



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia

2011

**Sónia Graziela
Ferreira Moreira
da Rocha**

**Contribuição para a caracterização bioquímica da
Doença Niemann Pick**



**Sónia Graziela
Ferreira Moreira
da Rocha**

**Contribuição para a caracterização bioquímica da
Doença Niemann Pick**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria Gil Roseira, Professora Associada da Universidade Fernando Pessoa e da Doutora Odete Cruz e Silva, Professora Auxiliar do Departamento de Ciências da Saúde da Universidade de Aveiro.

o júri

presidente

Prof. Maria do Céu Gomes dos Santos
professora auxiliar Convidada do Departamento de Biologia da Universidade
de Aveiro

Doutora Carla Andreia Fidalgo Teixeira
investigadora do Instituto Biologia Molecular e Celular- IBMC

Doutora Maria Gil Roseira
professora associado da Universidade Fernando Pessoa

Doutora Odete Cruz e Silva
professora auxiliar do Departamento de Ciências da Saúde da Universidade de
Aveiro

palavras-chave

Esfingomielinase ácida; Niemann-Pick; Niemann Pick-tipos A e B; gene *SMPD1*; variante pseudo-normal

Resumo

A doença de Niemann-Pick tipos A e B (NPD A/B) é uma patologia metabólica hereditária do catabolismo lisossomal dos esfingolípidos causada por mutações no gene *SMPD1* que se encontra localizado no cromossoma humano 11p15.4. Este gene codifica a enzima esfingomielinase ácida que catalisa a hidrólise de esfingomielina em ceramida e fosforilcolina. Na doença NPD A/B, a deficiente actividade da esfingomielinase ácida origina a acumulação de esfingomielina em vários tipos de células. Esta doença pode manifestar-se nos primeiros meses de vida e os sintomas principais incluem hepatoesplenomegalia, evidência de envolvimento intersticial pulmonar, atraso do desenvolvimento psico-motor e envolvimento neurológico. No entanto, existem formas clínicas de início mais tardio, com uma evolução mais lenta e sem envolvimento neurológico. Em termos terapêuticos, a suplementação enzimática tem sido investigada encontrando-se actualmente em fase de ensaio clínico. A identificação bioquímica da doença é efectuada através do estudo do nível de actividade enzimática da esfingomielinase ácida em amostras de leucócitos obtidos de sangue total periférico, ou de fibroblastos de pele cultivados, com o substrato natural marcado radioactivamente ou, mais recentemente, com um substrato artificial marcado com um grupo cromogénico. Apesar de tecnicamente mais simples, menos dispendioso e seguro na detecção de mutações com impacto na função catalítica da enzima, o substrato artificial cromogénico não permite detectar mutações específicas que interfiram com o reconhecimento e/ou associação da enzima com o substrato natural (variante pseudo-normal). Apesar de raras, a presença deste tipo de variantes, em homozigotia ou heterozigotia composta, poderá dificultar seriamente o diagnóstico bioquímico da patologia se este for efectuado com substratos sintéticos.

No sentido de contribuir para a melhoria da qualidade do diagnóstico bioquímico da NPD A/B, o presente trabalho tem por objectivo a implementação dum ensaio enzimático da esfingomielinase ácida utilizando um substrato sintético fluorogénico. Os resultados obtidos em amostras de leucócitos, fibroblastos e amniócitos sugerem que a inclusão futura deste ensaio fluorimétrico no painel de testes bioquímicos de rastreio pós-natal e pré-natal de Doenças Lisossomais de Sobrecarga permitirá a identificação e a caracterização molecular de doentes com NPD A/B, incluindo os indivíduos afectados com a variante pseudo-normal e, desse modo, contribuirá para um melhor conhecimento sobre a epidemiologia genética da doença na população portuguesa.

keywords

acid sphingomyelinase; Niemann-Pick; Niemann-Pick types A and B; *SMPD1* gene; pseudo-normal variant

abstract

Niemann-Pick disease types A and B (NPD-A/B), is an inherited metabolic disorder of lysosomal sphingolipid catabolism caused by mutations in the gene *SMPD1* which is located on human chromosome 11p15.4. This gene encodes the enzyme acid sphingomyelinase that catalyzes the hydrolysis of sphingomyelin to ceramide and phosphorylcholine. In NPD-A/B disease, the deficient activity of acid sphingomyelinase results in the accumulation of sphingomyelin in various cell types. The first disease symptoms may appear early in life and include hepatosplenomegaly, evidence of interstitial lung involvement, delayed psychomotor development and neurologic involvement. However, there are clinical forms of later onset, slower evolution and without neurological involvement. In therapeutic terms, the enzyme supplementation has been investigated and is currently undergoing clinical trial. The biochemical identification of the disease is performed by studying the level of enzymatic activity of acid sphingomyelinase in samples of leukocytes obtained from peripheral whole blood, or cultured skin fibroblasts, with the radiolabeled natural substrate or, more recently, with an artificial substrate labeled with a chromogenic group. Although technically simpler, cheaper and safer for the detection of mutations with impact on the catalytic activity of the enzyme, the artificial chromogenic substrate fails to detect specific mutations that interfere with the recognition and/or association of the enzyme with the natural substrate (pseudo-normal variant). Although rare, the presence of such variants in homozygosity or compound heterozygosity, may seriously hamper the biochemical diagnosis of the condition, when using synthetic substrates. In order to contribute to improving the quality of the biochemical diagnosis of NPD A/B, this work aims at the implementation of an enzymatic assay of acid sphingomyelinase using a synthetic fluorogenic substrate. The results obtained in samples of white blood cells, fibroblasts and amniocytes suggest that the future inclusion of this fluorimetric assay in the panel of biochemical tests for postnatal and prenatal screening of lysosomal storage diseases will allow the identification and molecular characterization of patients with NPD-A/B, including individuals affected with the pseudo-normal variant, and thereby contribute to a better understanding of the genetic epidemiology of the disease in the Portuguese population.

Índice de Figuras

Figura 1. Compartimentação celular dos processos metabólicos que envolvem moléculas esfingolípídicas.....	6
Figura 2. Catabolismo dos SLs e sua relação com as esfingolipidoses..	9
Figura 3. Potenciais abordagens terapêuticas em DLS..	10
Figura 4. Distribuição das mutações mais frequentes do gene <i>SMPD1</i>	19
Figura 5. Caracterização molecular por sequenciação automática de produtos de PCR do doente D7.....	40
Figura 6. Curva de titulação para determinação da concentração óptima do inibidor LSM.	40
Figura 7. Actividade enzimática da aSMase em lisados de fibroblastos humanos cultivados, quando determinada com o substrato sintético fluorogénico 6HMU-PC, na ausência e na presença do inibidor, a LSM.	42
Figura 8. Razão das actividades enzimáticas da aSMase obtidas na presença (6HMU-PC+LSM) ou ausência (6HMU-PC) do inibidor competitivo LSM em lisados de fibroblastos humanos cultivados.....	43
Figura 9. Actividade enzimática da aSMase em lisados de fibroblastos humanos cultivados quando determinada com o substrato natural marcado com um isótopo radioactivo.....	44
Figura 10. Actividade enzimática da aSMase em lisados de leucócitos quando determinada com o substrato sintético fluorogénico 6HMU-PC, na ausência e na presença do inibidor, a LSM.	45
Figura 11. Razão das actividades enzimáticas da aSMase obtidas na presença (6HMU-PC+LSM) ou ausência (6HMU-PC) do inibidor competitivo LSM em lisados de leucócitos.	46
Figura 12. Actividade enzimática da aSMase em lisados de leucócitos, quando determinada com o substrato natural marcado com um isótopo radioactivo..	46
Figura 13. Actividade enzimática da aSMase em lisados de Amniócitos humanos cultivados, quando determinada com o substrato sintético fluorogénico 6HMU-PC, na ausência e na presença do inibidor, a LSM.	48
Figura 14. Actividade enzimática da aSMase em lisados de Amniócitos humanos cultivados, quando determinada com o substrato natural marcado com um isótopo radioactivo.....	48

Índice Geral

Índice Geral	i
Índice de Figuras	ii
Índice de Tabelas	iii
Abreviaturas, siglas e símbolos	iv
1. Introdução	3
1.1. Esfingolípidos	4
1.2. Doenças lisossomais do metabolismo dos Esfingolípidos	8
1.3. Abordagens terapêuticas para as Esfingolipidoses	10
1.4. Doença de Niemann-Pick	13
3. Material e Métodos	29
3.1. Amostras Biológicas	29
3.2. Substratos	31
3.3. Procedimento experimental	31
4. Resultados e Discussão	39
4.1. Análise do gene <i>SMPD1</i>	39
4.2. Estudo do estabelecimento da concentração óptima de inibidor LSM	40
4.3. Estudo da actividade enzimática <i>in vitro</i> da aSMase	41
5. Discussão Geral	53
6. Conclusão	59
7. Referências Bibliográficas	63
8. Anexos	72

Índice de Tabelas

Tabela 1. Classificação dos diferentes tipos de esfingomielinases. 7

Tabela 2 . Descrição sumária dos doentes de Niemann-Pick incluídos no estudo.....28

Abreviaturas, siglas e símbolos

¹⁴C-SM	Esfingomielina marcada com ¹⁴ C
4-MU	4-Metilumbeliferona
6HMU-PC	6-hexadecoloinoilamino-fosforilcolina
aSMase	Esfingomielinase ácida
BSA	Albumina sérica bovina
Cer	Ceramida
CG	Complexo de Golgi
CGMJMNSA,IP	Centro de Genética Médica Jacinto de Magalhães do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
CO₂	Dióxido de Carbono
CoA	Coenzima A
CPM	Contagens por minuto
ddNTP	Di-Desoxirribonucleótidos trifosfato
DLS	Doença lisossomal de sobrecarga
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DTT	Ditiotreitol
FDil	Factor de diluição
FI	Fluorescência
GalCer	Galactosilceramida
gDNA	DNA genómico
GlcCer	Glucosilceramida
GSL	Glicoesfingolípido
ISSD	Doença infantil de sobrecarga de ácido siálico
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LacCer	Lactosilceramida
LSM	Liso esfingomielina
M6P	Manose-6-fosfato
MEM	Meio essencial mínimo

Mg	Magnésio
MgCl₂	Cloreto de magnésio
min	Minuto
MP	Membrana plasmática
NIHF	Hidrópsia fetal não imune
NPD	Doença de Niemann-Pick
NPD-A	Doença de Niemann-Pick tipo A
NPD-A/B	Doença de Niemann-Pick tipo A ou tipo B
NPD-B	Doença de Niemann-Pick tipo B
pb	Par de bases
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reacção em cadeia da polimerase
RE	Retículo endoplasmático
RFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição
SAP	Saposina
SL	Esfingolípido
SM	Esfingomielina
SMase	Esfingomielinase
SMPD1	Gene Esfingomielina fosfodiesterase 1
SVF	Soro vitelo fetal
TAE	Tampão tris-acetato
Tinc	Tempo de incubação
TRS	Terapia de redução do substrato
TSE	Terapia de substituição enzimática
UBQ	Unidade de Bioquímica Genética
Zn	Zinco

Introdução

1. Introdução

Os esfingolípidos (SLs) foram descobertos há mais de um século em amostras de cérebro por Johann Thudichum (Thudichum, 1962). Desde então diversas espécies de SLs foram identificadas e caracterizadas quimicamente. Do ponto de vista funcional, a sua caracterização é relativamente recente e nas últimas três décadas os SLs, para além do seu papel estrutural nas membranas biológicas, têm sido reconhecidos como uma família de moléculas sinalizadoras que regulam processos celulares diversos e fundamentais, tais como diferenciação, migração, apoptose, proliferação celular e inflamação. O seu metabolismo consiste numa rede complexa de reacções bioquímicas que decorrem em vários compartimentos celulares, nomeadamente no retículo endoplasmático (RE) e no complexo de Golgi (CG) (via biossintética), na membrana plasmática (MP) (ciclo da esfingomiélinina) e no lisossoma (via catabólica). Os mecanismos de transporte e de regulação do seu nível intracelular continuam a ser investigados e apesar dos avanços registados nas últimas décadas não foram, ainda, completamente elucidados.

A existência de doenças hereditárias graves causadas por alterações no catabolismo destas moléculas sublinha a importância dos SLs na fisiologia celular. A Doença de Niemann-Pick tipo A e tipo B (NPD-A e NPD-B) representa precisamente uma dessas doenças, em que a etapa catabólica que se encontra bloqueada é a conversão da esfingomiélinina (SM) em ceramida (Cer), devido à deficiente actividade enzimática da esfingomiélinase ácida (aSMase). Subsequentemente, ocorre acumulação lisossomal de SM, o que impede o normal funcionamento do lisossoma. À semelhança de outras Doenças Lisossomais de Sobrecarga (DLS), a identificação da NPD-A e da NPD-B é efectuada através de testes genéticos específicos. Dado que não existe presentemente uma terapia para esta doença, a prevenção do aparecimento de novos casos nas famílias em risco é a única forma de diminuir a sua incidência. Nesta secção do trabalho estes tópicos são desenvolvidos visando proporcionar um conhecimento suficientemente amplo, actual e integrado sobre o tema.

1.1. Esfingolípidos

Estrutura e função

Os SLs formam uma classe quimicamente heterogénea de lípidos que é particularmente abundante na MP de células eucarióticas. Estas moléculas lipídicas são caracterizadas pela presença de três componentes estruturais: o grupo esfingóide, os ácidos gordos e o grupo polar. Os grupos esfingóides mais comuns são a esfinganina e a esfingosina.

O SL mais simples é a Cer. Este SL é constituído por uma esfingosina à qual está ligado um ácido gordo na posição C-2 por N-acilação (Sillence e Platt, 2004). A ligação da fosforilcolina no C-1 da Cer origina a SM e a anexação de oses, tais como a glucose, a frutose, a galactose, a N-acetilglucosamina ou a N-acetilgalactosamina, constitui o primeiro passo na formação dos glicosfingolípidos (GSLs) (Futerman e van Meer, 2004); (Lahiri e Futerman, 2007). Os GSLs apresentam uma considerável heterogeneidade estrutural tendo sido caracterizados mais de 60 grupos esfingóides e mais de 300 oligossacáridos de que resultam milhares de unidades estruturais (Degroote *et al.*, 2004). Para além disso, o grupo esfingóide pode variar quanto ao comprimento, grau de saturação, hidroxilação e ramificação (Karlsson, 1970).

Os SLs são componentes essenciais das MPs de todas as células eucarióticas. No caso específico dos GSLs a sua localização é exclusiva no folheto externo da MP, onde o segmento apolar se encontra inserido na porção apolar da membrana enquanto o segmento polar está orientado para o espaço extracelular (Futerman e Hannun, 2004). A importância biológica destas moléculas é evidenciada pela ocorrência de doenças genéticas, as Esfingolipidoses, que são causadas pela acumulação intracelular primária de SLs. De facto, além de constituintes essenciais da MP, os SLs têm sido implicados em processos de sinalização intracelular associados a processos diversos tais como: proliferação, diferenciação, adesão e migração celular, morte celular, inflamação e resposta ao *stress* celular (Hannun e Obeid, 2002; Merrill, 2002). Para além das doenças hereditárias metabólicas atrás referidas, os SLs têm sido mais recentemente implicados em patologias de etiologia complexa, tais como obesidade, cancro e aterosclerose (Ogretmen, 2006). Contudo, o seu papel biológico nestes contextos patológicos não está, ainda, bem estabelecido.

Metabolismo e transporte

Os SLs são sintetizados no RE e no CG, endereçados para a MP e posteriormente internalizados por endocitose para os diversos compartimentos celulares, nomeadamente para o CG ou para o lisossoma (Ozbayraktar e Ulgen, 2009). O facto das reacções bioquímicas que integram o metabolismo dos SLs ocorrerem em vários compartimentos celulares (Figura 1), implica que os seus intermediários metabólicos têm de ser transportados do local onde a sua síntese ocorre para o local onde são metabolizados e/ou exercem a sua acção biológica. A via exacta pela qual os GSLs da membrana atingem o lúmen do lisossoma não se encontra totalmente clarificada, embora vários trabalhos sugiram o seu sequestro em vesículas intra-endossomais que atingem o lúmen lisossomal por processos de fissão e fusão membranar (Sandhoff *et al.*, 1998; Kolter e Sandhoff, 1999; Sandhoff e Kolter, 2003).

A síntese *de novo* da Cer inicia-se no RE a partir da condensação da serina e palmitil-CoA por acção da serina palmitil transferase (EC 2.3.1.50). Depois de sintetizada, a Cer é endereçada para o CG onde é utilizada como substrato para a síntese de SLs mais complexos, a SM e os GSLs. A SM é produzida por acção da esfingomielin sintetase (EC 2.7.8.3) que catalisa a adição da fosfatidilcolina à ceramida. Esta enzima actua principalmente na face luminal das membranas do CG e em menor extensão na MP. A SM é um lípido regulador de vários processos celulares através do seu papel bioefector em vias de sinalização intracelulares. Por isso, o transporte da SM pode representar um ponto de regulação do nível da SM que é disponibilizada para os diversos compartimentos intracelulares (Jenkins *et al.*, 2009). A produção da galactosilceramida (GalCer) por acção da enzima galactosiltransferase (EC 2.4.1.47), que promove a ligação da galactose ao grupo esfingóide da ceramida, ocorre nas membranas do RE. A formação da glucosilceramida (GlcCer), o GSL precursor da lactosilceramida (LacCer) e dos gangliosídeos, é catalisada pela glucosilceramida sintetase (EC 2.4.1.80) que se encontra localizada principalmente na região cis do CG, tendo também sido observada no RE e microssomas. A formação da GlcCer e LacCer ocorre, respectivamente, na face citossólica e na face luminal das membranas do CG (Tettamanti, 2004).

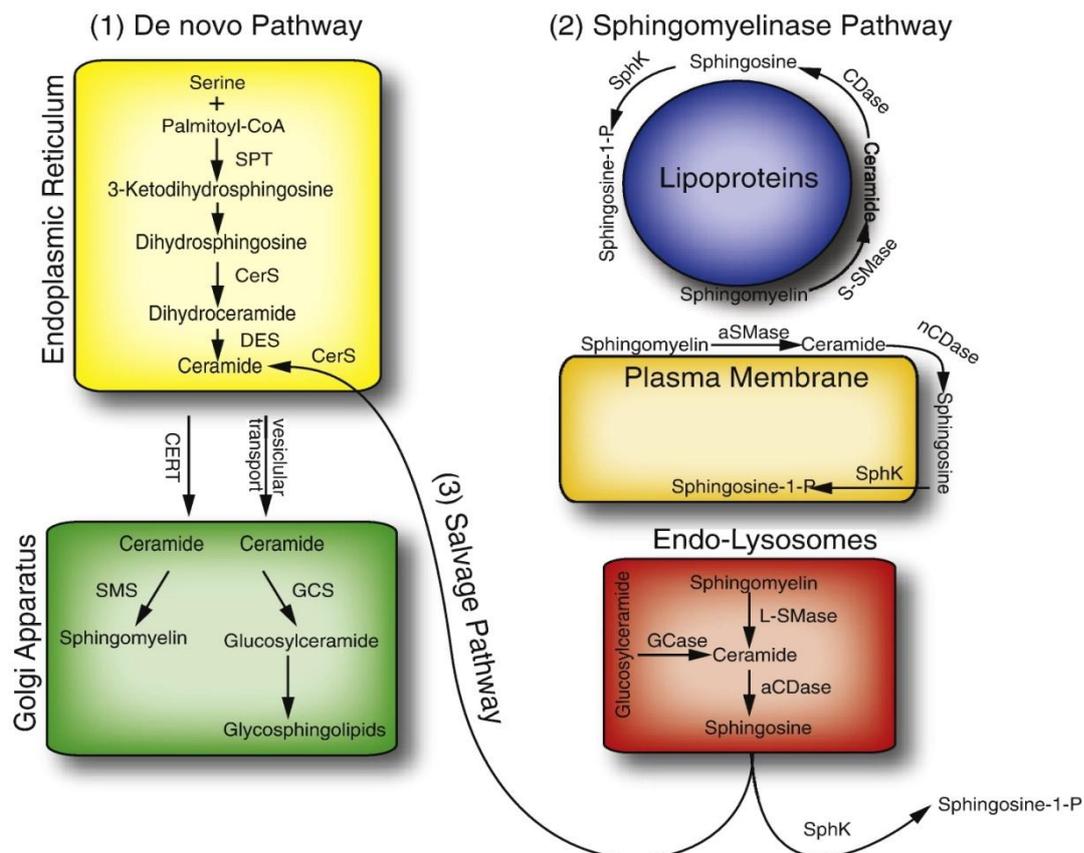


Figura 1. Compartimentação celular dos processos metabólicos que envolvem moléculas esfingolípicas. SPT – serina palmitil transferase; Cers – (hidro) Ceramida sintetase; DES – Dihidroceramida redutase; CERT – Proteína de transferência de ceramida; SMS – Esfingomielin sintetase; GCS – Glicosilceramida sintetase; aSMase – Esfingomielinase ácida; S-SMase – Esfingomielinases secretoras; L-SMase – Esfingomielinases lisossomais; GCCase – Glucosilceramidase; aCDase – Ceramidase ácida; nCDase – Ceramidasa neutra; SphK – Esfingosina cinase. Figura extraída de (Jenkins *et al.*, 2009).

A degradação constitutiva dos SLs ocorre nos compartimentos ácidos da célula: nos endossomas tardios e nos lisossomas maduros (Sandhoff, 1977). Estas macromoléculas alcançam o sistema lisossomal por endocitose, fagocitose ou autofagia (Kolter e Sandhoff, 1999). O lisossoma é um organelo que está presente em todas as células nucleadas, tendo sido descrito pela primeira vez em 1955 por Christian De Duve (De Duve *et al.*, 1955). No sistema lisossomal, a degradação dos SLs ocorre de forma sequencial, e cada etapa é catalisada por uma hidrolase específica. Em alguns casos participam proteínas denominadas proteínas activadoras de SLs, as saposinas (SAPs), que são responsáveis pela solubilização e/ou orientação correcta do substrato no centro activo da enzima hidrolítica (Furst e Sandhoff, 1992). Os produtos resultantes da hidrólise

de SLs e GSLs, isto é, a esfingosina e os ácidos gordos, são exportados do lisossoma para posterior reutilização celular (Sweeley, 1991; Kolter e Sandhoff, 1999). No caso da hidrólise da SM, esta pode ocorrer no sistema endossomal-lisossomal, no folheto externo da MP ou associada a lipoproteínas por acção de SMases específicas que clivam a ligação fosfodiéster da SM dando origem à Cer. Até à data, foram descritas 7 SMases (Levade e Jaffrezou, 1999). A Tabela 1 resume a sua classificação.

Tabela 1. Classificação dos diferentes tipos de esfingomielinases.

Esfingomielinases	Localização Celular
SMase ácida	Lisossoma
SMase neutra (Mg^{2+} dependente)	Membrana Plasmática
SMase neutra (Mg^{2+} independente)	Mielina e citosol
SMase neutra Mg^{2+} -DTT	Células de rato
SMase neutra	Cromatina
SMase (Zn^{2+} dependente)	Soro
SMase alcalina	Aparelho digestivo

SMase, Esfingomielinase; Mg, Magnésio; DTT, Ditioneitol; Zn, Zinco. Adaptado de (Levade e Jaffrezou, 1999).

A Cer resultante da acção de SMases, bem como a Cer proveniente da via biossintética ou do catabolismo dos GSLs, pode ser hidrolisada em esfingosina e ácido gordo por acção de ceramidases. Por outro lado, a esfingosina pode ser enzimaticamente convertida em Cer, e estas moléculas podem ser usadas na síntese de esfingosina-1-fosfato e ceramida-1-fosfato, respectivamente. O equilíbrio celular entre a Cer (geralmente considerada apoptótica) e a esfingosina-1-fosfato (geralmente anti-apoptótica) é fisiologicamente importante na medida em que a razão entre o nível destes compostos pode determinar mecanismos de sobrevivência ou de morte celular (Spiegel e Milstien, 2007).

1.2. Doenças lisossomais do metabolismo dos Esfingolípidos

Base genética e bioquímica

O catabolismo dos SLs tem sido extensivamente estudado, não só pela importância biológica destas moléculas mas, também, porque a sua acumulação intralisossomal está associada a doenças genéticas graves. As alterações ao nível da sequência primária das enzimas do catabolismo dos SLs, ou em cofactores proteicos, originam a acumulação intralisossomal de substratos esfingolipídicos específicos em diferentes tipos de células, resultando em DLS. Presentemente, estima-se que existam no lisossoma pelo menos 50 a 60 hidrolases e 7 proteínas integrais de membrana (Futerman e van Meer, 2004). Teoricamente, a deficiência numa qualquer destas proteínas deverá comprometer a função lisossomal. Actualmente, são conhecidas cerca de 40 DLS. A classificação das DLS em Lipidoses, Mucopolissacaridoses, Glicogenoses, Mucolipidoses, Glicoproteinoses, Oligossacaridoses e CeroidoLlipofuscinoses neuronais reflecte a natureza do substrato acumulado.

Com a excepção da doença de Fabry e Mucopolissacaridoses tipo II que são doenças ligadas ao cromossoma X, as DLS são doenças autossómicas recessivas. Apesar das DLS serem doenças monogénicas estas apresentam uma considerável variabilidade clinicopatológica que geralmente está associada a uma elevada heterogeneidade alélica. O impacto das mutações ao nível da actividade residual da enzima é, por isso, variável, tendo sido descritas mutações que originam perda completa de actividade enzimática, enquanto outras mutações causam apenas uma redução parcial dessa actividade. Em geral, a actividade residual correlaciona-se inversamente com a gravidade do fenótipo clínico (Futerman e van Meer, 2004). No entanto, em certos casos de DLS, a severidade da doença parece estar também relacionada com outros factores, nomeadamente o tipo e nível de substrato acumulado bem como a diferente vulnerabilidade das células à acumulação do substrato (Desnick e Schuchman, 2002). Nesse sentido, o conhecimento sobre as vias celulares/bioquímicas secundárias e terciárias implicadas nestas patologias tem contribuído para uma melhor compreensão sobre a sequência de eventos que são desencadeados a partir da acumulação primária do substrato. Paralelamente, o recurso a modelos animais, naturais e artificiais, tem facilitado a investigação sobre a patofisiologia deste conjunto de doenças, bem como sobre a experimentação terapêutica.

1.3. Abordagens terapêuticas para as Esfingolipidoses

O tratamento das DLS pode ser dividido em duas categorias gerais: terapêutica específica, isto é, tratamento que visa corrigir o defeito bioquímico da doença, e cuidados paliativos, que incluem o tratamento dos sintomas e intervenções médico-cirúrgicas como, por exemplo, esplenectomia ou transplante de medula óssea. As terapias específicas, tais como a terapia de substituição enzimática (TSE), a terapia de redução do substrato (TRS), a terapia génica ou a terapia de activação mediada por *chaperones* farmacológicos, actuam directamente sobre a causa da doença intervindo sobre o substrato acumulado ou sobre a enzima ou gene mutados (Desnick, 2004; Beck, 2007). Estas abordagens terapêuticas são ilustradas na

Figura 3.

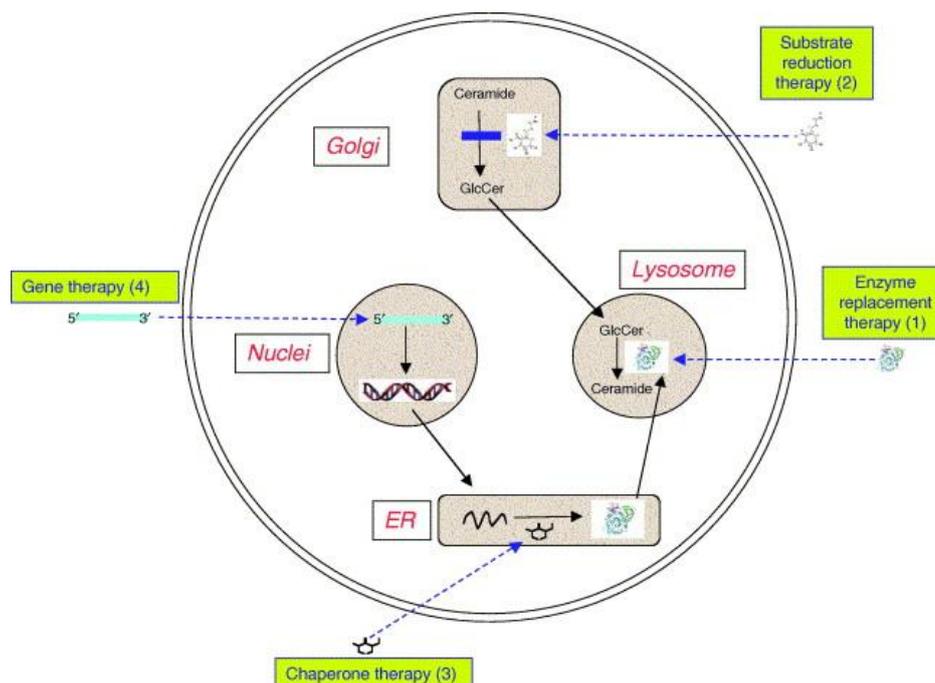


Figura 3. Potenciais abordagens terapêuticas em DLS. A figura ilustra uma DLS específica, a doença de Gaucher que é caracterizada pela acumulação de GlcCer. Figura extraída de (Kacher e Futerman, 2006).

Terapia de substituição enzimática

A TSE consiste no fornecimento exógeno da enzima de origem recombinante através de repetidas infusões intravenosas ao longo da vida do doente. Actualmente, é o tratamento mais eficaz uma vez que leva a uma grande diminuição de acumulação de substrato em tecidos periféricos em virtude da substituição da enzima mutante pela enzima funcional recombinante. Tem, no entanto, a grande limitação de não atingir o sistema nervoso central pois a barreira hemato-encefálica restringe a passagem de moléculas de maiores dimensões, como é o caso das enzimas. No caso das Esfingolipidoses, este tipo de abordagem terapêutica encontra-se presentemente disponível para a doença de Gaucher e para a doença de Fabry (Wilcox, 2004).

Terapia de redução do substrato

Esta abordagem terapêutica tem por base a diminuição da acumulação do substrato não degradado, por inibição parcial da sua biossíntese. Esta terapia bloqueia eficazmente o desenvolvimento da doença no modelo animal de Tay-Sachs (Platt *et al.*, 1997), Sandhoff (Jeyakumar *et al.*, 1999), Fabry (Abe *et al.*, 2000) e Niemann-Pick tipo C (Zervas *et al.*, 2001). A TRS encontra-se aprovada na Europa para o tratamento da Doença de Gaucher desde 2002 (Cox *et al.*, 2000; Elstein *et al.*, 2004). No caso da Doença de Niemann-Pick tipo C, a TRS não corrige a acumulação de colesterol não esterificado, mas inibe a síntese do gangliósido G_{M2} corrigindo, assim, a acumulação secundária deste GSL (Patterson *et al.*, 2010). A potencialidade desta abordagem terapêutica é ampla, podendo ser aplicada a outras Esfingolipidoses ou, ainda, a outras DLS desde que a inibição da via biossintética contribua para a normalização, pelo menos parcial, do nível do substrato e/ou de outras moléculas com relevância fisiopatológica (Futerman e van Meer, 2004).

Terapia génica

A terapia génica tem potencial para constituir uma resolução das DLS ao prover uma fonte endógena da enzima activa, dado que consiste no fornecimento de uma cópia normal do gene que se encontra mutado. Esta abordagem terapêutica encontra-se, ainda, em fase de ensaios clínicos em modelos animais (Futerman e van Meer, 2004) e em humanos (MPSIII, Michel Zerah, 2011, comunicação pessoal). A sua potencialidade reside no facto das DLS serem maioritariamente doenças monogénicas e um pequeno aumento de actividade enzimática acima da actividade residual ser, teoricamente, suficiente para reverter as alterações fenotípicas (Futerman e van Meer, 2004).

Terapia mediada por chaperones

A terapia mediada por *chaperones* farmacológicos fundamenta-se na associação reversível de ligandos específicos de baixo peso molecular às proteínas, com o propósito de as estabilizar e assegurar o seu transporte correcto até ao lisossoma (Ellgaard e Helenius, 2001). Em algumas Esfingolipidoses, a deficiência enzimática resulta, em parte, da propensão da enzima mutante para adquirir uma estrutura tridimensional incorrecta que compromete o seu transporte para o compartimento celular nativo. Consequentemente, estas proteínas são, geralmente, retidas no RE e degradadas prematuramente. O uso de *chaperones* químicos, que se ligam à proteína mutante permitindo a recuperação da sua conformação nativa restitui, pelo menos parcialmente, o seu transporte adequado e a função biológica. Assim, estas moléculas têm sido usadas como “activadores” nas DLS de armazenamento lipídico, originando um aumento da actividade enzimática acima do nível residual, o qual é suficiente para produzir a reversão, pelo menos parcial, de sinais e sintomas específicos da doença (Kacher e Futerman, 2006). A terapia mediada por *chaperones* demonstrou resultados pré-clínicos promissores em pelo menos 4 deficiências enzimáticas: β -glucosidase (Sawkar *et al.*, 2002), β -galactosidase (Matsuda *et al.*, 2003), α -galactosidase A (Fan e Ishii, 2007) e β -hexosaminidase A (Tropak *et al.*, 2004).

1.4. Doença de Niemann-Pick

A Doença de Niemann-Pick (NPD) é uma doença autossômica recessiva (MIM: 607608), descrita pela primeira vez nos finais dos anos 20 por Albert Niemann e Pick Ludwig. Tal como outras DLS, é uma doença rara e mundialmente dispersa (Cho *et al.*, 2009; Rodriguez-Pascau *et al.*, 2009). Presentemente, a NPD é classificada em dois grupos distintos: Tipos A e B, resultantes da deficiência enzimática da aSMase (EC 3.1.4.12) e subsequente acumulação de SM em diferentes tecidos; Tipo C, resultante da deficiência da proteína NPC1 ou NPC2, responsável pelo efluxo lisossomal de colesterol não esterificado (Kolter e Sandhoff, 1999). A descrição original da doença de Niemann-Pick refere-se às duas variantes clínicas da doença conhecidas actualmente por NPD-A (MIM: 257200) e NPD-B (MIM: 607616), ambas caracterizadas, no entanto, pela deficiência na mesma enzima, a aSMase.

Do Gene *SMPD1* à proteína esfingomielinase ácida

O gene *SMPD1* (esfingomielina fosfodiesterase 1, MIM:607608), que codifica a aSMase, abrange uma região com cerca de 6 kb no cromossoma 11p15.1-11p15.4 (da Veiga Pereira *et al.*, 1991) e é constituído por 6 exões e 5 intrões. O exão 2 é particularmente longo codificando 258 aminoácidos que representam cerca de 44% do polipéptido maduro (Schuchman *et al.*, 1992). Dos 2 transcritos produzidos por *splicing* alternativo, apenas um deles origina uma proteína funcional com 629 aminoácidos (Quintern *et al.*, 1989; Schuchman *et al.*, 1991).

A biossíntese da aSMase inicia-se nos ribossomas do RE e o polipéptido é transportado co-translacionalmente para o lúmen do RE por remoção da sequência sinal N-terminal. O prepolipéptido de 75-kDa é convertido na forma precursora de 72-kDa, a partir da qual é produzida a proteína de 70-kDa (forma lisossomal) e a proteína de 57-kDa (forma menos abundante) (Hurwitz *et al.*, 1994). O transporte da proteína para o lisossoma pode ocorrer pela via dependente de manose-6-fosfato (M6P). No entanto, resultados de estudos efectuados em células de doentes com Mucopolidose tipo II (Doença I-Cell, deficiência na biossíntese do marcador M6P) sugerem a existência de vias de transporte alternativas independentes do marcador M6P (Lee *et al.*, 2002). Na Mucopolidose tipo II, a deficiência

enzimática em N-acetilglucosamina 1-fosfotransferase impede a fosforilação de resíduos específicos de manose do N-oligosacárido das glicoproteínas lisossomais. Subsequentemente, a inexistência nas glicoproteínas lisossomais de resíduos M6P impede a sua ligação aos receptores da M6P localizados na rede trans do CG e posterior transporte para os endossomas tardios onde a diminuição do pH favorece a dissociação do complexo. Neste contexto, a observação de aSMase lisossomal madura em células I-Cell sugerem o seu transporte para o lisossoma por uma via independente da M6P. Recentemente, foram identificadas duas proteínas receptoras de proteínas lisossomais, a sortilina e a LIMP-2. A sortilina tem sido associada ao tráfego intracelular das proteínas activadoras dos SLs, as SAPs, da proteína activadora do GM₂ (Lefrancois *et al.*, 2003), e da aSMase (Ni e Morales, 2006), enquanto que a LIMP-2 foi relacionada com o transporte da glucocerebrosidase (Reczek *et al.*, 2007; Balreira *et al.*, 2008).

A forma lisossomal da aSMase é activa a valores de pH típicos do sistema endossomal-lisossomal e é uma metaloenzima que contém zinco. Vários estudos sugerem que esta enzima é activada por fosfatidilinositol e pelo ácido bislisofosfatídico mas inibida por derivados fosforilados de fosfatidilinositol (Jenkins *et al.*, 2009).

Variantes clínicas de NPD

A variante NPD-A (MIM: 257200) é uma doença fatal particularmente frequente em indivíduos de ascendência judaica Ashkenazi (Langlois e Wilson, 2006). Os primeiros sintomas ocorrem durante os primeiros anos de vida, entre os 3 e 9 meses de idade, e normalmente inclui hepatoesplenomegalia que é observada geralmente aos 3 meses de idade. O desenvolvimento psicomotor é normal até um ano de idade, mas posteriormente observa-se uma deterioração neurológica progressiva sendo geralmente detectada uma mancha vermelho-cereja na retina. A doença intersticial pulmonar resulta do armazenamento de SM nos macrófagos pulmonares, e manifesta-se sob a forma de infecções respiratórias frequentes ou mesmo pela falência pulmonar. A morte ocorre prematuramente, em geral antes do terceiro ano de vida

A variante NPD-B (MIM: 607616) é caracterizada por um quadro clínico mais moderado, de início mais tardio e evolução mais lenta e, geralmente, não se observa envolvimento neurológico. Assim, o desenvolvimento da esplenomegalia é progressivo, a disfunção

hepática mantém-se estável apesar da hepatomegalia, sendo também mais gradual a deterioração da função pulmonar e a evolução do perfil lipídico aterogénico. Apesar de pouco frequente, é possível observar envolvimento neurológico que, contudo, está associado a uma esperança de vida normal. Este subtipo apresenta uma maior frequência na região do Magrebe, do Norte de África e Arábia Saudita, e em indivíduos de ascendência Turca (Simonaro *et al.*, 2002).

Para além das variantes clássica A e B, podem-se observar fenótipos intermédios que se caracterizam pela apresentação de sintomas comuns às variantes da doença clássica (Ferlinz *et al.*, 1995; Pavlu e Elleder, 1997; Pavlu-Pereira *et al.*, 2005; Wasserstein *et al.*, 2006).

Diagnóstico

Apesar dos sinais e sintomas da doença surgirem geralmente durante a infância e a adolescência, o diagnóstico nem sempre é estabelecido na fase inicial da doença devido à raridade da doença e ao facto das primeiras manifestações clínicas serem comuns a outras patologias, o que dificulta a sua avaliação clínica. Desta situação decorre que o diagnóstico é geralmente efectuado numa fase tardia em que já se observa um comprometimento da função de órgãos sistémicos (Gieselmann, 2005), o que conduz a uma maior morbilidade e a uma redução da eficácia das terapias. Por isso, é importante que o diagnóstico seja estabelecido o mais precocemente possível (Desnick, 2004).

Clinicamente, a suspeita da variante NPD-A deve ser considerada na presença dos seguintes sintomas: hepatoesplenomegalia, evidências de envolvimento intersticial pulmonar, atraso de desenvolvimento psicomotor e detecção da mancha vermelho-cereja na retina. No caso da variante NPD-B os sinais sugestivos da doença incluem: hepatoesplenomegalia, doença intersticial pulmonar, hiperlipidemia e trombocitopenia.

A suspeita clínica deverá ser confirmada laboratorialmente através da realização de testes bioquímicos e/ou moleculares. Em geral, o diagnóstico laboratorial consiste, inicialmente, na realização de análises bioquímicas que visam o estudo da actividade enzimática da aSMase, a qual se encontrará significativamente reduzida se a enzima estiver ausente ou apresentar uma mutação que comprometa a função catalítica. Os

testes genéticos moleculares visam, geralmente, a identificação do genótipo do doente, representando simultaneamente um método confirmativo do resultado do teste bioquímico e uma estratégia para obter informação quanto à existência de portadores (indivíduos heterozigóticos) nas famílias em risco para a patologia.

Testes genéticos enzimáticos

O ensaio enzimático é efectuado visando a demonstração ou exclusão da deficiência enzimática de aSMase. Embora a expressão dos genes não se manifeste igualmente em todas as células do organismo, a facilidade de obtenção da amostra condiciona, em muitos casos, o material biológico a utilizar no estudo da actividade enzimática. No diagnóstico pós-natal, recorre-se, na maioria dos casos, a amostras de leucócitos totais ou de linfócitos obtidos a partir de sangue total heparinizado, ou a amostras de fibroblastos cultivados obtidos por biópsia da pele. No diagnóstico pré-natal usam-se células cultivadas do líquido amniótico obtido por punção transabdominal (Wraith, 2002).

A determinação da actividade enzimática pressupõe a sua extracção, isto é, a solubilização da enzima na solução usada para a lise de um sedimento celular ou de uma amostra do tecido a estudar. Esta etapa deve ser previamente otimizada quanto à composição, pH e força iónica da solução de lise, os quais variam com o tipo de amostra biológica e com a natureza da enzima que se pretende estudar. Adicionalmente, outros parâmetros devem ser também otimizados, nomeadamente o volume da solução usada na suspensão dos sedimentos celulares que varia, normalmente, entre 5-15 vezes o peso do material a extrair. Diluições muito elevadas do extracto podem acarretar a desnaturação das proteínas pelo que, frequentemente, se adiciona albumina sérica bovina (BSA) quando a concentração proteica é inferior a 0.2mg/ml. Por outro lado, a utilização de baixos volumes da solução de lise pode diminuir o rendimento do processo de extracção. Se a enzima a estudar é hidrossolúvel, utiliza-se água ou soluções aquosas tamponadas a um valor de pH próximo do pH de estabilidade máxima da enzima. Os iões constituintes do tampão não devem, evidentemente, interferir com a actividade enzimática. Se a enzima não é facilmente solúvel em água, como é o caso das enzimas membranares, recorre-se à utilização de detergentes nas soluções de lise. O triton X-100 é o detergente frequentemente usado com este fim, mas a escolha de um detergente apropriado pode constituir um problema complexo, principalmente nos casos em que a

sua eliminação posterior é necessária para a determinação da actividade enzimática. De facto, em muitos casos, os detergentes conduzem à produção de artefactos decorrentes, nomeadamente, da decomposição da proteína e/ou alteração profunda da estrutura da membrana. Com o aumento da concentração do detergente, formam-se complexos proteína-detergente-lípido que se mantêm em solução, mas a partir duma certa concentração do detergente formam-se complexos proteína-detergente livres de lípidos. No caso de proteínas membranares, o grau de desagregação lipídica pode condicionar a actividade enzimática. Para promover a “extracção” da enzima podem ser usados vários métodos: sonicação e extracção por congelação/descongelação. Na sonicação, as vibrações, originam, ao propagar-se no extracto, compressões e rarefacções periódicas, que se traduzem, se a potência for suficiente, na formação de bolhas microscópicas (cavitações); o desaparecimento instantâneo destas "cavidades" conduz a variações de pressão que desagregam células e estruturas sub-celulares.

Em geral, a determinação da actividade de uma enzima efectua-se medindo a velocidade de uma reacção por ela catalisada, por exemplo, através da determinação da velocidade de formação de um produto da reacção. Este conceito está implícito na cinética de Michaelis-Menten:



Neste modelo, a catálise ocorre através da formação rápida e reversível de um complexo entre a enzima e o substrato. Do ponto de vista cinético, apenas o passo da formação do complexo ES é reversível, sendo o passo da libertação do produto formado com regeneração da enzima, um passo irreversível.

No caso de preparações puras de enzima, a velocidade da reacção pode exprimir-se por peso ou número de moléculas da enzima (se o seu peso molecular é conhecido). Se a preparação de enzima não é pura, como acontece habitualmente, a velocidade pode referir-se à quantidade de amostra biológica em que ela é determinada. Assim, quando se utilizam fragmentos de tecidos, a actividade da enzima pode referir-se ao peso de tecido utilizado, e as actividades enzimáticas de extractos de células, podem exprimir-se em função do número de células da amostra, ou mais correntemente, em função da concentração de proteína total do extracto (Merrill, 2000).

No caso da aSMase, o ensaio enzimático mais amplamente realizado utiliza o substrato natural marcado com um radioisótopo: a esfingomiéline bovina marcada com ^{14}C na metilcolina (^{14}C -SM) (Vanier *et al.*, 1980). A substituição do substrato natural radioactivamente marcado por um substrato artificial, no ensaio enzimático *in vitro*, apesar de atractiva em termos de exequibilidade laboratorial e de custos, pode não equivaler-se em termos de sensibilidade nos casos em que a aSMase mutante apresenta uma actividade pseudo-normal, isto é, uma actividade enzimática normal *in vitro* e uma actividade enzimática reduzida para níveis patológicos *in vivo*. Até à data, a actividade de aSMase pseudo-normal foi unicamente reportada em doentes que apresentavam a mutação Q292K em pelo menos um dos alelos (Harzer *et al.*, 2003).

Testes genéticos moleculares

Os testes genéticos moleculares visam a caracterização do genótipo dum indivíduo através da identificação das mutações presentes no DNA. No caso dum doente com NPD, os testes genéticos não só possibilitam a confirmação do resultado do teste enzimático como também permitem estabelecer se o doente é homocigótico ou composto heterocigótico e orientar a estratégia de estudo dos seus progenitores e outros familiares. De facto, os testes bioquímicos não permitem a identificação de portadores assintomáticos, isto é, indivíduos que herdaram apenas uma cópia do gene mutado. Nestes casos, os testes genéticos moleculares permitem a identificação dos indivíduos heterocigóticos (portadores da doença). Adicionalmente, facultam informação relevante para a análise da correlação genótipo-fenótipo, aconselhamento genético familiar e para o estudo da epidemiologia molecular da doença (Levrán *et al.*, 1991; Simonaro *et al.*, 2002).

O conhecimento sobre a existência de mutações prevalentes na população em estudo é importante na medida em que permite adoptar uma estratégia laboratorial adaptada ao grau de heterogeneidade molecular observada nessa população e, por isso, uma metodologia de diagnóstico mais eficaz, mais rápida e economicamente mais atractiva. No caso de existirem mutações prevalentes na população em estudo, a estratégia geralmente adoptada baseia-se no rastreio inicial dessas alterações por métodos correntes de biologia molecular, tais como PCR-RFLP ou PCR-alelo específico. Um

segundo nível de análise consiste na sequenciação cíclica e automática do DNA ou do cDNA. No caso da NPD-A e NPD-B, dada a considerável heterogeneidade alélica que se observa no *locus SMPD1*, inclusivamente na população portuguesa (Simonaro *et al.*, 2002), normalmente opta-se, numa primeira abordagem de estudo, pela sequenciação automática dos exões e zonas intrónicas do gene.

Patogénese molecular

Até ao presente momento, foram publicadas mais de 100 mutações associadas ao gene *SMPD1* e causais da deficiência enzimática da aSMase (*Human Gene Mutation Database* e Simonaro *et al.*, 2002; Schuchman, 2007), incluindo mutações *missense*, *nonsense*, mutações *frameshift*, uma deleção *in-frame* de 3 nucleotídeos e uma mutação que altera o local de *splicing* (Levrán *et al.*, 1991; Levrán *et al.*, 1992; Vanier *et al.*, 1993; Simonaro *et al.*, 2002; Sikora *et al.*, 2003) (Figura 4). Estão também descritos vários polimorfismos no gene *SMPD1*, dos quais se destacam dois polimorfismos comuns, c.965C>T (p.T322I) e c.1516G>A (p.G506R), com uma frequência de 0.6 e 0.8, respectivamente (Schuchman *et al.*, 1991; Schuchman *et al.*, 1992).

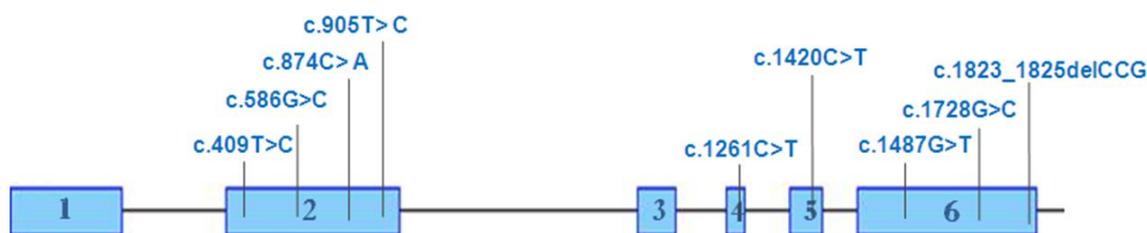


Figura 4. Distribuição das mutações mais frequentes do gene *SMPD1*. As mutações são apresentadas de acordo com as recomendações de (den Dunnen e Antonarakis, 2001), considerando o nucleótido +1 a adenina do primeiro codão de iniciação (NM 000543.2).

Na população de origem judaica Ashkenazi estão descritas três mutações, geralmente associadas à variante NPD-A, que foram identificadas em mais de 90% dos alelos mutados. Duas são mutações *missense*, c.1487G>T (p.R496L) e c.905T>C (p.L302P),

e a terceira, c.996delC (p.P330fs) (Levran *et al.*, 1991; Levran *et al.*, 1991; Levran *et al.*, 1992; Levran *et al.*, 1993), é uma deleção dum nucleótido que resulta numa alteração *frameshift* e subsequente introdução prematura dum codão de terminação no aminoácido 385. Em contraste com o que acontece neste grupo étnico, a NPD-A está geralmente associada a um padrão mutacional tipicamente familiar, o que revela uma considerável heterogeneidade genética no *locus SMPD1*.

No caso da variante NPD-B, a mutação mais frequente consiste na deleção de 3 pares de bases no exão 6, originando a remoção do resíduo de arginina que ocupa a posição 608 da proteína c.1823_1825delCCG (p.R608del) (Levran *et al.*, 1991). Esta mutação foi pela primeira vez descrita por Levran e colaboradores, em 1991, e está sempre associada ao tipo B da NPD. Esta mutação foi identificada em quase 90% dos alelos mutados de indivíduos da região do Magrebe, no Norte de África (Tunísia, Argélia e Marrocos) (Vanier *et al.*, 1993), em 100% dos doentes da Grande Canária (Fernandez-Burriel *et al.*, 2003), em 20-30% dos doentes americanos de ascendência africana (McGovern *et al.*, 2006). Na Europa, a sua frequência é relativamente reduzida, por exemplo, em Itália corresponde a 9.4% dos alelos mutados (Pittis *et al.*, 2004): No entanto, em Portugal foi identificada em cerca de 30% dos alelos mutados (resultados não publicados).

Em termos de relação genótipo/fenótipo, uma actividade enzimática de aSMase praticamente nula, tal como se observa no caso das mutações mais frequentes (p.R496L, p.L302P, p.P330fs) representativas de NPD-A, está associada a uma evolução rápida e fatal da doença, enquanto que uma actividade de aSMase residual, cerca de 10 % da actividade normal, tal como se observa em doentes NPD-B confere um fenótipo mais suave (Vanier *et al.*, 1985; Graber *et al.*, 1994; Simonaro *et al.*, 2002). Um fenótipo intermédio ao observado em doentes NPD-A e NPD-B tem sido descrito em doentes portadores da alteração c.874C>A (p.Q292K) (Pavlu e Elleder, 1997). Nestes casos, a alteração de citosina por adenina no nucleótido 874 do exão 2 origina a substituição da glutamina da posição 292 por lisina. Esta variante caracteriza-se clinicamente por défice cognitivo progressivo, incapacidade motora e/ou anomalias na retina (estas últimas tidas como representativas de doença neuropática) (Wasserstein *et al.*, 2006). A presença da alteração Q292K em homozigotia está associada a uma actividade residual de aSMase baixa mas significativa, o que permite explicar a progressão lenta da doença e o envolvimento neurológico. Contudo, em doentes heterozigóticos que apresentam no segundo alelo uma mutação típica de

NPD-A verifica-se uma progressão relativamente mais rápida da doença. Esta mutação não foi ainda identificada em nenhum doente português e os 14 doentes identificados até ao presente momento como portadores desta mutação, em homozigotia ou heterozigotia composta, são originários da Europa Central (Pavlu-Pereira *et al.*, 2005).

Dada a heterogeneidade genética que se observa no *locus SMPD1*, os estudos de expressão do gene são fundamentais para a demonstração da causalidade das mutações, uma vez que permitem estabelecer uma relação entre a alteração no gene e a sua consequência ao nível do mRNA e da proteína contribuindo, assim, para esclarecer o mecanismo molecular da patogenicidade dessas alterações. Contudo, até à data foram apenas efectuados estudos de expressão para um número reduzido de mutações (Dardis *et al.*, 2005; Desnick *et al.*, 2010).

Objetivos

2. Objectivos

A Unidade de Bioquímica Genética (UBQ) do Centro de Genética Médica Jacinto de Magalhães do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (CGMJM-INSA,IP) é um laboratório de referência no diagnóstico bioquímico e molecular, pós-natal e pré-natal, de doenças hereditárias do metabolismo, incluindo as DLS.

O diagnóstico das DLS, incluindo as Esfingolipidoses, é geralmente efectuado através de testes bioquímicos que utilizam substratos artificiais, uma vez que estes testes são robustos, tecnicamente simples, rápidos e pouco dispendiosos. No entanto, podem apresentar a desvantagem de produzir resultados falso-negativos, isto é, uma actividade enzimática normal *in vitro* correspondente a uma actividade enzimática *in vivo* reduzida para níveis compatíveis com a disfunção lisossomal. Contudo, é geralmente aceite que as vantagens técnicas destes testes compensam o risco de perder um diagnóstico dado que estas situações são, aparentemente, raras.

Tal como para a maioria das DLS, a identificação de doentes NPD-A e NPD-B pode ser efectuada através de testes enzimáticos *in vitro* recorrendo a substratos sintéticos. No entanto, o teste mais amplamente utilizado não distingue uma actividade de aSMase pseudo-normal, podendo originar resultados falso-negativos. No sentido de contribuir para a melhoria da qualidade do diagnóstico desta patologia e, subsequentemente, para a sua prevenção na população portuguesa, o presente trabalho tem por objectivo a implementação laboratorial e validação de um ensaio enzimático não-radioactivo para a aSMase, descrito originalmente por van Diggelen e colaboradores (2005), e que permite a identificação de doentes portadores da variante pseudo-normal com uma sensibilidade e especificidade comparáveis à do ensaio enzimático radioactivo, mas com a vantagem de ser tecnicamente mais simples, mais rápido e menos dispendioso.

Material e Métodos

3. Material e Métodos

3.1. Amostras Biológicas

No presente trabalho foram utilizadas amostras de fibroblastos cultivados (obtidos a partir de biopsia de pele), amniócitos cultivados (obtidos a partir de líquido amniótico colhido por punção transabdominal) e leucócitos totais (obtidos a partir de sangue periférico heparinizado) de indivíduos saudáveis e de doentes previamente caracterizados. As características clinicopatológicas e o genótipo dos doentes com NPD-A e NPD-B incluídos no presente trabalho estão resumidas na Tabela 2.

Leucócitos

As amostras de leucócitos, representativas de 23 indivíduos saudáveis, foram obtidas a partir de sangue total proveniente do banco de doadores de sangue do Instituto Português de Sangue. Como controlos positivos de NPD-B foi usada uma linha celular existente no banco de células do IGMJM (D5 da Tabela 2). De referir que não foi possível obter leucócitos do caso 7, único doente representativo da variante Q292K.

Fibroblastos

Para a realização deste trabalho foram utilizadas células cultivadas e crioconservadas em azoto líquido. Como controlos negativos foram estudadas 5 linhas celulares de voluntários saudáveis pertencentes ao banco de células do CGMJM-INSA, IP. Dada a dificuldade na obtenção de amostras de fibroblastos, foram estudadas 15 linhas celulares pertencentes a indivíduos com suspeita de doença metabólica, que deram entrada na UBQ do CGMJM-INSA, IP, mas cujo estudo laboratorial não confirmou a suspeita de DLS. Como controlos positivos da enzima mutante foram utilizadas 4 linhas celulares de doentes com diagnóstico de NPD-A e NPD-B, também provenientes do banco de células do CGMJM-INSA, IP (D1, D2, D4 e D6 da Tabela 2) previamente caracterizadas na UBQ

e uma linha celular (D7 da Tabela 2, variante Q292K) gentilmente cedida pelo *Department of Clinical Genetics, Erasmus University Medical Center, Rotterdam*.

Amniócitos

Neste trabalho foram estudadas 30 linhas celulares correspondentes a controlos negativos, gentilmente cedidas pela Unidade de Citogenética do Hospital de Vila Real. Estas amostras foram provenientes de colheitas de líquido amniótico, realizadas por idade materna avançada ou por suspeita de alterações cromossómicas sem que, contudo, tivessem sido identificadas alterações no âmbito da análise citogenética efectuada. Como controlo positivo, foi usada uma linha celular proveniente do banco de células do CGMJM-INSA, IP (D3 da Tabela 2).

Tabela 2 - Descrição sumária dos doentes de Niemann-Pick incluídos no estudo.

Doente	Subtipo clínico	Sexo	Enzima mutante	
			cDNA	Proteína
D1	A	M	[c.1135T>C]+[c.1445C>A]	[p.S379P]+[p.A482E]
D2	A	M	[c.1235_8delTTCAinsAGCTCCAGT] +[c.1445C>A]	[p.E409fs]+[p.A482E]
D3	A	F	[c.1235_8delTTCAinsAGCTCCAGT] +[c.1445C>A]	[p.E409fs]+[p.A482E]
D4	B	F	[c.1420C>T]+[c.1420C>T]	[p.R474W]+[p.R474W]
D5	B	M	[c.1823_1825delCCG]+[c.1823_1825delCCG]	[p.R608del]+[p.R608del]
D6	B	M	[c.1823_1825delCCG]+[c.1823_1825delCCG]	[p.R608del]+[p.R608del]
D7	A/B	ND	[c.874C>A]+[?]	[p.Q292K]+[?]

ND- não disponível; [?]- mutação desconhecida

3.2. Substratos

Para a determinação da actividade da aSMase foi usado o substrato artificial 6-hexadecanoilamino-4-metilumbeliferilfosforilcolina (6HMU-PC; Moscerdam, Holanda), o substrato natural lisoesfingomielina (LSM, D-eritroesfingosina-fosfocolina; Avanti, Alabaster, USA) e o substrato natural radioactivamente marcado (^{14}C -SM; PerkinElmer, USA).

3.3. Procedimento experimental

Separação diferencial de leucócitos

Os leucócitos totais foram isolados a partir de sangue periférico por sedimentação diferencial em meio denso isotónico (dextran) (Skoog e Beck, 1956; Magalhaes *et al.*, 1984). Os eritrócitos contaminantes foram removidos por lise hipotónica e os leucócitos foram de seguida lavados com cloreto de sódio a 0,9% (p/v). Os sedimentos celulares obtidos por centrifugação foram conservados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até à sua utilização.

Culturas celulares de fibroblastos e amniócitos

Os fibroblastos de pele crioconservados foram cultivados em meio completo (MEM, Dullbecco's, Gibco, Reino Unido), suplementado com 10% soro vitelo fetal (SVF, Lonza, Bélgica) com antibióticos (10000 U/ml de estreptomicina e penicilina, Gibco, Reino Unido; 125 mg/ml de kanamicina, Biological Industries, Israel), e anti-fúngicos (1250 $\mu\text{g/ml}$ de fungizona, Gibco, Reino Unido). As células foram incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ em atmosfera húmida e com 5 % (v/v) de CO_2 . O meio de cultura foi renovado regularmente e a cultura foi expandida até à densidade celular necessária para efectuar os estudos analíticos.

Após remoção do meio de cultura, as células aderentes foram lavadas com PBS (137 mM cloreto de sódio, 1.1 mM dihidrogenofosfato de sódio, 6.4 mM monohidrogeno-fosfato de potássio, 2.7 mM cloreto de potássio, pH 7.4). A adesão celular foi interrompida por adição de tripsina (Gibco, Reino Unido). De seguida, as células foram lavadas e

peletizadas por centrifugação (Centrífuga Megafuge 1.0R, Heraeus Instruments, Alemanha). O sedimento celular foi conservado a -20 °C até à sua utilização.

Preparação dos lisados celulares

Após solubilização do sedimento celular em água, procedeu-se à ruptura celular para libertação do conteúdo intracelular por ultra-sons (sonicador Weat system W 375), a 4 °C, através da aplicação de vibrações de alta frequência (20 KHz) por 30 ciclos de 0.6 segundos a 50 W, com pausas de 0.4 segundos.

Caracterização mutacional

Na análise genotípica da linha celular D7, procedeu-se à amplificação de regiões específicas do gene *SMPD1* a partir de DNA genómico (gDNA) obtido por extracção automática em *Bio Robot EZ1* (Quiagen), utilizando o Kit comercial de extracção *EZ1 DNA Blood* (Quiagen) de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. A concentração e o grau de pureza do gDNA foram determinados por quantificação em espectrofotómetro UV-Vis NanoDrop ND-1000.

O gDNA foi amplificado por PCR utilizando os seguintes oligonucleótidos: *SMPD1-1285s_ GCAGAGGCTCACCTCTTTC*; *SM391dn_ CAGCGCACCAGCATCAGC*. Para a reacção de amplificação foi usada a mistura comercial *ImmoMix Red 2x* (Bioline). Esta mistura contém DNA polimerase *Immolase™*, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Tween 20, MgCl_2 , dNTPs e tampão Tris-HCl. A 12.5 µl desta mistura adicionou-se 1 µl de cada oligonucleótido (*Forward* e *Reverse*) a uma concentração de 10 pmol/µl, 1 µl de gDNA (50 ng/µl) e 9,5 µl de água para um volume final de 25 µl.

Após electroforese em gel de agarose a 2%, em tampão TAE 1X (Invitrogen), onde se aplicou 4 µl de produto amplificado e um marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas), o fragmento de PCR amplificado foi visualizado através de um transiluminador de luz ultra-violeta e a sua migração comparada com a migração da banda correspondente do marcador de peso molecular.

O produto de PCR foi purificado através de um método enzimático usando o *Kit ExoSap-IT®*, de forma a eliminar os oligonucleótidos e desoxirribonucleótidos não incorporados. O procedimento consistiu na adição de 2 µl de *ExoSap-IT®* a cada 5 µl de produto de PCR, incubação a 37 °C durante 15 min, seguida de uma incubação de 15 min a 80 °C para inactivação das enzimas.

Para a preparação da reacção de sequenciação automática utilizou-se uma mistura comercial *BigDye® Terminator Cycle Sequencing kit 2.0* (ABI PRISM, PE Applied Biosystems), que contém MgCl₂, dNTPs, ddNTPs marcados com 4 fluorocromos distintos, tampão e uma *AmpliTaq DNA Polimerase*. A 2 µl desta mistura adicionou-se 0.65 µl de primer (*Forward* ou *Reverse*) a 1.6 pmol/µl, 2 µl de produto de PCR purificado e água para um volume final de 10 µl. A amplificação foi efectuada com o programa que inclui uma desnaturação inicial de 3 min a 96 °C, seguido de 25 ciclos de 10 segundos a 96 °C, 5 segundos a 50 °C e 4 min a 60 °C, no termociclador *TPersonal* (Biometra). O produto obtido após PCR de sequenciação foi purificado em coluna com resina *Sephadex 7%* (GE Healthcare) de forma a eliminar os dNTPs e ddNTPs não incorporados e também sais que pudessem interferir com a electroforese capilar. O procedimento inicia-se com uma centrifugação de 3520 g durante 4 min (Centrifuga Biofuge Pico, Heraeus) para retirar o excesso de água da resina, de seguida adiciona-se a amostra à resina e centrifuga-se novamente a 3520 g durante 4 min (Centrifuga Biofuge Pico, Heraeus). Deixa-se secar durante 15 min a 80 °C e ressuspende-se com 20 µl de *Hi-Di Formamida Desionizada* (Applied Biosystems) por agitação no *vortex* e dissolução completa à temperatura ambiente durante 10 min. A análise do fragmento foi realizada por electroforese capilar no sequenciador automático *ABI PRIS3130xl* (Applied Biosystems) e os resultados foram analisados no programa *Chromas* versão 2.3.

Quantificação da proteína

A quantificação da proteína total dos lisados celulares foi efectuada de acordo com o método colorimétrico originalmente descrito por Lowry (Lowry *et al.*, 1951) com algumas modificações (Herbert *et al.*, 1974). Este método recorre ao reagente de *Folin-Ciocalteus*, previamente descrito para o doseamento do fenol. O reagente é constituído por uma série de complexos de cor amarela (ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico) que,

quando reduzidos por aminoácidos com cadeias laterais aromáticas (fenilalanina, tirosina e triptófano), originam compostos de cor azul. Estes compostos corados apresentam um máximo de absorção a 750 nm, na região visível do espectro electromagnético, pelo que a sua absorvância, a esse valor de comprimento de onda de luz, foi determinada com o espectrofotometro Cary 50 Bio (Varian, USA). A concentração da proteína foi calculada por intrapolação numa curva de padrão de BSA (Sigma, Alemanha) em que a concentração de BSA foi expressa em mg/ml.

Determinação da actividade enzimática *in vitro*

Neste trabalho, a actividade enzimática da aSMase foi determinada por um método fluorimétrico (van Diggelen *et al.*, 2005) e por um método radioactivo (Vanier *et al.*, 1980).

Método fluorimétrico

Neste tipo de ensaio são usados compostos fluorescentes, que possuem electrões que podem ser excitados para um estado mais elevado pela absorção de luz de determinado comprimento de onda, emitindo luz com comprimento de onda maior que a absorvida. A fluorescência é a luz emitida pelos electrões excitados quando retornam ao estado basal.

Sumariamente, a actividade enzimática da aSMase foi determinada através de 2 ensaios de acordo com o procedimento previamente descrito (van Diggelen *et al.*, 2005). Um dos ensaios usa o substrato artificial 6HMU-PC (1.32 mM) e o outro ensaio utiliza para além desse substrato a LSM (8 mM) que actua, no ensaio, como inibidor competitivo da aSMase. A reacção consiste na adição de 10 ul de extracto celular (contendo 10 ug de proteína total no caso dos fibroblastos/amniócitos e 30 ug de proteína no caso de leucócitos), previamente obtido por sonicação em água, ao respectivo substrato. Os ensaios foram incubados a 37 °C durante 1 hora (fibroblastos) ou 17 horas (leucócitos). Após paragem da reacção por adição de tampão de glicinato de sódio a 0.2 mol/l e a pH 10.7, o nível de fluorescência (FI) libertada pela 4-MU, foi monitorizado num Fluorímetro Cary Eclipse (Varian, USA) usando um comprimento de onda de excitação e emissão de,

respectivamente, 365 nm e 445 nm, e comparado com o de soluções de 4-MU de concentração conhecida. A determinação da actividade da enzima β -galactosidase (enzima de referência) foi efectuada de acordo com um procedimento previamente descrito (Ho e O'Brien, 1971) para avaliação da qualidade da amostra. Todos os ensaios foram preparados em duplicado e a actividade enzimática foi calculada de acordo com a seguinte expressão: $((F_{\text{amostra}} - F_{\text{branco}})/\text{declive da recta padrão} \times \text{FDil/Tinc})/\text{Proteína (mg)}$.

Método radioactivo

O método consistiu na adição de 10 μl de extracto celular (contendo 2 μg de proteína total no caso dos fibroblastos/amniócitos e 20 μg de proteína no caso de leucócitos), obtido por sonicação em água, a 10 μl de ^{14}C -SM com uma concentração 300 μM de actividade específica de 66.5 $\mu\text{Ci/mg}$. Após evaporação em corrente de N_2 , procedeu-se à incubação da mistura de reacção durante 1 hora (fibroblastos e amniócitos) ou 2 horas (leucócitos), a 37 $^\circ\text{C}$. Após adição a cada tubo de 50 μl de BSA a 10% e de 500 μl de ácido tricloroacético 10% (p/v), centrifugou-se a 8400 g durante 3 min a 4 $^\circ\text{C}$ (Heraeus Biofuge 13). Transferiu-se 400 μl do sobrenadante para um tubo de cintilação e adicionou-se 5 ml de líquido de cintilação. Para leitura da radioactividade no contador β Tri-Carb 2910TR prepararam-se triplicados da amostra (20 μl de substrato em tubos de cintilação foi evaporado em corrente de azoto, colocado imediatamente em gelo e sujeito à adição de 380 μl de água e 10 ml de líquido de cintilação), um controlo negativo e um controlo interno. A actividade enzimática da aSMase, expressa em nmol/h/mg proteína, foi calculada através da seguinte expressão: $((\text{CPM}_{\text{amostra}} - \text{CPM}_{\text{branco}})/(\text{CPM}_{\text{substrato}} / \text{nmol substrato})) \times 1/\text{Tinc} \times \text{FDil} \times \text{Proteína (mg)}$.

Resultados e Discussão

4. Resultados e Discussão

A identificação pós-natal das DLS é efectuada, numa primeira abordagem laboratorial, através do estudo da actividade enzimática. Estes testes bioquímicos devem ser específicos e caracterizados por um nível de sensibilidade adequada, isto é, permitir a confirmação laboratorial de todos os indivíduos que são doentes. Os testes enzimáticos mais específicos e sensíveis são, normalmente, aqueles que utilizam o substrato natural. Contudo, dada a sua complexidade técnica, o elevado custo que lhes está associado e o facto de, normalmente, exigirem uma ampla experiência quanto à interpretação dos resultados obtidos, a sua substituição por ensaios com substratos artificiais é uma prática generalizada nos laboratórios que se dedicam ao estudo de doenças genéticas metabólicas. No entanto, no caso de mutações específicas estes ensaios poderão não apresentar um nível de sensibilidade adequado. De facto, no caso dos alelos comumente designados por pseudo-normais, os ensaios enzimáticos com substratos sintéticos conduzem à obtenção de um nível de actividade enzimática semelhante à da enzima de indivíduos saudáveis. Assim, apesar de rara, a presença destes alelos, em homozigotia ou heterozigotia composta, poderá dificultar seriamente o diagnóstico bioquímico da patologia. Esta situação está documentada na NPD no caso da variante alélica Q292K (Harzer *et al.*, 2003). Assim, no âmbito da presente secção, apresentam-se os resultados experimentais que foram obtidos visando a implementação dum ensaio enzimático fluorimétrico previamente descrito na literatura (van Diggelen *et al.*, 2005) para identificação de doentes NPD portadores da variante alélica Q292K.

4.1. Análise do gene *SMPD1*

No sentido de identificar o segundo alelo do controlo positivo (doente D7, Tabela 2), procedeu-se à amplificação e sequenciação do exão 2 do gene *SMPD1* a partir de gDNA do doente D7. A Figura 5 ilustra as regiões dos electroferogramas onde foram observadas alterações. De acordo com os resultados obtidos, o doente D7 é um heterozigótico composto para as mutações c.874C>A (p.Q292K) e c.567delT (p.P189fs) ambas previamente descritas na literatura (Pavlu e Elleder, 1997; Gluck *et al.*, 1998).

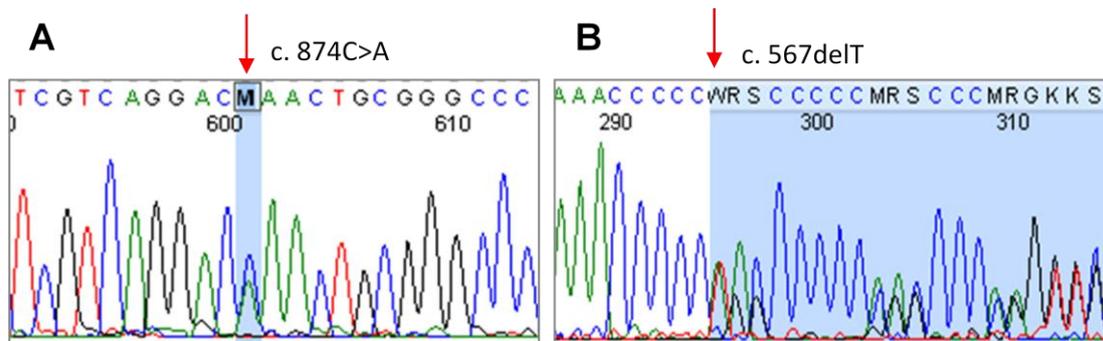


Figura 5. Caracterização molecular por sequenciação automática de produtos de PCR do doente D7. **(A)** Sequência parcial do exão 2 do gene *SMPD1* do doente D7, em que se evidencia a alteração na posição 874 a transversão C→A **(B)** Sequência parcial do exão 2 do gene *SMPD1* do doente D7, representativa da deleção de uma Timina na posição 567 da sequência de cDNA.

4.2. Estudo do estabelecimento da concentração óptima de inibidor LSM

No sentido de estabelecer a concentração de LSM a utilizar no ensaio enzimático procedeu-se à sua titulação utilizando como fonte de enzima lisados de fibroblastos controlo e do doente portador da variante Q292K. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 6.

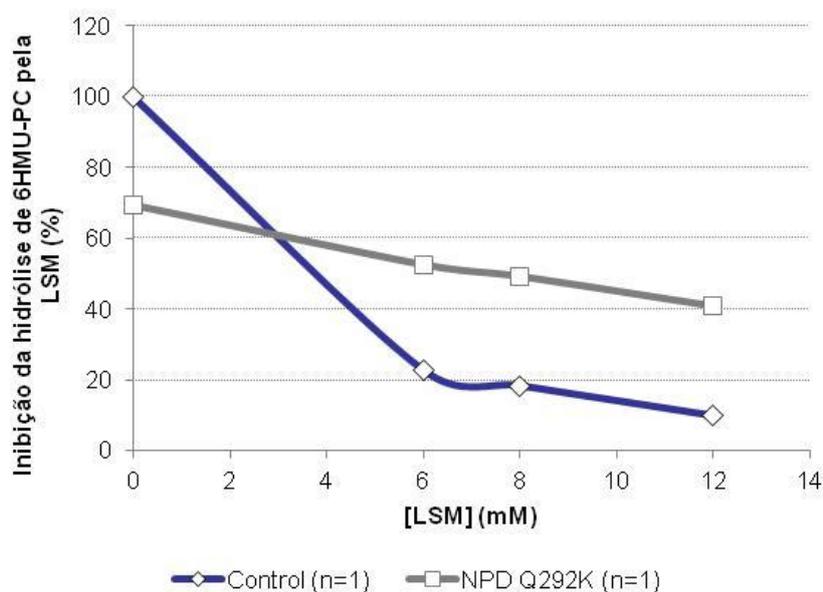


Figura 6. Curva de titulação para determinação da concentração óptima do inibidor LSM.

A análise da razão das actividades enzimáticas obtida na ausência e na presença do inibidor sugerem que a concentração de LSM correspondente a 12 mM é aquela que permite uma melhor distinção entre a actividade enzimática da enzima normal e da mutante Q292K. Contudo, numa concentração superior a 6 mM de inibidor a inibição de aSMase mutante é mínima e a inibição da actividade da aSMase normal é superior a 80%. Por isso, optou-se por uma concentração de LSM nos ensaios enzimáticos ligeiramente superior, de 8 mM. Este valor é o dobro do descrito no procedimento original (van Diggelen *et al.*, 2005), reflectindo provavelmente diferentes graus de pureza da substância que é adquirida comercialmente. Subsequentemente, a quantidade óptima de inibidor a usar nestes ensaios enzimáticos deverá ser reavaliada sempre que se proceda à aquisição de um novo lote de inibidor.

4.3. Estudo da actividade enzimática *in vitro* da aSMase

A metodologia original (van Diggelen *et al.*, 2005) descreve um ensaio enzimático efectuado em microplaca de 96 poços, tendo sido necessário efectuar adaptações para a sua execução em tubo, nomeadamente quanto ao volume da solução usada na paragem da reacção enzimática. O ensaio enzimático com o substrato sintético fluorogénico 6HMU-PC foi efectuado paralelamente na ausência e na presença do inibidor LSM, e as actividades enzimáticas analisadas individualmente ou na forma de razão, 6HMU-PC / 6HMU-PC-LSM. Procedeu-se ainda à análise comparativa desses resultados com os obtidos no ensaio enzimático com o substrato natural marcado com o isótopo radioactivo, ¹⁴C-SM. Os resultados obtidos no estudo de lisados de fibroblastos cultivados, leucócitos e amniócitos são a seguir apresentados e discutidos. De referir que em todas as amostras foi determinada a actividade da enzima lisossomal β -galactosidase. A análise comparativa do nível de actividade desta enzima, em amostras de indivíduos controlo e de doentes, permite, excluir resultados de falsos positivos resultantes de condições inadequadas de conservação da amostra que originem proteólise, ineficiente lise celular, ou ainda duma eventual inadequação dos equipamentos e/ou erros de execução técnica, pelo que representa um procedimento de boa prática em laboratórios de estudo da função lisossomal.

Estudo da actividade residual da aSMase em Fibroblastos

Os resultados obtidos no estudo de 20 amostras de indivíduos saudáveis (controlos) e 5 amostras de doentes NPD (D1, D2, D4, D5 e D7, da Tabela 2), um dos quais composto heterozigótico para o alelo Q292K (D7), são apresentados das Figuras 7 à 9.

A Figura 7 mostra ainda os valores de actividade enzimática da aSMase obtidos com o substrato fluorogénico sintético, o 6HMU-PC, na ausência e na presença do inibidor, a LSM.

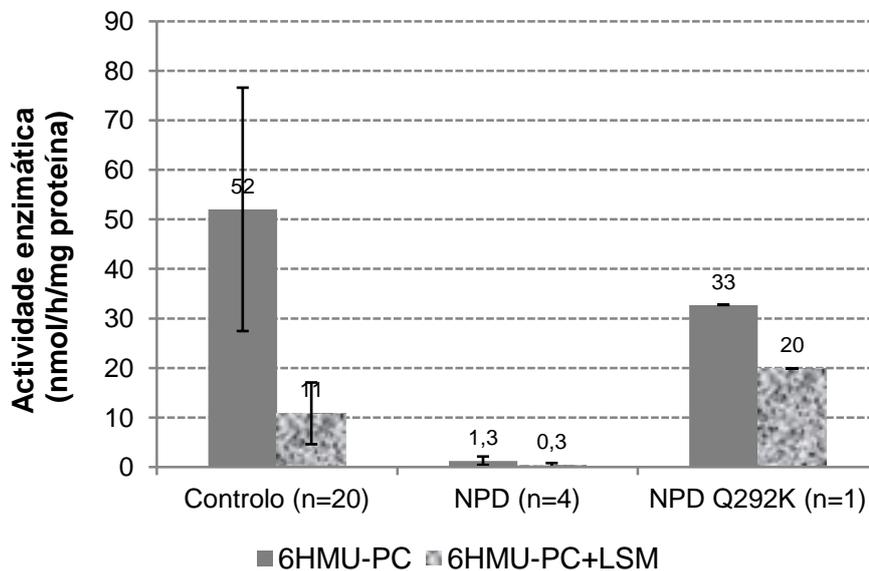


Figura 7. Actividade enzimática da aSMase em lisados de fibroblastos humanos cultivados, quando determinada com o substrato sintético fluorogénico 6HMU-PC, na ausência e na presença do inibidor, a LSM. A actividade enzimática, foi determinada de acordo com os procedimentos descritos na secção Material e Métodos, expressa em nmol/h/mg proteína e representada na forma de média \pm desvio padrão para $n \geq 3$. Os valores médios observados estão identificados sobre as barras.

A actividade enzimática da aSMase observada em doentes com NPD-A e NPD-B, é claramente distinta do grupo controlo quando determinada na presença ou na ausência do inibidor; no entanto os valores das actividades enzimáticas observados na amostra do doente NPD Q292K (D7), não se distinguem do intervalo de valores obtidos para a população controlo (Figura 7). O valor da razão entre as actividades 6HMU-PC / 6HMU-PC-LSM, permite obter uma clara distinção entre o doente portador do alelo Q292K e a

gama de valores observada para as amostra controlo (Figura 8), apresentando na maioria dos casos um valor médio de razão intermédio entre a média dos controlo e a média dos doentes NPD-A e NPD-B (não portadores de Q292K).

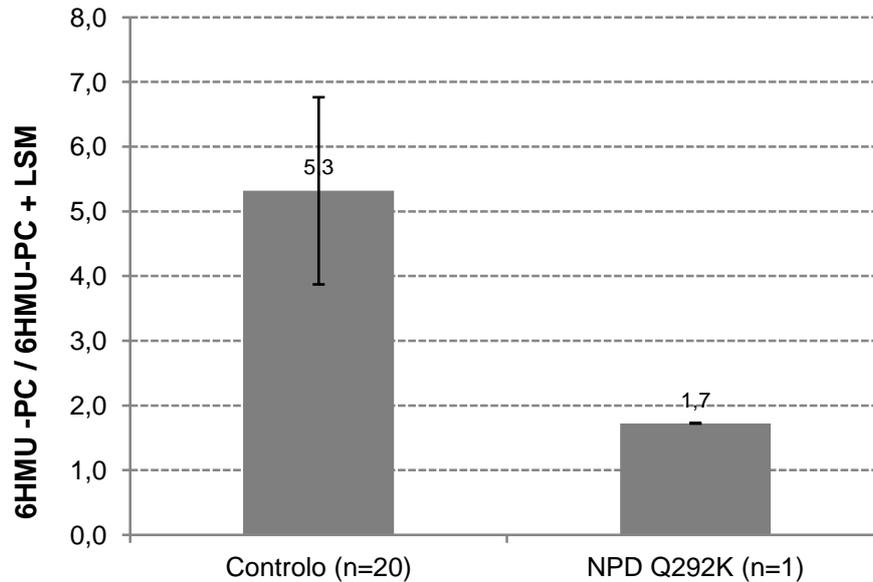


Figura 8. Razão das actividades enzimáticas da aSMase obtidas na presença (6HMU-PC+LSM) ou ausência (6HMU-PC) do inibidor competitivo LSM em lisados de fibroblastos humanos cultivados. Os resultados estão representados na forma de média \pm desvio padrão para $n \geq 3$. Os valores médios observados estão identificados sobre as barras.

A determinação da actividade enzimática da aSMase com o substrato natural, (Figura 9), mostrou, como seria de esperar, que todos os doentes NPD, independentemente do seu genótipo, apresentam uma actividade residual de valor claramente inferior ao valor de actividade enzimática observado nos controlos, confirmando que os resultados do ensaio fluorimétrico, quando analisados em termos da razão das actividades enzimáticas obtidas na ausência e na presença do inibidor, e nas condições testadas experimentalmente, permitem a detecção de doentes portadores do alelo Q292K.

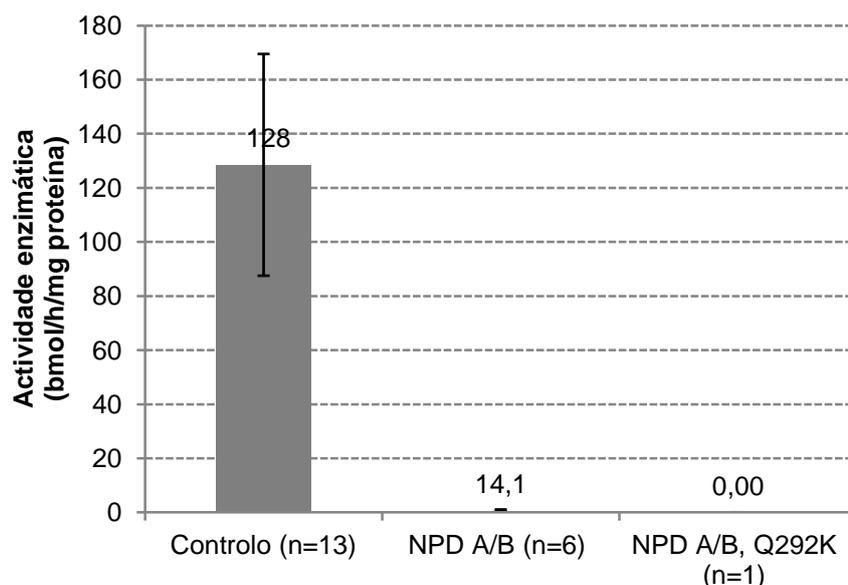


Figura 9. Actividade enzimática da aSMase em lisados de fibroblastos humanos cultivados quando determinada com o substrato natural marcado com um isótopo radioactivo. A actividade da enzima aSMase foi determinada com o substrato natural radioactivamente marcado, a ^{14}C -SM, de acordo com os procedimentos descritos na secção Material e Métodos. A actividade enzimática foi expressa em nmol/h/mg proteína e representada na forma de média \pm desvio padrão para $n \geq 3$. Os valores médios observados estão identificados sobre as barras.

Estudo da actividade residual da aSMase em Leucócitos

Os resultados obtidos no estudo de 23 amostras de indivíduos saudáveis (controlos), e uma amostra de um doente NPD-B (D6 da Tabela 2) são apresentados nas Figuras 10 a 12. Uma vez que o intervalo de valores de actividade observado nesta população é semelhante ao descrito na literatura (van Diggelen *et al.*, 2005), para efeitos de análise dos resultados compara-se na Figura 10 os valores obtidos experimentalmente com o valor mais elevado reportado na literatura para os doentes portadores da variante Q229K. Tal como previamente observado com este substrato fluorogénico (van Diggelen *et al.*, 2005) e com o substrato cromogénico 2-N-(hexadecanoil)amino-4-nitrofenil fosforilcolina (Harzer *et al.*, 2003), a actividade enzimática da aSMase obtida com o substrato 6HMU-PC em amostras de leucócitos de controlos é inferior à do doente (Figura 10). Contudo, a razão desta observação não é conhecida. Tal como observado para os lisados de fibroblastos, a razão das actividades da aSMase obtidas na ausência e na presença do

inibidor (LSM), permite distinguir claramente os doentes portadores da variante Q292K dos controlos (Figura 11), do mesmo modo que o ensaio efectuado com o substrato natural (Figura 12).

De referir, que em amostras de leucócitos conservadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por um período superior a 2 anos, foi observada uma actividade enzimática praticamente nula de aSMase (resultados não apresentados). Esta observação sugere que a enzima é instável, o que aliás está de acordo com a observação efectuada por outros autores (Barbara G. Rao e Matthew W. Spence, 1976). No sentido de estabelecer o período e temperatura de conservação da amostra apropriadas para este ensaio enzimático, seria interessante proceder ao estudo da actividade enzimática da aSMase numa mesma amostra sujeita a diferentes períodos de conservação a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

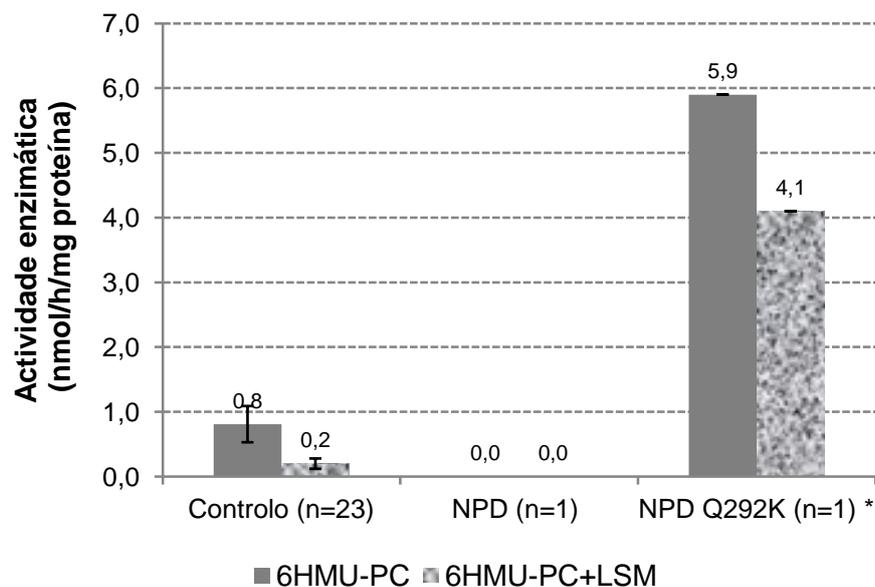


Figura 10. Actividade enzimática da aSMase em lisados de leucócitos quando determinada com o substrato sintético fluorogénico 6HMU-PC, na ausência e na presença do inibidor, a LSM. A actividade enzimática, foi determinada de acordo com os procedimentos descritos na secção Material e Métodos, expressa em nmol/h/mg proteína e representada na forma de média \pm desvio padrão para $n \geq 3$. Os valores médios observados, estão identificados sobre as barras. * -Valores extraídos do artigo van Diggelen *et al.*, 2005.

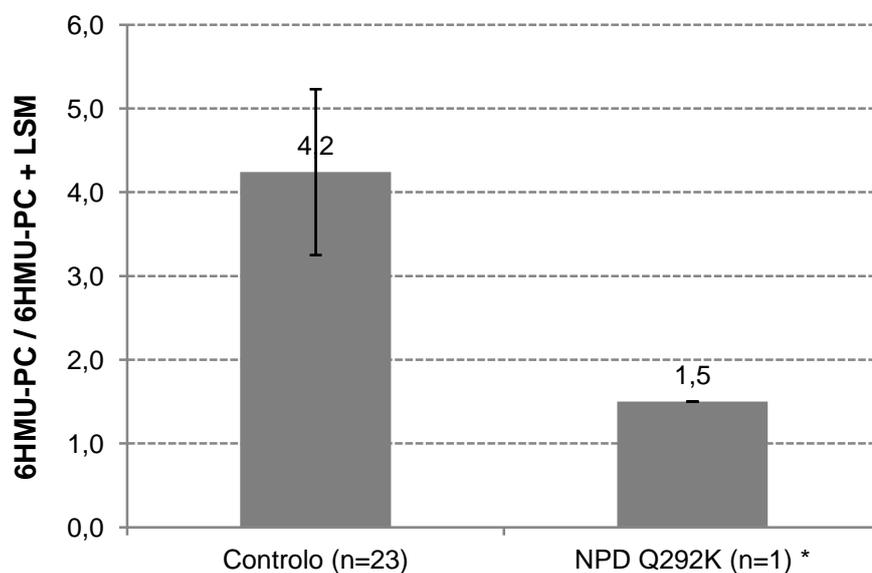


Figura 11. Razão das actividades enzimáticas da aSMase obtidas na presença (6HMU-PC+LSM) ou ausência (6HMU-PC) do inibidor competitivo LSM em lisados de leucócitos. Os resultados estão representados na forma de média \pm desvio padrão para $n \geq 3$. Os valores médios observados estão identificados sobre as barras. * - Valores extraídos do artigo van Diggelen *et al.*, 2005.

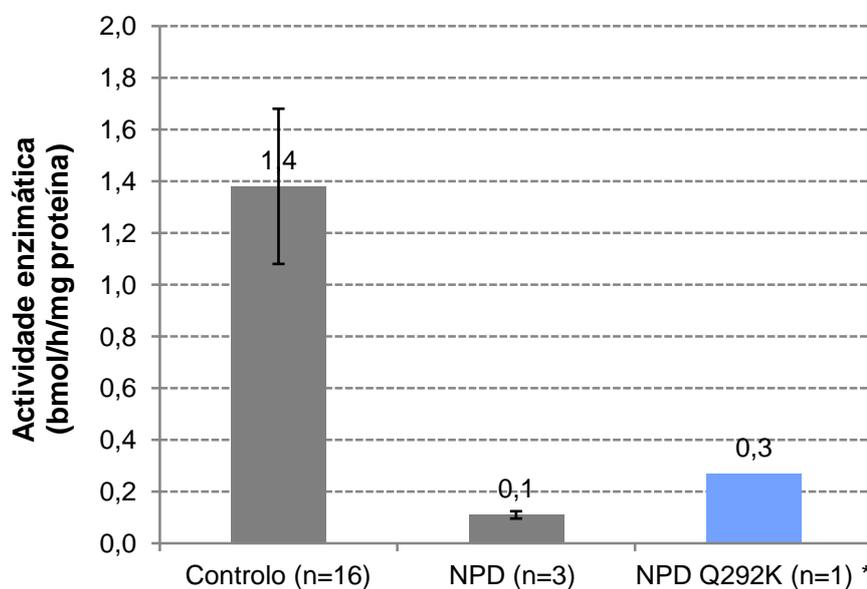


Figura 12. Actividade enzimática da aSMase em lisados de leucócitos, quando determinada com o substrato natural marcado com um isótopo radioactivo. A actividade da enzima aSMase foi determinada com o substrato natural radioactivamente marcado, a ^{14}C -SM, de acordo com os procedimentos descritos na secção Material e Métodos. A actividade enzimática foi expressa em

nmol/h/mg proteína e representada na forma de média \pm desvio padrão para $n \geq 3$. Os valores médios observados estão identificados sobre as barras.

Estudo da actividade residual da aSMase em Amniócitos

A inclusão de amniócitos cultivados neste estudo deve-se ao facto da Unidade de Bioquímica Genética investigar as patologias lisossomais associadas a hidrósia fetal não imune (NIHF). Actualmente estão associadas a NIHF 14 DLS: doença de Gaucher tipo II, Sialidose tipo II, Galactosialidose, ISSD, doença de Salla, Mucopolissacaridose tipo I, IV-A e VII, Gangliosidose GM1, Mucolipidoses II e III, Niemann-Pick tipo A e C, Mucossulfatidose, doença de Wolman e doença de Farber (Burin *et al.*, 2004), 11 das quais são estudadas no laboratório, nomeadamente a doença de NPD-A. A identificação duma destas DLS em amostras de NIHF contribui, por isso, para o esclarecimento da sua etiologia, possibilitando a realização de aconselhamento genético, estudo familiar e diagnóstico pré-natal no caso dos casais identificados em risco para a patologia. Assim, dado o seu carácter de urgência e à sua frequência (estima-se uma variação entre 1/600 e 1/4000) (Burin *et al.*, 2004), o método radioactivo não é o mais adequado.

Os resultados obtidos (Figuras 13 e 14) em 30 amostras de amniócitos de indivíduos controlo e de um doente NPD-A (D3 da Tabela 2), sugerem que o ensaio pode ser aplicado no diagnóstico pré-natal e, em princípio, deverá permitir distinguir a variante pseudo-normal, até porque, em amostras de amniócitos, esperam-se resultados semelhantes aos observados em amostras de fibroblastos.

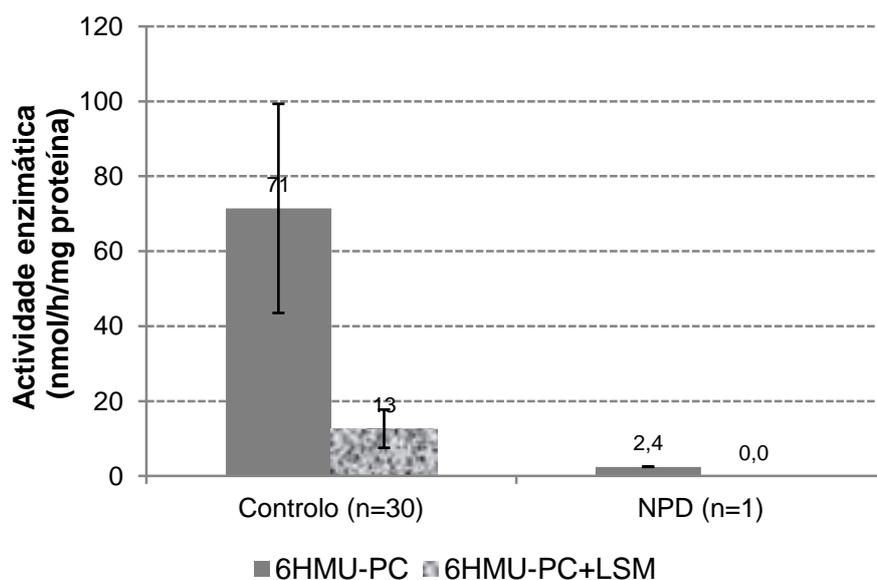


Figura 13. Actividade enzimática da aSMase em lisados de Amniócitos humanos cultivados, quando determinada com o substrato sintético fluorogénico 6HMU-PC, na ausência e na presença do inibidor, a LSM. A actividade enzimática, foi determinada de acordo com os procedimentos descritos na secção Material e Métodos, expressa em nmol/h/mg proteína e representada na forma de média \pm desvio padrão para $n \geq 3$. Os valores médios observados estão identificados sobre as barras.

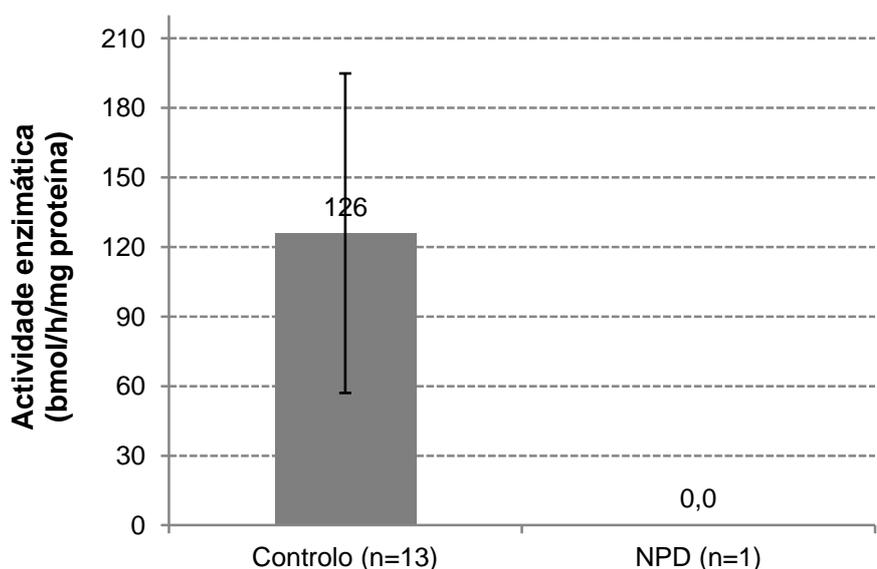


Figura 14. Actividade enzimática da aSMase em lisados de Amniócitos humanos cultivados, quando determinada com o substrato natural marcado com um isótopo radioactivo. A actividade da enzima aSMase foi determinada com o substrato natural radioactivamente marcado, a $^{14}\text{C-SM}$,

de acordo com os procedimentos descritos na secção Material e Métodos. A actividade enzimática foi expressa em nmol/h/mg proteína e representada na forma de média \pm desvio padrão para $n \geq 3$. Os valores médios observados estão identificados sobre as barras.

Discussão Geral

5. Discussão Geral

A NPD é uma doença lisossomal caracterizada pela deficiência enzimática da aSMase causada por mutações no gene *SMPD1*. Esta patologia exhibe uma considerável variabilidade clínica que está associada a uma heterogeneidade genética. Para além dos sub-tipos clínicos principais, NPD-A e NPD-B, estão descritos fenótipos intermédios. Em geral, a gravidade do fenótipo clínico correlaciona-se inversamente com o nível de actividade residual da aSMase. No caso da mutação Q292K, esta está normalmente associada a um fenótipo mais moderado do que o fenótipo tipo A clássico. No entanto, a presença do alelo Q292K em homozigotia ou em heterozigotia composta, foi também descrita em doentes que apresentam défice cognitivo progressivo, incapacidade motora e/ou anomalias na retina (estas últimas tidas como representativas de doença neurológica e por isso, associadas a uma forma mais grave da doença) (Wasserstein *et al.*, 2006). Assim, com base na natureza dos sintomas e dos sinais clínicos não é clara a distinção entre os doentes com a forma clássica NPD-A e os doentes portadores do alelo Q292K. A sua diferenciação pode ser, no entanto, estabelecida através de ensaios bioquímicos específicos que quantificam a actividade enzimática da aSMase.

Inicialmente, o diagnóstico bioquímico da doença de NPD-A e NPD-B era efectuado recorrendo a um ensaio enzimático com um substrato sintético cromogénico (van Diggelen, 1986, comunicação pessoal). No entanto, os ensaios enzimáticos com substratos sintéticos podem apresentar a desvantagem de produzir resultados falso-negativos, isto é, uma actividade enzimática normal *in vitro* correspondente a uma actividade enzimática *in vivo* reduzida para níveis compatíveis com a disfunção lisossomal. O inverso também é teoricamente possível embora, à data, não tenha sido descrito nenhum caso na literatura. De facto, estudos posteriores demonstraram que o ensaio não permitia detectar os doentes com actividades residuais elevadas, tais como os doentes portadores da mutação Q292K (Harzer *et al.*, 2003), tendo sido, por isso, substituído pelo ensaio com o substrato natural radioactivo (Vanier *et al.*, 1980) que é específico e sensível para a identificação de doentes NPD, independentemente da variante genética. No entanto, existem inúmeras desvantagens decorrentes do uso de radioisótopos como marcadores em ensaios bioquímicos, tais como, semi-vida limitada,

necessidade de equipamento de análise específico e de custo elevado, necessidade de recursos humanos qualificados e especializados, laboratórios com requisitos técnicos específicos e necessidade de armazenamento do lixo radioactivo em condições de segurança. Assim, investigámos a possibilidade de implementação de um ensaio bioquímico baseado no estudo da actividade enzimática da aSMase utilizando um substrato sintético fluorogénico recentemente descrito (van Diggelen *et al.*, 2005), tendo como objectivo a sua inclusão no painel de testes bioquímicos genéticos de rastreio das DLS para a identificação específica da NPD.

A caracterização laboratorial da NPD envolve a demonstração da deficiência da actividade enzimática da aSMase em lisados celulares e a subsequente identificação do defeito molecular no gene *SMPD1*. A maioria das mutações descritas interferem significativamente com a função do local catalítico da aSMase e, conseqüentemente, a deficiente actividade da enzima mutante é detectável com qualquer um dos ensaios bioquímicos descritos. No entanto dado que a mutação Q292K não interfere com o local catalítico mas, presumivelmente, com o local de ligação ao substrato, verifica-se que esta enzima mutante apresenta um nível de actividade normal com substratos sintéticos mas uma actividade deficiente quando determinada com o substrato natural, razão pela qual a sua actividade enzimática é referida como “pseudo-normal” (Fujita *et al.*, 1996; Lozano *et al.*, 2001; Harzer *et al.*, 2003; Pavlu-Pereira *et al.*, 2005). Os substratos naturais da aSMase são a SM e a LSM. No ensaio com o substrato sintético fluorogénico, a adição de um destes substratos naturais (não marcados radioactivamente) promove um decréscimo de actividade enzimática da aSMase, monitorizada com o substrato fluorogénico, uma vez que irão actuar, na reacção, como inibidores competitivos. No entanto, a inibição será mais pronunciada no caso da enzima de indivíduos controlo, do que no caso da enzima mutante (com uma actividade pseudo-normal), uma vez que a mutação ocorre no local de ligação ao substrato. Porém, em determinadas condições experimentais, a SM, ao contrário da LSM, não permite a diferenciação entre os dois tipos de enzima pelo que o ensaio pressupõe a utilização de LSM como inibidor da aSMase (van Diggelen *et al.*, 2005).

Tal como referido anteriormente, neste trabalho procedeu-se à adaptação e validação laboratorial deste ensaio fluorimétrico para 3 tipos de amostras biológicas humanas: leucócitos totais de sangue periférico e fibroblastos cultivados, usados em diagnóstico pós-natal, e amniócitos cultivados para o estabelecimento do diagnóstico pré-natal de DLS, incluindo NPD. Os resultados obtidos foram concordantes com os descritos na

literatura (van Diggelen *et al.*, 2005) para as amostras controlo de leucócitos e de fibroblastos, e a mesma observação pôde ser constatada para o padrão de actividades enzimáticas obtido com as enzimas mutantes testadas, quer para a forma clássica de NPD, em que a mutação afecta a função do local catalítico, quer para a forma “pseudo-normal” em que a mutação afecta o local de ligação da enzima aos substratos, tendo neste caso sido especificamente testada uma linha celular de doente com a mutação Q292K. De referir que esta mutação é a única conhecida até à presente data com estas características. Relativamente às amostras de amniócitos, até à presente data não existem valores de referência na literatura. Na impossibilidade de testar a sensibilidade do novo ensaio enzimático para a detecção da mutação Q292K, em amniócitos, por inexistência de amostras de controlos positivos, o estudo foi efectuado utilizando unicamente amostras de doentes com a forma clássica da patologia. A importância de alargar o estudo a amostras de amniócitos cultivados prende-se com o facto da NPD poder constituir uma base etiológica de NIHF. De facto, a NIHF pode ter muitas causas (Machin, 1989; Jauniaux *et al.*, 1990) e os erros inatos do metabolismo, incluindo as DLS, nomeadamente a NPD (Kattner *et al.*, 1997), estão presentes em 1-2 % dos casos com NIHF (Turkel, 1982; Machin, 1989; Jauniaux *et al.*, 1990).

Assim, com base nos resultados obtidos neste trabalho, a instrução de trabalho para a identificação laboratorial da doença NPD-A e NPD-B, descrita em anexo, será adoptada na actividade de diagnóstico da Unidade de Bioquímica Genética do INSA, I.P., constituindo uma mais-valia do estudo efectuado.

O estabelecimento do ensaio em amniócitos impôs-se, dado que até à data os autores do método não tinham reportado qualquer desenvolvimento de tão importante aplicação do diagnóstico - contexto pré-natal.

Conclusão

6. Conclusão

A caracterização bioquímica de doentes com Esfingolipidoses, como é o caso da NPD, é geralmente efectuada através de ensaios enzimáticos específicos para a hidrolase ácida associada à patologia em estudo. O trabalho apresentado nesta dissertação de mestrado permitiu implementar um novo método de diagnóstico bioquímico da NPD baseado na utilização de um substrato sintético fluorogénico, o que constitui uma abordagem mais simples, rápida e económica, embora não menos específica e sensível que o ensaio de utilização *in vitro* do substrato natural marcado radioactivamente da aSMase. As características técnicas deste ensaio enzimático proporcionam a sua inclusão no painel de testes bioquímicos de rastreio das DLS aumentando, assim, a probabilidade de identificação de doentes NPD. Dado que o estudo foi efectuado em diferentes amostras biológicas (leucócitos, fibroblastos e amniócitos), a aplicabilidade deste método na actividade de diagnóstico pós-natal e pré-natal de NPD é imediata, destacando-se a importância da sua aplicação no estudo pré-natal de NPD, bem como na identificação etiológica da NIHF. De facto, sendo a NPD uma doença rara, todos os doentes identificados serão relevantes para a continuidade da investigação nesta patologia, nomeadamente ao nível do conhecimento da epidemiologia genética e da fisiopatologia molecular da NPD. Neste âmbito, espera-se que os resultados obtidos e descritos no presente trabalho contribuam de forma significativa para a concretização desses objectivos de longo prazo.

Referências Bibliográficas

7. Referências Bibliográficas

Abe, A., S. Gregory, L. Lee, P. D. Killen, R. O. Brady, A. Kulkarni and J. A. Shayman (2000). "Reduction of globotriaosylceramide in Fabry disease mice by substrate deprivation." J Clin Invest **105**(11): 1563-1571.

Balreira, A., P. Gaspar, D. Caiola, J. Chaves, I. Beirao, J. L. Lima, J. E. Azevedo and M. C. Miranda (2008). "A nonsense mutation in the LIMP-2 gene associated with progressive myoclonic epilepsy and nephrotic syndrome." Hum Mol Genet **17**(14): 2238-2243.

Barbara Gillis Rao and Matthew W. Spence (1976). "Sphingomyelinase activity at pH 7.4 in human brain and a comparison to activity at pH 5.0." Journal of Lipid Research **17**:506-515.

Beck, M. (2007). "New therapeutic options for lysosomal storage disorders: enzyme replacement, small molecules and gene therapy." Hum Genet **121**(1): 1-22.

Burin, M. G., A. P. Scholz, R. Gus, M. T. Sanseverino, A. Fritsh, J. A. Magalhaes, F. Timm, P. Barrios, M. Chesky, J. C. Coelho and R. Giugliani (2004). "Investigation of lysosomal storage diseases in nonimmune hydrops fetalis." Prenat Diagn **24**(8): 653-657.

Cho, Y. U., J. D. Chae, W. M. Lee, J. J. Woo, H. B. Lee, S. J. Gong, C. J. Park, G. H. Kim and H. W. Yoo (2009). "[A case of a Korean adult affected by type B Niemann-Pick disease: secondary sea-blue histiocytosis and molecular characterization]." Korean J Lab Med **29**(2): 97-103.

Cox, T., R. Lachmann, C. Hollak, J. Aerts, S. van Weely, M. Hrebicek, F. Platt, T. Butters, R. Dwek, C. Moyses, I. Gow, D. Elstein and A. Zimran (2000). "Novel oral treatment of Gaucher's disease with N-butyldeoxynojirimycin (OGT 918) to decrease substrate biosynthesis." Lancet **355**(9214): 1481-1485.

da Veiga Pereira, L., R. J. Desnick, D. A. Adler, C. M. Disteché and E. H. Schuchman (1991). "Regional assignment of the human acid sphingomyelinase gene (SMPD1) by PCR analysis of somatic cell hybrids and in situ hybridization to 11p15.1- p15.4." Genomics **9**(2): 229-234.

Dardis, A., S. Zampieri, M. Filocamo, A. Burlina, B. Bembi and M. G. Pittis (2005). "Functional in vitro characterization of 14 SMPD1 mutations identified in Italian patients affected by Niemann Pick Type B disease." Hum Mutat **26**(2): 164.

De Duve, C., B. C. Pressman, R. Gianetto, R. Wattiaux and F. Appelmans (1955). "Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue." Biochem J **60**(4): 604-617.

Degroote, S., J. Wolthoorn and G. van Meer (2004). "The cell biology of glycosphingolipids." Semin Cell Dev Biol **15**(4): 375-387.

den Dunnen, J. T. and S. E. Antonarakis (2001). "Nomenclature for the description of human sequence variations." Hum Genet **109**(1): 121-124.

Referências Bibliográficas

Desnick, J. P., J. Kim, X. He, M. P. Wasserstein, C. M. Simonaro and E. H. Schuchman (2010). "Identification and characterization of eight novel SMPD1 mutations causing types A and B Niemann-Pick disease." Mol Med **16**(7-8): 316-321.

Desnick, R. J. (2004). "Enzyme replacement and enhancement therapies for lysosomal diseases." J Inherit Metab Dis **27**(3): 385-410.

Desnick, R. J. and E. H. Schuchman (2002). "Enzyme replacement and enhancement therapies: lessons from lysosomal disorders." Nat Rev Genet **3**(12): 954-966.

Ellgaard, L. and A. Helenius (2001). "ER quality control: towards an understanding at the molecular level." Curr Opin Cell Biol **13**(4): 431-437.

Elstein, D., C. Hollak, J. M. Aerts, S. van Weely, M. Maas, T. M. Cox, R. H. Lachmann, M. Hrebicek, F. M. Platt, T. D. Butters, R. A. Dwek and A. Zimran (2004). "Sustained therapeutic effects of oral miglustat (Zavesca, N-butyldeoxynojirimycin, OGT 918) in type I Gaucher disease." J Inherit Metab Dis **27**(6): 757-766.

Fan, J. Q. and S. Ishii (2007). "Active-site-specific chaperone therapy for Fabry disease. Yin and Yang of enzyme inhibitors." FEBS J **274**(19): 4962-4971.

Ferlinz, K., R. Hurwitz, M. Weiler, K. Suzuki, K. Sandhoff and M. T. Vanier (1995). "Molecular analysis of the acid sphingomyelinase deficiency in a family with an intermediate form of Niemann-Pick disease." Am J Hum Genet **56**(6): 1343-1349.

Fernandez-Burriel, M., L. Pena, J. C. Ramos, J. C. Cabrera, M. Marti, F. Rodriguez-Quinones and A. Chabas (2003). "The R608del mutation in the acid sphingomyelinase gene (SMPD1) is the most prevalent among patients from Gran Canaria Island with Niemann-Pick disease type B." Clin Genet **63**(3): 235-236.

Fujita, N., K. Suzuki, M. T. Vanier, B. Popko, N. Maeda, A. Klein, M. Henseler, K. Sandhoff and H. Nakayasu (1996). "Targeted disruption of the mouse sphingolipid activator protein gene: a complex phenotype, including severe leukodystrophy and widespread storage of multiple sphingolipids." Hum Mol Genet **5**(6): 711-725.

Furst, W. and K. Sandhoff (1992). "Activator proteins and topology of lysosomal sphingolipid catabolism." Biochim Biophys Acta **1126**(1): 1-16.

Futerman, A. H. and Y. A. Hannun (2004). "The complex life of simple sphingolipids." EMBO Rep **5**(8): 777-782.

Futerman, A. H. and G. van Meer (2004). "The cell biology of lysosomal storage disorders." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(7): 554-565.

Gieselmann, V. (2005). "What can cell biology tell us about heterogeneity in lysosomal storage diseases?" Acta Paediatr Suppl **94**(447): 80-86; discussion 79.

Gluck, I., M. Zeigler, R. Bargal, E. Schiff and G. Bach (1998). "Niemann Pick Disease type A in Israeli Arabs: 677delT, a common novel single mutation. Mutations in brief no. 161. Online." Hum Mutat **12**(2): 136.

Graber, D., R. Salvayre and T. Levade (1994). "Accurate differentiation of neuronopathic and nonneuronopathic forms of Niemann-Pick disease by evaluation of the effective

- residual lysosomal sphingomyelinase activity in intact cells." J Neurochem **63**(3): 1060-1068.
- Hannun, Y. A. and L. M. Obeid (2002). "The Ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind." J Biol Chem **277**(29): 25847-25850.
- Harzer, K., A. Rolfs, P. Bauer, M. Zschesche, E. Mengel, J. Backes, B. Kustermann-Kuhn, G. Bruchelt, O. P. van Diggelen, H. Mayrhofer and I. Krageloh-Mann (2003). "Niemann-Pick disease type A and B are clinically but also enzymatically heterogeneous: pitfall in the laboratory diagnosis of sphingomyelinase deficiency associated with the mutation Q292 K." Neuropediatrics **34**(6): 301-306.
- Herbert, P. N., H. G. Windmueller, T. P. Bersot and R. S. Shulman (1974). "Characterization of the rat apolipoproteins. I. The low molecular weight proteins of rat plasma high density lipoproteins." J Biol Chem **249**(18): 5718-5724.
- Ho, M. W. and J. S. O'Brien (1971). "Differential effect of chloride ions on -galactosidase isoenzymes: a method for separate assay." Clin Chim Acta **32**(3): 443-450.
- Hurwitz, R., K. Ferlinz, G. Vielhaber, H. Moczall and K. Sandhoff (1994). "Processing of human acid sphingomyelinase in normal and I-cell fibroblasts." J Biol Chem **269**(7): 5440-5445.
- Jauniaux, E., L. Van Maldergem, C. De Munter, G. Moscoso and Y. Gillerot (1990). "Nonimmune hydrops fetalis associated with genetic abnormalities." Obstet Gynecol **75**(3 Pt 2): 568-572.
- Jenkins, R. W., D. Canals and Y. A. Hannun (2009). "Roles and regulation of secretory and lysosomal acid sphingomyelinase." Cell Signal **21**(6): 836-846.
- Jeyakumar, M., T. D. Butters, M. Cortina-Borja, V. Hunnam, R. L. Proia, V. H. Perry, R. A. Dwek and F. M. Platt (1999). "Delayed symptom onset and increased life expectancy in Sandhoff disease mice treated with N-butyldeoxynojirimycin." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(11): 6388-6393.
- Kacher, Y. and A. H. Futerman (2006). "Genetic diseases of sphingolipid metabolism: pathological mechanisms and therapeutic options." FEBS Lett **580**(23): 5510-5517.
- Karlsson, K. A. (1970). "Sphingolipid long chain bases." Lipids **5**(11): 878-891.
- Kattner, E., A. Schafer and K. Harzer (1997). "Hydrops fetalis: manifestation in lysosomal storage diseases including Farber disease." Eur J Pediatr **156**(4): 292-295.
- Kolter, T. and K. Sandhoff (1999). Sphingolipids: Their metabolic pathways and the pathobiochemistry of neurodegenerative diseases. Angewandte Chemie International Edition. WILEY-VCH. **38**: 1532-1568.
- Kolter, T. and K. Sandhoff (2006). "Sphingolipid metabolism diseases." Biochim Biophys Acta **1758**(12): 2057-2079.
- Lahiri, S. and A. H. Futerman (2007). "The metabolism and function of sphingolipids and glycosphingolipids." Cell Mol Life Sci **64**(17): 2270-2284.

Referências Bibliográficas

Langlois, S. and R. D. Wilson (2006). "Carrier screening for genetic disorders in individuals of Ashkenazi Jewish descent." J Obstet Gynaecol Can **28**(4): 324-343.

Lee, W. S., J. Rohrer, R. Kornfeld and S. Kornfeld (2002). "Multiple signals regulate trafficking of the mannose 6-phosphate-uncovering enzyme." J Biol Chem **277**(5): 3544-3551.

Lefrancois, S., J. Zeng, A. J. Hassan, M. Canuel and C. R. Morales (2003). "The lysosomal trafficking of sphingolipid activator proteins (SAPs) is mediated by sortilin." Embo J **22**(24): 6430-6437.

Levade, T. and J. P. Jaffrezou (1999). "Signalling sphingomyelinases: which, where, how and why?" Biochim Biophys Acta **1438**(1): 1-17.

Levrant, O., R. J. Desnick and E. H. Schuchman (1991). "Niemann-Pick disease: a frequent missense mutation in the acid sphingomyelinase gene of Ashkenazi Jewish type A and B patients." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(9): 3748-3752.

Levrant, O., R. J. Desnick and E. H. Schuchman (1991). "Niemann-Pick type B disease. Identification of a single codon deletion in the acid sphingomyelinase gene and genotype/phenotype correlations in type A and B patients." J Clin Invest **88**(3): 806-810.

Levrant, O., R. J. Desnick and E. H. Schuchman (1992). "Identification and expression of a common missense mutation (L302P) in the acid sphingomyelinase gene of Ashkenazi Jewish type A Niemann-Pick disease patients." Blood **80**(8): 2081-2087.

Levrant, O., R. J. Desnick and E. H. Schuchman (1993). "Type A Niemann-Pick disease: a frameshift mutation in the acid sphingomyelinase gene (fsP330) occurs in Ashkenazi Jewish patients." Hum Mutat **2**(4): 317-319.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-275.

Lozano, J., A. Morales, A. Cremesti, Z. Fuks, J. L. Tilly, E. Schuchman, E. Gulbins and R. Kolesnick (2001). "Niemann-Pick Disease versus acid sphingomyelinase deficiency." Cell Death Differ **8**(1): 100-103.

Melissa P. Wasserstein, Alan Aron, Scott E. Brodie, Calogera Simonaro, Robert J. Desnick, and Margaret M. McGovern (2006). "Acid Sphingomyelinase Deficiency: Prevalence and Characterization of an Intermediate Phenotype of Niemann-Pick Disease." J Pediatr **149**:554-9.

Machin, G. A. (1989). "Hydrops revisited: literature review of 1,414 cases published in the 1980s." Am J Med Genet **34**(3): 366-390.

Magalhaes, J., M. C. Sa Miranda, R. Pinto, M. Lemos and L. Poenaru (1984). "Sodium taurocholate effect on beta-glucosidase activity: a new approach for identification of Gaucher disease using the synthetic substrate and leucocytes." Clin Chim Acta **141**(2-3): 111-118.

Matsuda, J., O. Suzuki, A. Oshima, Y. Yamamoto, A. Noguchi, K. Takimoto, M. Itoh, Y. Matsuzaki, Y. Yasuda, S. Ogawa, Y. Sakata, E. Nanba, K. Higaki, Y. Ogawa, L. Tominaga, K. Ohno, H. Iwasaki, H. Watanabe, R. O. Brady and Y. Suzuki (2003).

- "Chemical chaperone therapy for brain pathology in G(M1)-gangliosidosis." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(26): 15912-15917.
- Meikle, P. J., J. J. Hopwood, A. E. Clague and W. F. Carey (1999). "Prevalence of lysosomal storage disorders." Jama **281**(3): 249-254.
- Merrill, A. H. (2000). "Compilation of methods published in previous volumes of Methods in Enzymology." Methods Enzymol **312**: 583-592.
- Merrill, A. H., Jr. (2002). "De novo sphingolipid biosynthesis: a necessary, but dangerous, pathway." J Biol Chem **277**(29): 25843-25846.
- Ni, X. and C. R. Morales (2006). "The lysosomal trafficking of acid sphingomyelinase is mediated by sortilin and mannose 6-phosphate receptor." Traffic **7**(7): 889-902.
- Ogretmen, B. (2006). "Sphingolipids in cancer: regulation of pathogenesis and therapy." FEBS Lett **580**(23): 5467-5476.
- Ozbayraktar, F. B. and K. O. Ulgen (2009). "Molecular facets of sphingolipids: mediators of diseases." Biotechnol J **4**(7): 1028-1041.
- Patterson, M. C., D. Vecchio, E. Jacklin, L. Abel, H. Chadha-Boreham, C. Luzy, R. Giorgino and J. E. Wraith (2010). "Long-term miglustat therapy in children with Niemann-Pick disease type C." J Child Neurol **25**(3): 300-305.
- Pavlu-Pereira, H., B. Asfaw, H. Poupctova, J. Ledvinova, J. Sikora, M. T. Vanier, K. Sandhoff, J. Zeman, Z. Novotna, D. Chudoba and M. Elleder (2005). "Acid sphingomyelinase deficiency. Phenotype variability with prevalence of intermediate phenotype in a series of twenty-five Czech and Slovak patients. A multi-approach study." J Inherit Metab Dis **28**(2): 203-227.
- Pavlu, H. and M. Elleder (1997). "Two novel mutations in patients with atypical phenotypes of acid sphingomyelinase deficiency." J Inherit Metab Dis **20**(4): 615-616.
- Pinto, R., C. Caseiro, M. Lemos, L. Lopes, A. Fontes, H. Ribeiro, E. Pinto, E. Silva, S. Rocha, A. Marcao, I. Ribeiro, L. Lacerda, G. Ribeiro, O. Amaral and M. C. Sa Miranda (2004). "Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal." Eur J Hum Genet **12**(2): 87-92.
- Pittis, M. G., V. Ricci, V. I. Guerci, C. Marcais, G. Ciana, A. Dardis, F. Gerin, M. Stroppiano, M. T. Vanier, M. Filocamo and B. Bembi (2004). "Acid sphingomyelinase: identification of nine novel mutations among Italian Niemann Pick type B patients and characterization of in vivo functional in-frame start codon." Hum Mutat **24**(2): 186-187.
- Platt, F. M., G. R. Neises, G. Reinkensmeier, M. J. Townsend, V. H. Perry, R. L. Proia, B. Winchester, R. A. Dwek and T. D. Butters (1997). "Prevention of lysosomal storage in Tay-Sachs mice treated with N-butyldeoxynojirimycin." Science **276**(5311): 428-431.
- Poorthuis, B. J., R. A. Wevers, W. J. Kleijer, J. E. Groener, J. G. de Jong, S. van Weely, K. E. Niezen-Koning and O. P. van Diggelen (1999). "The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands." Hum Genet **105**(1-2): 151-156.

Referências Bibliográficas

- Quintern, L. E., E. H. Schuchman, O. Levran, M. Suchi, K. Ferlinz, H. Reinke, K. Sandhoff and R. J. Desnick (1989). "Isolation of cDNA clones encoding human acid sphingomyelinase: occurrence of alternatively processed transcripts." Embo J **8**(9): 2469-2473.
- Reczek, D., M. Schwake, J. Schroder, H. Hughes, J. Blanz, X. Jin, W. Brondyk, S. Van Patten, T. Edmunds and P. Saftig (2007). "LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase." Cell **131**(4): 770-783.
- Rodriguez-Pascau, L., L. Gort, E. H. Schuchman, L. Vilageliu, D. Grinberg and A. Chabas (2009). "Identification and characterization of SMPD1 mutations causing Niemann-Pick types A and B in Spanish patients." Hum Mutat **30**(7): 1117-1122.
- Sandhoff, K. (1977). "The biochemistry of sphingolipid storage diseases." Angew Chem Int Ed Engl **16**(5): 273-285.
- Sandhoff, K. and T. Kolter (2003). "Biosynthesis and degradation of mammalian glycosphingolipids." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **358**(1433): 847-861.
- Sandhoff, K., T. Kolter and G. Van Echten-Deckert (1998). "Sphingolipid metabolism. Sphingoid analogs, sphingolipid activator proteins, and the pathology of the cell." Ann N Y Acad Sci **845**: 139-151.
- Sawkar, A. R., W. C. Cheng, E. Beutler, C. H. Wong, W. E. Balch and J. W. Kelly (2002). "Chemical chaperones increase the cellular activity of N370S beta -glucosidase: a therapeutic strategy for Gaucher disease." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(24): 15428-15433.
- Schuchman, E. H. (2007). "The pathogenesis and treatment of acid sphingomyelinase-deficient Niemann-Pick disease." J Inherit Metab Dis **30**(5): 654-663.
- Schuchman, E. H., O. Levran, L. V. Pereira and R. J. Desnick (1992). "Structural organization and complete nucleotide sequence of the gene encoding human acid sphingomyelinase (SMPD1)." Genomics **12**(2): 197-205.
- Schuchman, E. H., O. Levran, M. Suchi and R. J. Desnick (1991). "An MspI polymorphism in the human acid sphingomyelinase gene (SMPD1)." Nucleic Acids Res **19**(11): 3160.
- Scriver, C. R. (2001). The metabolic and molecular bases of inherited disease. New York, McGraw-Hill, Health Professions Division.
- Sikora, J., H. Pavlu-Pereira, M. Elleder, H. Roelofs and R. A. Wevers (2003). "Seven novel acid sphingomyelinase gene mutations in Niemann-Pick type A and B patients." Ann Hum Genet **67**(Pt 1): 63-70.
- Sillence, D. J. and F. M. Platt (2004). "Glycosphingolipids in endocytic membrane transport." Semin Cell Dev Biol **15**(4): 409-416.
- Simonaro, C. M., R. J. Desnick, M. M. McGovern, M. P. Wasserstein and E. H. Schuchman (2002). "The demographics and distribution of type B Niemann-Pick disease: novel mutations lead to new genotype/phenotype correlations." Am J Hum Genet **71**(6): 1413-1419.

- Skoog, W. A. and W. S. Beck (1956). "Studies on the fibrinogen, dextran and phytohemagglutinin methods of isolating leukocytes." Blood **11**(5): 436-454.
- Spiegel, S. and S. Milstien (2007). "Functions of the multifaceted family of sphingosine kinases and some close relatives." J Biol Chem **282**(4): 2125-2129.
- Sweeley, C. (1991). Sphingolipids. New Comprehensive Biochemistry. v. D. L. In Neuberger A: 327-361.
- Tettamanti, G. (2004). "Ganglioside/glycosphingolipid turnover: new concepts." Glycoconj J **20**(5): 301-317.
- Thudichum, J. L. W. (1962). A treatise on the chemical constitution of the brain. Hamden, Conn., Archon Books.
- Tropak, M. B., S. P. Reid, M. Guiral, S. G. Withers and D. Mahuran (2004). "Pharmacological enhancement of beta-hexosaminidase activity in fibroblasts from adult Tay-Sachs and Sandhoff Patients." J Biol Chem **279**(14): 13478-13487.
- Turkel, S. B. (1982). "Conditions associated with nonimmune hydrops fetalis." Clin Perinatol **9**(3): 613-625.
- van Diggelen, O. P., Y. V. Voznyi, J. L. Keulemans, K. Schoonderwoerd, J. Ledvinova, E. Mengel, M. Zschesche, R. Santer and K. Harzer (2005). "A new fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of Niemann-Pick A/B, with specificity of natural sphingomyelinase substrate." J Inherit Metab Dis **28**(5): 733-741.
- Vanier, M. T., K. Ferlinz, R. Rousson, S. Duthel, P. Louisot, K. Sandhoff and K. Suzuki (1993). "Deletion of arginine (608) in acid sphingomyelinase is the prevalent mutation among Niemann-Pick disease type B patients from northern Africa." Hum Genet **92**(4): 325-330.
- Vanier, M. T., A. Revol and M. Fichet (1980). "Sphingomyelinase activities of various human tissues in control subjects and in Niemann-Pick disease - development and evaluation of a microprocedure." Clin Chim Acta **106**(3): 257-267.
- Vanier, M. T., R. Rousson, I. Garcia, G. Bailloud, M. C. Juge, A. Revol and P. Louisot (1985). "Biochemical studies in Niemann-Pick disease. III. In vitro and in vivo assays of sphingomyelin degradation in cultured skin fibroblasts and amniotic fluid cells for the diagnosis of the various forms of the disease." Clin Genet **27**(1): 20-32.
- Wasserstein, M. P., A. Aron, S. E. Brodie, C. Simonaro, R. J. Desnick and M. M. McGovern (2006). "Acid sphingomyelinase deficiency: prevalence and characterization of an intermediate phenotype of Niemann-Pick disease." J Pediatr **149**(4): 554-559.
- Wilcox, W. R. (2004). "Lysosomal storage disorders: the need for better pediatric recognition and comprehensive care." J Pediatr **144**(5 Suppl): S3-14.
- Wraith, J. E. (2002). "Lysosomal disorders." Semin Neonatol **7**(1): 75-83.
- Zervas, M., K. L. Somers, M. A. Thrall and S. U. Walkley (2001). "Critical role for glycosphingolipids in Niemann-Pick disease type C." Curr Biol **11**(16): 1283-1287.

8. Anexos

Determinação da Actividade da Esfingomielinase_ Método Fluorimétrico

Objectivo: Descrição do procedimento laboratorial para a determinação da actividade da enzima esfingomielinase em leucócitos, fibroblastos e amniócitos utilizando o substrato 6-HMU-fosforilcolina.

Abreviaturas:

Cons. – Conservação

ta – Temperatura ambiente

F1 – Frigorífico nº1

A8 – Arca nº 8

CF – Câmara fria

Tinc – Tempo de incubação

FDil – Factor de diluição

IT - Instrução de trabalho

Protocolos associados:

Extracção por sonicação

Proteína total

Descrição do processo:

A metodologia a seguir descrita, teve por base o artigo publicado van Diggelen OP, et al., (2005)

1. Reagentes:

Tampão 0.2M glicina-NaOH pH 10.7/ 0.2% SDS /0.2% Triton X-100 [0468_r]

- | | | | |
|----|--------|----|---------------------------------------|
| 1) | 15 | g | glicina (PM=75.07) [0119_s] |
| 2) | 27 | ml | dodecilsulfato de sodio 7.5% [0068_r] |
| 3) | 20 | ml | triton X-100 (D=1.05) [0010_s] |
| 4) | Qb | ml | NaOH 30 % [0022_r] |
| 5) | qb1000 | ml | agua desionizada [0000_s] |

Prep: Pesar 1, medir 2 e 3, adicionar 80% de 5, ajustar pH a 10.7 com 4 e completar volume com 5.

Cons: ta

Tampão acetato de sodio 0.1M/taurocolato de sodio pH 5.2 [0494_r]

- | | | | |
|----|-------|----|---|
| 1) | 0,8 | g | acetato de sodio anidro NaCH ₃ COO (PM=82.03) [0100_s] |
| 2) | 0,2 | g | taurocolato de sodio ~95% (PM=537.7) [0179_01_s] |
| 3) | 0,02 | g | azida de sodio NaN ₃ (PM=65.01) [0157_s] |
| 4) | qb100 | ml | agua desionizada [0000_s] |

Prep: Pesar 1, 2 e 3, adicionar 80% de 4, ajustar pH e completar volume com 4.

Cons: 4°C, CF

Substrato 6-HMU-fosforilcolina 1,32mM em tampão acetato de sodio 0.1mM pH 5.2 [0495_r]

- | | | | |
|----|------|----|--|
| 1) | 10 | mg | 6-HMU-fosforilcolina [0136_s] |
| 2) | 12,5 | ml | tampão acetato de sodio 0.1M pH 5.2 [0494_r] |

Prep: Reconstituir 1 com 2 e dissolver a 60°C. Dividir em aliquotas de 100ul.

Cons: -70°C (A70)

Substrato D-eritro-esfingosina fosfocolina 12mM (stock) [0496_r]

- 1) 25 mg D-eritro-esfingosina fosfocolina [0078_s]
 2) 4,5 ml tampão acetato de sodio 0.1M pH 5.2 [0494_r]

Prep: Dissolver 1 em 2. Titular de acordo com descrito na IT, para estabelecimento da concentração optima de cada lote. Dividir em aliquotas de 300ul.

Cons: -70°C (A70)

2. Procedimento

a) Amostra:

Extrair o pelet celular com H₂O por sonicação e dosar a proteína. Utilizar extractos contendo cerca de 3.0 mg/ml de proteína (leucócitos) e 1.0 mg/ml (fibroblastos e amniócitos).

b) Ensaio (volumes em µl) em tubos Eppendorf com tampa de rosca; (1)

Tubo	BSA 0,2% [00236_r]	Amostra	[00494_r]	HMU-PC (*) [0495_r]	D-eritro-esfingosina [0496_r]
Branco1	10	-	10	10	-
Ensaio1	-	10	10	10	-
Branco2	10	-	-	10	10
Ensaio2	-	10	-	10	10

(1) - Ensaio em duplicado; (*) Agitar e incubar 1 hora (fibroblastos e amniócitos) e 17 horas (leucócitos) a 37°C. Parar a reacção adicionando 1000ul de [0468_r]. Ler Fluorescência ($\lambda_{ex}=365nm$ e $\lambda_{em}=445nm$)

c) Curva de calibração

Tubo	Concentração (nmol/ml)	Padrão [0020_r]	H ₂ O	Glicina [0021_r]
P0	0.000	0	200	1000
P1	0.417	50	150	1000
P2	0.833	100	100	1000
P3	1.25	150	50	1000
P4	1.67	200	0	1000

Ler Fluorescência ($\lambda_{ex}=365nm$ e $\lambda_{em}=445nm$)

3. Cálculo do Resultado

a) Constantes

Fibroblastos e amniócitos: Tinc= 1; FDil=103

Leucócitos: Tinc= 17; FDil=103

4. Valores de Referência

Os valores de actividade enzimática a seguir apresentados foram obtidos na UBQ.

	Actividade aSMase (nmol/h/mg de proteína)		Razão
	HMU-PC	HMU-PC+LSM	
Leucócitos			
Controlos (n=23)	0.39–1,38	0.08–0.43	2.62–6.65
NPD (n=1)	0.0	0.0	ND
Fibroblastos			
Controlos (n=20)	11.6–98.4	2.9–22.2	3.8–8.7
NPD (n=4)	0.0–1.02	0.0–0.76	ND
NPD Q292K (n=1)	32.7	19.8	1.7
Amniócitos			
Controlos (n=30)	29.6–160.2	5.6–27.9	4.1–7.4
NPD (n=1)	2.4	0.0	ND

Referências

van Diggelen OP, et al., (2005) A new fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of Niemann–Pick A/B, with specificity of natural sphingomyelinase substrate. Journal of Inherited Metabolic Disease, 28, 5, 733-741.

*- Unidade de Bioquímica Genética CGMJM-INSA,IP