim. Acta.*, Amsterdam, v.75, n.1,

- p.149-153, 1977.
- DE FOST, M.; AERTS, J. M.; HOLLAK, C. E. Gaucher disease: from fundamental research to effective therapeutic interventions. *Neth. J. Med.*, Amsterdam, v.61, n.1, p.3-8, 2003.
- DOERING, T.; HOLLERAN, W. M.; POTRATZ, A.; VIELHABER, G.; ELIAS, P. M.; SUZUKI, K.; SANDHOFF, K. Sphingolipid activator proteins (SAPs) are required for epidermal permeability barrier formation. *J. Biol. Chem.*, Maryland, v.274, n.16 p.11038-11045, 1999.
- FUTERMAN, A. H.; SUSSMAN, J. L.; HOROWITZ, M.; SILMAN, I.; ZIMRAN, A. New directions in treatment of Gaucher disease. *Thends. Pharmacol. Sci.*, Amsterdam, v.25, n.3, p.146-151, 2004.
- GERMAIN, D. P. Gaucher disease: clinical, genetic and therapeutic aspects. *Pathol. Biol.*, Paris, v.52, n.6, p.343-350, 2004.
- GHAUHARALI-VAN DER VLUGT, K.; LANGEVELD, M.; POPPEMA, A.; KUIPER, S.; HOLLAK, C. E.; AERTS, J. M.; GROENER, J. E. Prominent increase in plasma ganglioside GM3 is associated with clinical manifestations of type I Gaucher disease. *Clin. Chim. Acta.*, Amsterdam, v.389, n.1-2, p.109-113, 2008.
- GORNAL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, Maryland, v.177, n.2, p.751-766, 1949.
- GORNATI, R.; BEMBI, B.; TONG, X.; BOSCOLO, R.; BERRA, B. Total glycolipid and glucosylceramide content in serum and urine of patients with Gaucher's Disease type 3 before and after enzyme replacement therapy. *Clin. Chim. Acta.*, Amsterdam, v.271, p.151-161, 1998.
- GORNATI, R.; BERRA, B.; MONTORFANO, G.; MARTINI, C.; CIANA, G.; FERRARI, P.; ROMANO, M.; BEMBI, B. Glycolipid analysis of different tissues and cerebrospinal fluid in type II Gaucher disease. *J. Inherit. Metab. Dis.*, London, v.25, n.1, p.47-55, 2002.

- GROENER, J. E.; POORTHUIS, B. J.; KUIPER, S.; HOLLAK, C. E.; AERTS, J. M. Plasma glucosylceramide and ceramide in type 1 Gaucher disease patients: Correlations with disease severity and response to therapeutic intervention. *Biochim. Biophys. Acta.*, Amsterdam, v.1781, n.1-2, p.72-78, 2008.
- GROENER, J. E.; POORTHUIS, B. J.; KUIPER, S.; HELMOND, M. T.; HOLLAK, C. E.; AERTS, J. M. HPLC for simultaneous quantification of total ceramide, glucosylceramide, and ceramide trihexoside concentrations in plasma. *Clin. Chem.*, Stanford, v.53, n.4, p.742-747, 2007.
- GUO, Y.; HE, W.; BOER, A. M.; WEVERS, R. A.; DE BRUIJN, A. M.; GROENER, J. E.; HOLLAK, C. E.; AERTS, J. M.; GALJAARD, H.; VAN DIGGELEN, O. P. Elevated plasma chitotriosidase activity in various lysosomal storage disorders. *J. Inher. Metab. Dis.*, London, v.18, n.6, p.717-722, 1995.
- HAYCOCK, J. W. Polyvinylpyrrolidone as a blocking agent in immunochemical studies. *Anal. Biochem.*, Amsterdam, v.208, n.2, p.397-399, 1993.
- HOLLAK, C. E.; VAN WEELY, S.; VAN OERS, M. H.; AERTS, J. M. Marked elevation of plasma chitotriosidase activity, a novel hallmark of gaucher disease. *J. Clin. Invest.*, Ann Harbor, v.93, n.3, p.1288-1292, 1994.
- JAKÓBKIEWICZ-BANECKA, J.; WEGRZYN, A.; WEGRZYN, G. Substrate deprivation therapy: a new hope for patients suffering from neuronopathic forms of inherited lysosomal storage diseases. *J. Appl. Genet.*, Poznan, v.48, n.4, p.383-388, 2007.
- MEIKLE, P. J.; WHITFIELD, P. D.; ROZAKLIS, T.; BLACKLOCK, D.; DUPLOCK, S.; ELSTEIN, D.; ZIMRAN, A.; MENGEL, E.; CANNELL, P.; HOPWOOD, J. J.; FULLER, M. Plasma lipids are altered in Gaucher disease: biochemical markers to evaluate therapeutic intervention. *Blood. Cells. Mol. Dis.*, Amsterdam, v.40, n.3, p.20-427, 2008.

- MOYSES, C. Substrate reduction therapy: clinical evaluation in type 1 Gaucher disease. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, London, v.358, n.1433, p.955-60, 2003.
- TANI-ICHI, S.; MARUYAMA, K.; KONDO, N.; NAGAFUKU, M.; KABAYAMA, K.; INOKUCHI, J.; SHIMADA, Y.; OHNO-IWASHITA, Y.; YAGITA, H.; KAWANO, S.; KOSUGI, A. Structure and function of lipid rafts in human activated T cells. *Intern. Immunol.*, Oxford, v.17, n.6, p.749-758, 2005.
- ULLMAN, M. D.; MCCLUER, R. H. Quantitative analysis of plasma neutral glycosphingolipids by high performance liquid chromatography of their perbenzoyl derivatives. *J. Lipid. Res.*, Bethesda, v.18, n.7, p.371-378, 1977.
- VAN DEN BERGH, F. A. J. T. M.; TAGER, J. M. Localization of neutral glycosphingolipids in human plasma. *Biochim. Biophys. Acta.*, Amsterdam, v.441, n.3 p.391-402, 1976.
- VANCE, D. E.; SWEELEY, C. C. Quantitative determination of the neutral glycosyl ceramides in human blood. *J. Lipid. Res.*, Bethesda, v.8, n.6, p.621-630, 1967.
- WAJNER, A.; MICHELIN, K.; BURIN, M. G.; PIRES, R. F.; PEREIRA, M. L.; GIUGLIANI, R.; COELHO, J. C. Comparison between the biochemical properties of plasma chitotriosidase from normal individuals and from patients with Gaucher disease, GM1-gangliosidosis, Krabbe disease and heterozygotes for Gaucher disease. *Clin. Biochem.*, Amsterdam, v.40, n.5-6, p.365-369, 2007.
- WHITFIELD, P. D.; NELSON, P.; SHARP, P. C.; BINDLOSS, C. A.; DEAN, C.; RAVENSCROFT, E. M.; FONG, B. A.; FIETZ, M. J.; HOPWOOD, J. J.; MEIKLE, P. J. Correlation among genotype, phenotype, and biochemical markers in Gaucher disease: implications for the prediction of disease severity. *Mol. Genet. Metab.*, Amsterdam, v.75, n.1, p.46-55, 2002.
- WILLIAMS, M. A.; MCCLUER, R. H. The use of Sep-Pak C18 cartridges during the isolation

of gangliosides. *J. Neurochem.*, Boston, v.35, n.1, p.266-269, 1980.

ZIMRAN, A.; ELSTEIN, D. Gaucher disease and the clinical experience with substrate reduction therapy. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, London, v.29, n.1433, p.961-966, 2003.