

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**TESE DE DOUTORADO**

**ASPECTOS GENÉTICOS E BIOQUÍMICOS DA DOENÇA DE GAUCHER COM  
ÊNFASE NO GENE *GBA1* E NO METABOLISMO DA VITAMINA B<sub>12</sub>**

**SUELEN PORTO BASGALUPP**

Porto Alegre

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**TESE DE DOUTORADO**

**ASPECTOS GENÉTICOS E BIOQUÍMICOS DA DOENÇA DE GAUCHER COM  
ÊNFASE NO GENE *GBA1* E NO METABOLISMO DA VITAMINA B<sub>12</sub>**

**SUELEN PORTO BASGALUPP**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção de título de Doutora em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

**ORIENTADOR:** Ida Vanessa Doederlein Schwartz

**COORIENTADOR:** Marina Siebert

Porto Alegre

2019

## **BANCA EXAMINADORA**

### **Prof. Dr. Fábio Klamt**

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS  
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

### **Prof. Dr. Marino Muxfeldt Bianchin**

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS  
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

### **Prof. Dr. Matheus Roriz Cruz**

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS  
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

### **Prof. Dr. André Anjos da Silva**

Universidade do Vale do Rio dos Sinos – UNISINOS  
Universidade do Vale do Taquari - UNIVATES

### **Dra. Taciane Alegria**

Temple Street Children's University Hospital, Dublin - Irlanda

*“Quem quer aprender a voar um dia deve primeiro aprender a ficar de pé, a andar, a correr,  
a saltar, a subir e a dançar: não se aprende a voar de repente!”*

*Friedrich Nietzsche*

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Ida Vanessa Doederlein Schwartz, pela oportunidade e pela confiança depositada em minha capacidade de realizar o Doutorado sem ter o título de Mestre. Obrigada pelos ensinamentos e por permitir meu crescimento pessoal e profissional;

À minha coorientadora, Marina Siebert, pelo apoio, amizade e troca de conhecimentos durante a minha trajetória. Obrigada pelos ensinamentos e pela convivência.

À Luciana Hannibal, por permitir a realização do Doutorado sanduíche na Alemanha. Obrigada pelos ensinamentos, pela confiança, pela disponibilidade e pela experiência incrível que tive durante esse período. Também, aos queridos colegas de laboratório: Carla, Melissa e Sidney pelo acolhimento, por toda ajuda e por tornarem esse período mais leve e proveitoso;

À equipe do Centro de Referência para doença de Gaucher do Rio Grande do Sul, pelo cuidado com os pacientes, pelas discussões realizadas para melhor atendê-los e pelos ensinamentos adquiridos nos últimos 4 anos. Em especial ao Filippo Vairo, por compartilhar seu conhecimento, pelos ensinamentos e por ter contribuído para a minha formação;

À querida Taciane Alegre, com quem eu tive a honra de trabalhar no início do Doutorado e que é o meu maior exemplo de simplicidade e generosidade. Obrigada pelos ensinamentos, pelo apoio e por cada encontro que tivemos;

Aos colegas e amigos do laboratório BRAIN-HCPA, em especial às amigas Franciele Pinheiro, Giovana Weber, Karina Colonetti, Raíssa Caldeira e Taciane Borsatto. Obrigada pelo apoio, pela companhia e pelas risadas ao longo dessa trajetória. Vocês são muito especiais para mim. À Fernanda Sperb, pelo apoio, pela amizade e a pelos ensinamentos durante esse período. Ao Rodrigo Starosta, pela amizade e parceria, pela troca de conhecimentos e pelos momentos em que trabalhamos juntos durante esse tempo;

Ao querido amigo Igor Araújo, por estar sempre me apoiando e me incentivando a seguir em frente, apesar das dificuldades. Obrigada pelas inúmeras risadas, pela parceria, pela amizade, pela troca de experiências vividas, por torcer por mim e por ser esse amigo especial que eu tanto admiro;

Aos meus amigos, pelo apoio, por proporcionarem momentos alegres a cada encontro, por aceitarem minha ausência em vários momentos. Obrigada pelo carinho e amizade de vocês e por torcerem pela minha realização profissional;

Ao PPGCM, pela oportunidade de crescimento profissional e por permitir a realização do meu Doutorado;

À CAPES, pela concessão da bolsa de Doutorado, inclusive durante o período sanduíche;

Ao HCPA e ao FIPE pelo suporte financeiro dos projetos desenvolvidos;

Aos pacientes, que são a razão deste estudo. Meus sinceros agradecimentos;

Ao querido Everaldo Almeida, por sua disponibilidade em me ajudar durante esses anos. Obrigada pela amizade, pelo apoio, pela companhia e incentivo que sempre me deu, por ser essa pessoa alegre, humilde e responsável que és;

Aos meus irmãos Márcio, Taiane e Ana Luiza, por serem meus amigos, por me apoiarem e pelo esforço que sempre fizeram para reunir a família pelo menos uma vez ao ano. Amo vocês!

Aos meus afilhados, Davi, Pedro Henrique e Mateus e ao meu sobrinho Lucas, pela ausência em vários momentos importantes nas nossas vidas. A dinda/tia ama muito vocês!

À minha mãe, Neida, por ser meu porto seguro, por me apoiar em todas as decisões realizadas, por estar sempre disposta a me ouvir, pelo amor incondicional e por acreditar em mim. Obrigada por tudo!

Ao meu pai, Jorge (*in memoriam*), que me protege e me dá forças para lutar pelos meus objetivos. Certamente, ele ficaria muito feliz e orgulhoso se presenciasse esta conquista;

À minha avó, Eulina, pelo carinho e por ter acompanhado a minha trajetória;

À família Prietto, pelo acolhimento, pelo apoio e incentivo, pelos momentos felizes e por fazerem parte da minha família;

Ao meu amor, Leandro Prietto, pelo companheirismo, pelo carinho e amor que foram fundamentais durante a realização deste trabalho. Obrigada pela paciência e pelo incentivo em todos os momentos, por abrir mão de muitas coisas por mim e por sempre acreditar na minha capacidade. Você foi fundamental em cada etapa deste trabalho. Muito obrigada!

À Deus, por me proteger e por permitir a concretização deste trabalho.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	11
LISTA DE FIGURAS.....	13
LISTA DE TABELAS.....	14
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	15
1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Erros inatos do metabolismo.....	17
1.2 Doenças lisossômicas.....	17
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações.....	19
2.2 Doença de Gaucher.....	21
2.2.1 Breve histórico da doença.....	22
2.2.2 Fisiopatogênese.....	22
2.2.3 Manifestações clínicas.....	23
2.2.4 Genética.....	25
2.2.5 Variabilidade fenotípica e correlação genótipo-fenótipo.....	27
2.2.6 Modificadores do fenótipo.....	29
2.2.7 Diagnóstico.....	32
2.2.8 Tratamento.....	32
2.2.9 Biomarcadores.....	35
2.2.10 Centro de Referência para doença de Gaucher no Rio Grande do Sul.....	37
2.3 Vitamina B <sub>12</sub> .....	37
2.3.1 Metabolismo da vitamina B <sub>12</sub> .....	38
2.3.2 <i>Status</i> de B <sub>12</sub> .....	41
2.3.3 Biomarcadores do <i>status</i> de B <sub>12</sub> .....	44
2.3.4 Vitamina B <sub>12</sub> e doença de Gaucher.....	48
3. MARCO CONCEITUAL.....	50
4. JUSTIFICATIVA.....	51
5. OBJETIVOS.....	53
5.1. Objetivo geral.....	53
5.2 Objetivos específicos.....	53
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

7. CAPÍTULOS.....	69
7.1 CAPÍTULO 1 – Artigo 1 .....	70
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	81
9. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	83
10. ANEXOS .....	85
10.1 ANEXO I – Carta de aprovação do projeto 1 pelo Comitê de Ética e Pesquisa.....	85
10.2 ANEXO II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	87
10.3 ANEXO III – Carta de aprovação do projeto 2 pelo Comitê de Ética e Pesquisa.....	90
10.4 ANEXO IV – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	92
10.5 ANEXO V – Ficha de coleta de dados .....	95
10.6 ANEXO VI – Artigo publicado no <i>Journal of Inborn Errors of Metabolism &amp; Screening</i> , 2017 – Hampered Vitamin B <sub>12</sub> Metabolism in Gaucher Disease?.....	92
10.7 ANEXO VII – <i>STROBE - Checklist</i> para estudos observacionais .....	100

## RESUMO

A doença de Gaucher (DG) é uma doença rara, herdada de forma autossômica recessiva, causada pela atividade reduzida da enzima lisossomal glicocerebrosidase (GCCase) devido a mutações patogênicas no gene *GBAI*, o que leva ao acúmulo do substrato glicocerebrosídeo em macrófagos. A DG apresenta uma grande variabilidade fenotípica, sendo caracterizada principalmente por manifestações hematológicas, viscerais, ósseas e neurológicas. Embora cerca de 500 mutações já tenham sido descritas no gene *GBAI*, não há uma associação estabelecida entre mutações específicas e as características clínicas apresentadas pelos pacientes com DG. O acúmulo de glicocerebrosídeo pode estar afetando a função lisossômica, o que poderia levar a uma disfunção celular e a anormalidades clínicas, como a deficiência de vitamina B<sub>12</sub> (B<sub>12</sub>). **Objetivos:** Caracterizar o genótipo e o metabolismo da vitamina B<sub>12</sub> em pacientes com DG. **Métodos:** Foram analisados, por *Multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA), 33 pacientes com DG para identificar a presença de deleções e inserções no *GBAI* em pacientes que não apresentavam genótipo definido. Foram caracterizadas amostras de 72 pacientes com DG (n=40 da região Sul do Brasil, n=32 de outras regiões do país) utilizando o método de Sanger ou sequenciamento de nova geração e as frequências alélicas das mutações identificadas foram comparadas entre pacientes com DG de diferentes regiões do Brasil. Biomarcadores funcionais do metabolismo da B<sub>12</sub> foram mensurados em fibroblastos de indivíduos saudáveis (n=3), pacientes com DG não tratados (tipo I=1; tipo II=1; tipo III=1) e um heterozigoto assintomático. A expressão de transcobalamina (TC) em células de indivíduos saudáveis e de pacientes com DG foi analisada por *Western blot*. Níveis de B<sub>12</sub> total, holo-transcobalamina (holo-TC), homocisteína total (tHcy) e ácido metilmalônico (MMA) foram analisados retrospectivamente em 52 amostras de plasma de 10 pacientes brasileiros com DG tipo I acompanhados pelo Centro de Referência em DG do Sul do Brasil. **Resultados:** Foi identificada uma deleção em heterozigose de uma região do gene *GBAI* em uma paciente com DG que apresentava genótipo incompleto. Trinta e uma mutações foram identificadas em pacientes brasileiros com DG, sendo duas delas não descritas na literatura. Pacientes com DG pertencentes à região Sul do Brasil apresentaram perfil alélico diferente daqueles que pertenciam às demais regiões do país. Níveis de biomarcadores funcionais do *status* de B<sub>12</sub> não diferiram entre amostras de células de pacientes com DG e de indivíduos saudáveis. A análise por *Western blot* a partir de lisados de células indicou a presença de conteúdo normal de TC em ambas as linhagens celulares. Nenhum paciente com DG tipo I apresentou níveis

reduzidos de B<sub>12</sub> total em amostras de plasmas. A análise de quatro biomarcadores do *status* de B<sub>12</sub> sugere que não há uma deficiência funcional desse micronutriente em pacientes com DG tipo I. **Conclusão:** A técnica de MLPA é uma metodologia complementar que pode ser utilizada para analisar a presença de deleções e de inserções em pacientes com DG que não apresentam genótipo definido. Em relação à caracterização genética de pacientes brasileiros com DG, o alelo mais frequente foi o N370S. O estudo sugere que existe um perfil alélico específico no *GBA1* entre pacientes com DG de diferentes regiões do Brasil, sendo que os alelos N370S, *RecNciI* e L444P foram mais representativos na região Sul do país. A investigação do metabolismo da B<sub>12</sub> em pacientes com DG mostrou que as vias de transporte e de processamento da B<sub>12</sub> estão preservadas em células de pacientes com DG. A análise de biomarcadores do *status* de B<sub>12</sub> em amostras de plasmas mostrou que pacientes brasileiros com DG tipo I apresentam níveis normais de B<sub>12</sub>, o que difere de um estudo prévio que demonstrou uma alta prevalência de níveis reduzidos de B<sub>12</sub> em pacientes com DG da população judeus Ashkenazi. Além disso, a análise de biomarcadores funcionais (tHcy e MMA) não indicou deficiência de B<sub>12</sub> em pacientes com DG. Portanto, o acúmulo de glicocerebrosídeo nos lisossomos parece não afetar o processamento e o tráfego da vitamina B<sub>12</sub>, não ocasionando uma deficiência funcional de B<sub>12</sub> em pacientes com DG tipo I.

**Palavras-chave:** doença de Gaucher, mutações, metabolismo da B<sub>12</sub>, biomarcadores da B<sub>12</sub>, Holo-TC, MMA, tHcy, *status* de B<sub>12</sub>.

## ABSTRACT

Gaucher disease (GD) is a rare autosomal recessive disease caused by the reduced activity of the lysosomal enzyme glucocerebrosidase (GCCase) due to pathogenic mutations in *GBA1* gene, which leads to an accumulation of its substrate, glucocerebroside, in the macrophages. GD presents a considerable phenotypic variation, and it is characterized mainly by hematological, visceral, skeletal and neurological manifestations. Although around 500 mutations have been described in the *GBA1*, there is no clear association between mutation and clinical features presented by patients with GD. The accumulation of glucocerebroside may be affecting the lysosomal function and leads to cellular dysfunction and clinical abnormalities, such as a vitamin B<sub>12</sub> deficiency. **Objectives:** To characterize the genotype and vitamin B<sub>12</sub> metabolism in GD patients. **Methods:** Thirty-three patients with GD were analyzed by Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) method to detect deletions or insertions in the *GBA1* in patients with uncharacterized alleles. Samples from 72 GD patients (n=40 from South Brazil, n=32 from other regions of Brazil) were analyzed by Sanger or next-generation sequencing, and allele frequencies were compared in GD from different regions of Brazil. Functional biomarkers of B<sub>12</sub> metabolism were measured in fibroblasts from healthy individuals (n=3), GD untreated patients (type I=1; type II=1; type III=1) and an asymptomatic heterozygous. The expression of transcobalamin (TC) in cells from healthy individuals and GD patients was analyzed by Western blot. Total B<sub>12</sub>, holotranscobalamin (holo-TC), total homocysteine (tHcy) and methylmalonic acid (MMA) were prospectively measured in 52 plasma samples from 10 Brazilian patients with GD type I followed by Reference Center for GD from south of Brazil. **Results:** A deletion in a region of the *GBA1* gene was identified in one GD patient presenting incomplete genotype. Thirty-one mutations were identified in Brazilian patients with GD, two of them not described in the literature. GD patients from the southern region of Brazil had different allelic profile than those from other regions of the country. B<sub>12</sub> biomarkers levels did not differ between cells from GD patients and healthy individuals. Western blot analysis of whole cell lysates indicated standard content of TC in both cell lines. No patient with GD type I presented low levels of total B<sub>12</sub> in plasma samples. Four biomarkers of B<sub>12</sub> status suggests that there is no functional deficiency of this micronutrient in GD type I patients. **Conclusion:** The MLPA technique is a complementary methodology that can be used to analyze the presence of deletions and insertions in patients with GD that do not have defined genotype. Regarding the genetic characterization of Brazilian GD patients, the most frequent allele was N370S. The

study suggests that there is a specific allele profile in *GBA1* among patients with GD from different regions of Brazil, whereas the N370S, RecNciI, and L444P alleles are more representative in the southern region of the country. The investigation of B<sub>12</sub> metabolism in GD patients showed that transport and processing pathways of B<sub>12</sub> are overall preserved in GD cells. Analysis of B<sub>12</sub> status biomarkers in plasma samples showed that Brazilian GD type I patients present normal levels of B<sub>12</sub>, in contrast with the previous study that demonstrated high prevalence of low B<sub>12</sub> in untreated patients with GD from the Ashkenazi Jewish population. Furthermore, the analysis of functional biomarkers (tHcy and MMA) was not suggestive of B<sub>12</sub> deficiency in GD patients. Therefore, glucocerebroside accumulation in lysosomes seems not affect the processing and trafficking of B<sub>12</sub>, and it not causing a functional impairment of B<sub>12</sub> in patients with GD type I.

**Key Words:** Gaucher disease, mutations, B<sub>12</sub> metabolism, B<sub>12</sub> biomarkers, Holo-TC, MMA, tHcy, B<sub>12</sub> status.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Estratégias para localizar e selecionar as informações.....	20
<b>Figura 2</b> – Rota de degradação dos glicosfingolípídeos.....	22
<b>Figura 3</b> – Reações de degradação catalisadas pela enzima GCase na DG.....	23
<b>Figura 4</b> – Classificação clínica da DG como um espectro de fenótipos.....	25
<b>Figura 5</b> – Estrutura do gene <i>GBA1</i> e localização de diferentes tipos de mutações.....	26
<b>Figura 6</b> – Fatores que contribuem para a variabilidade fenotípica em pacientes com DG...29	
<b>Figura 7</b> – Representação esquemática de estratégias terapêuticas disponíveis para DG.....	34
<b>Figura 8</b> – Estrutura da vitamina B <sub>12</sub> .....	38
<b>Figura 9</b> – Metabolismo da vitamina B <sub>12</sub> .....	40
<b>Figura 10</b> – Representação esquemática das reações que necessitam de B <sub>12</sub> como cofator...41	
<b>Figura 11</b> – Processamento celular e tráfego da vitamina B <sub>12</sub> .....	42
<b>Figura 12</b> – Representação de características clínicas apresentadas por indivíduos com deficiência de B <sub>12</sub> .....	43
<b>Figura 13</b> – Marco conceitual da DG envolvendo o metabolismo da B <sub>12</sub> .....	50

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Biomarcadores do <i>status</i> de B <sub>12</sub> com suas vantagens e limitações.....	45
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AdoCbl</b>	Adenosilcobalamina
<b>B<sub>12</sub></b>	Vitamina B <sub>12</sub>
<b>BMMT</b>	Betaína-homocisteína metiltransferase
<b>CAPES</b>	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
<b>Cbl</b>	Cobalamina
<b>CCL18</b>	Do inglês, <i>chemokine (C-C motif) ligand 18</i>
<b>CG</b>	Células de Gaucher
<b>CHIT1</b>	Gene que codifica a enzima quitotriosidase
<b>CN</b>	Cianocobalamina
<b>CRDG-RS</b>	Centro de referência em doença de Gaucher do Rio Grande do Sul
<b>Co</b>	Cobalto
<b>DG</b>	Doença de Gaucher
<b>DL</b>	Doença lisossômica
<b>DMB</b>	5,6-dimetilbenzimidazol
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DP</b>	Doença de Parkinson
<b>Dup24</b>	Duplicação de 24 pares de base
<b>EIM</b>	Erros inatos do metabolismo
<b>FDA</b>	Do inglês, <i>Food and Drug Administration</i>
<b>FI</b>	Fator intrínseco
<b>GBA1</b>	Gene que codifica a enzima glicocerebrosidase
<b>GBA2</b>	Gene que codifica a enzima glicocerebrosidase não-lisossomal
<b>GBAP</b>	Pseudogene da glicocerebrosidase
<b>GC</b>	Glicocerebrosídeo
<b>GCase</b>	Enzima glicocerebrosidase
<b>GlcSph</b>	Glicosilesfingosina
<b>HC</b>	Haptocorrina
<b>HCC</b>	Carcinoma hepatocelular/ <i>Hepatocellular carcinoma</i>
<b>HCl</b>	Ácido clorídrico
<b>Hcy</b>	Homocisteína
<b>HCPA</b>	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
<b>HGMD</b>	Do inglês, <i>Human Gene Mutation Database</i>

<b>Holo-TC</b>	Holo-transcobalamina
<b>Kb</b>	Kilobase
<b>LIMP-2</b>	Do inglês, <i>Lysosome integral membrane protein type 2</i>
<b>MCM</b>	Metilmalonil-CoA mutase/ <i>Methylmalonyl-CoA mutase</i>
<b>Met</b>	Metionina
<b>MeCbl</b>	Metilcobalamina
<b>MLPA</b>	Do inglês, <i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
<b>MM</b>	Mieloma múltiplo
<b>MMA</b>	Ácido metilmalônico/ <i>Methylmalonic acid</i>
<b>MS</b>	Metionina sintase
<b>NGS</b>	Sequenciamento de nova geração/ <i>Next-generation sequencing</i>
<b>NK</b>	Do inglês, <i>Natural killer cells</i>
<b>OMIM</b>	Do inglês, <i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
<b>PARC</b>	Do inglês, <i>Pulmonary and Activation-Regulated Chemokine</i>
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>pSAP</b>	Prosaposina
<b>QT</b>	Quitotriosidase
<b>RE</b>	Retículo endoplasmático
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RTC</b>	Receptor de transcobalamina
<b>Sap-C</b>	Saposina C
<b>SCARB2</b>	Do inglês, <i>Scavenger receptor class B member 2</i>
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>Sph</b>	Esfingosina
<b>TC</b>	Transcobalamina
<b>TRE</b>	Terapia de reposição enzimática
<b>TRS</b>	Terapia de redução de substrato

# **1. INTRODUÇÃO**

## **1.1 Erros inatos do metabolismo**

Os erros inatos do metabolismo (EIM) representam um grupo heterogêneo de defeitos genéticos que envolvem a síntese ou o catabolismo de moléculas dentro de uma via metabólica específica, os quais ocasionam alteração da síntese, degradação, processamento e/ou transporte de moléculas no organismo. De forma geral, os EIM são considerados raros quando analisados individualmente, mas numerosos quando em conjunto, podendo chegar a uma incidência de 1:2.500 indivíduos (BLAU et al., 2006). Atualmente, existem 1015 EIM conhecidamente causadores de alterações em vias metabólicas específicas já descritos na literatura (FERREIRA et al., 2018). Esse grupo de doenças representa em torno de 80% das doenças raras, embora sua prevalência tenha uma ampla variação em diferentes doenças (FERREIRA et al., 2018). A maioria dos EIM apresenta tratamento disponível, seja a partir do manejo dietético, administração enzimática, terapia gênica, entre outros (COLONETTI; ROESCH; SCHWARTZ, 2018; HARDING, 2017; KRUSZKA; REGIER, 2019; SHARMA; PRASAD, 2017; SHEMESH et al., 2013).

A maioria dos EIM envolve anormalidades em enzimas ou proteínas transportadoras e podem ser divididos em duas grandes categorias. A primeira inclui doenças que envolvem apenas um sistema funcional ou que afetam apenas um órgão ou sistema anatômico. Nessa categoria, os sintomas apresentados são uniformes e o diagnóstico correto geralmente é fácil de ser realizado. A segunda categoria inclui doenças nas quais o defeito bioquímico afeta uma via metabólica comum a diferentes células ou órgãos, ou o defeito está restrito a um órgão, mas dá origem a consequências humorais e sistêmicas. As doenças pertencentes a esta categoria apresentam uma grande diversidade de sintoma e, devido a sua heterogeneidade, os EIM são classificados em três grupos, os quais incluem: 1) doenças do metabolismo intermediário afetando pequenas moléculas; 2) doenças envolvendo principalmente o metabolismo energético e 3) doenças envolvendo moléculas complexas (BELLETTATO et al., 2018).

## **1.2 Doenças lisossômicas**

Entre as doenças que envolvem moléculas complexas, estão as doenças lisossômicas (DLs), as quais são responsáveis pelo acúmulo intracelular de um substrato não degradável no interior dos lisossomos das células reticuloendoteliais. Conseqüentemente, há um comprometimento e prejuízo da função de diferentes órgãos e sistemas no corpo, causando

manifestações clínicas tais como hepatomegalia, disfunção neurológica e problemas ósseos (BELLETTATO et al., 2018; HOFFMANN; ZSCHOCKE; NYHAN, 2017).

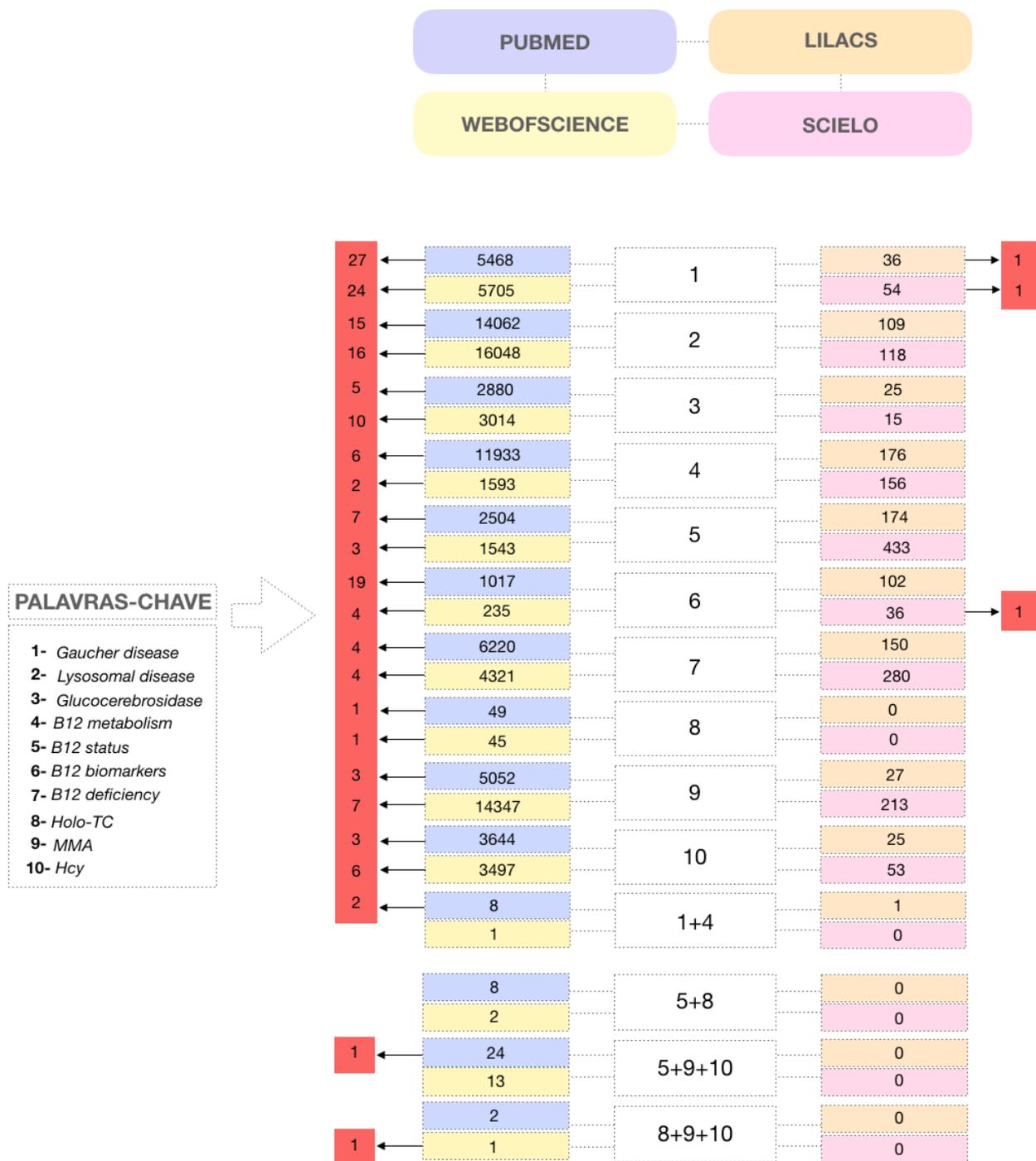
As DLs compreendem um grupo heterogêneo de mais de 50 doenças causadas pela deficiência de uma enzima específica ou componente lisossomal (BELLETTATO et al., 2018; STARETZ-CHACHAM et al., 2009). Esse grupo de doenças tem uma incidência estimada de 1 a cada 7.500 nascidos vivos na população em geral (COX; CACHÓN-GONZÁLEZ, 2012). As DLs são causadas principalmente por mutações em genes que codificam enzimas lisossomais responsáveis pela degradação de macromoléculas como glicolipídeos, glicoproteínas e mucopolissacarídeos (BRAVO et al., 2017; MEIKLE et al., 1999), podendo também afetar a função de transportadores específicos que são necessários para exportação de moléculas degradadas nos lisossomos (FERREIRA; GAHL, 2017; STIRNEMANN et al., 2017). Muitas das DLs possuem tratamento específico disponível, podendo ser através de terapia de reposição enzimática, transplante de células-tronco hematopoiéticas, inibição da síntese de substrato, chaperonas farmacológicas, entre outras estratégias (PLATT; LACHMANN, 2009; SHEMESH et al., 2013). Quanto mais precoce o diagnóstico do paciente e o início do tratamento, a melhor intervenção terapêutica poderá prevenir danos irreversíveis ou minimizar significativamente algumas manifestações clínicas da doença (GABRIELLI et al., 2016; MCGILL et al., 2010).

Entre as DLs mais frequentes está a doença de Gaucher (DG), a qual envolve o acúmulo de um substrato não degradável (glicosfingolipídeos) decorrente de uma deficiência enzimática causada por mutações no gene que codifica essa enzima. O acúmulo de glicosfingolipídeos dentro dos lisossomos dos pacientes com DG pode prejudicar o adequado funcionamento destas organelas, o que pode afetar diferentes vias e processos que ocorrem nos lisossomos. Visto que a DG apresenta uma grande heterogeneidade fenotípica, estratégias como identificação das mutações causadoras da doença, bem como a investigação de possíveis fatores modificadores do fenótipo podem ampliar o conhecimento da fisiopatogênese desta, permitindo um melhor manejo, acompanhamento e tratamento das comorbidades apresentadas pelos pacientes.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações

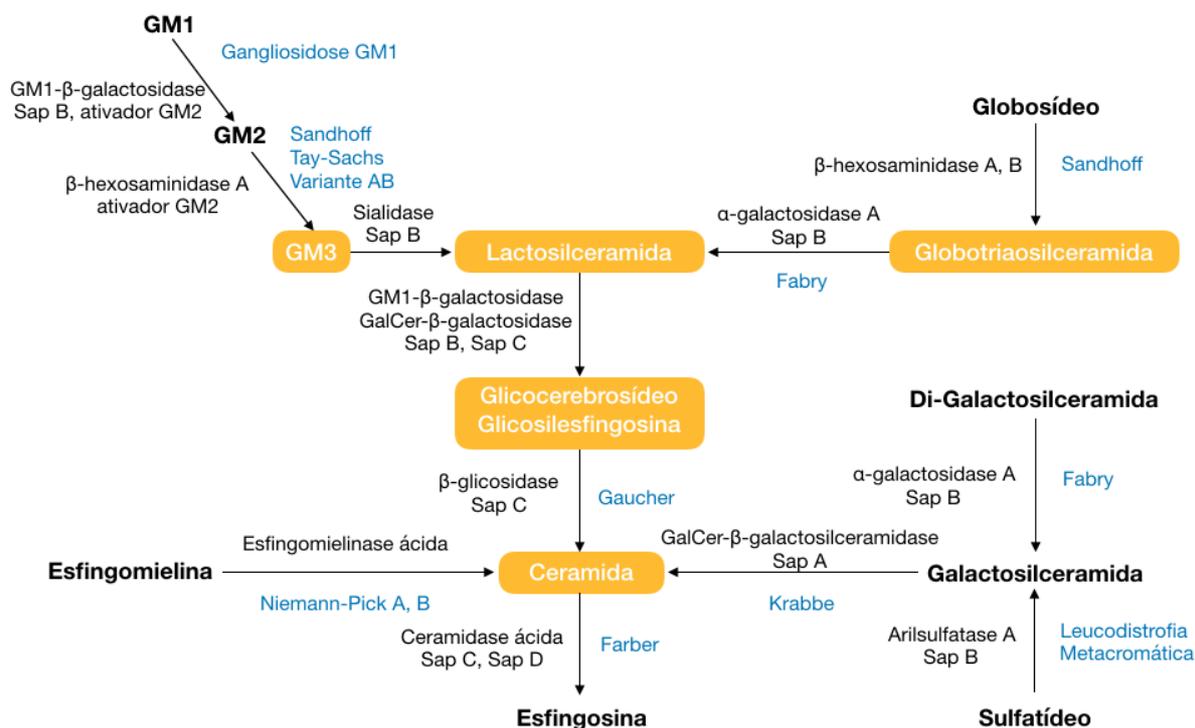
Esta revisão da literatura foi focada na DG, apontando suas características moleculares e bioquímicas, manifestações clínicas, bem como diagnóstico e tratamento. A procura de artigos científicos também teve como foco o metabolismo da vitamina B<sub>12</sub>, abordando o *status* desse micronutriente, o uso de biomarcadores para determinação dos níveis de B<sub>12</sub> e o diagnóstico da deficiência de B<sub>12</sub>. A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: *PubMed*, *Web of Science*, *LILACS* e *Scielo*, no período de 1882 a 2019. Foram realizadas buscas através dos termos “*Gaucher disease*”, “*lysosomal disease*”, “*glucocerebrosidase*”, “*B<sub>12</sub> metabolism*”, “*B<sub>12</sub> status*”, “*B<sub>12</sub> biomarkers*”, “*B<sub>12</sub> deficiency*”, “*holo-TC*”, “*MMA*”, “*tHcy*”, e algumas combinações. A figura esquemática contendo as combinações utilizadas estão apresentadas na Figura 1. A escolha dos artigos levou em consideração a data de publicação, a relevância e o número de citações.



**Figura 1.** Estratégias para localizar e selecionar as informações. Caixas em vermelho indicam os artigos que foram incluídos na revisão. Este é o resultado da busca da combinação das palavras-chave. Fonte: Elaborado pela Autora (2019).

## 2.2 Doença de Gaucher

A doença de Gaucher (DG), uma das mais frequentes doenças lisossômicas, apresenta incidência estimada de 1 em cada 70.000 nascidos vivos na população geral, alcançando a frequência de 1 em cada 850 indivíduos na população de judeus Ashkenazi (BELLETTATO et al., 2018; BEUTLER et al., 1993). A DG é um EIM dos glicoesfingolipídeos, sendo herdada de forma autossômica recessiva. Esta doença é causada pela deficiência total ou parcial da atividade da enzima glicocerebrosidase (GCCase; beta-glicosidade ácida (EC 3.2.1.45)) devido a mutações patogênicas bialélicas no gene *GBA1* (OMIM 606463, <http://www.omim.org/entry/606463>; VANIER; FROISSART, 2013), o qual codifica a enzima GCCase (Figura 2). A GCCase é responsável pela hidrólise do glicocerebrosídeo (GC) em glicose e ceramida nas células do sistema reticuloendotelial. Nos casos em que há um *déficit* enzimático, o substrato GC acumula-se no interior dos lisossomos, principalmente em macrófagos, resultando na formação das células de Gaucher (CG). Esse acúmulo de glicolipídeos nos macrófagos prejudica o adequado funcionamento de diferentes órgãos, principalmente fígado, baço e medula óssea (BEUTLER, 2006; HARMANCI; BAYRAKTAR, 2008a; HUGHES, 2009). Dessa forma, a DG é caracterizada como uma doença multissistêmica, apresentando grande heterogeneidade fenotípica, apesar de ser uma doença monogênica (NYHAN et al., 2012; PASTORES; HUGHES, 1993). Cabe destacar que existe uma forma extremamente rara da DG, a qual é causada por mutações bialélicas no gene *PSAP*. Esse gene codifica a enzima prosaposina (pSAP) que será processada a partir de uma clivagem proteolítica gerando a saposina C (Sap-C), a qual tem como função a ativação da GCCase. Existem poucos casos descritos na literatura de pacientes com DG devido à deficiência de Sap-C (KANG et al., 2018; MOTTA et al., 2014; SCHNABEL; SCHRÖDER; SANDHOFF, 1991; TAMARGO et al., 2012; TYLKI-SZYMAŃSKA et al., 2007), sendo que esses pacientes geralmente apresentam manifestações clínicas semelhantes aos pacientes DG tipo III (STIRNEMANN et al., 2017).



**Figura 2.** Rota de degradação dos glicosíngolípídeos (Adaptado de SUN; ZHANG, 2013).

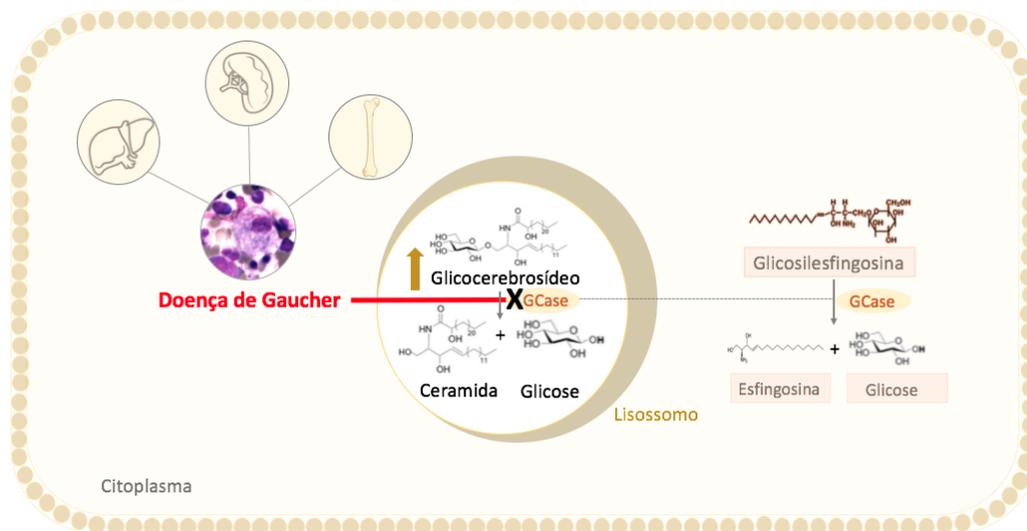
### 2.2.1 Breve histórico da doença

A DG foi a primeira doença lisossômica identificada, sendo descrita em 1882 por Phillippe CE Gaucher em sua tese de doutorado. Foi observado um aumento considerável do volume do baço de uma mulher de 32 anos, sendo reportada a presença de células repletas de lipídeos (GAUCHER, 1882). Novos casos foram sendo descritos ao longo dos anos possibilitando a identificação de uma heterogeneidade de manifestações clínicas da doença. Em 1934, o GC foi identificado como o principal substrato acumulado em diferentes órgãos de indivíduos com DG (AGHION, 1934). O mecanismo enzimático, entretanto, foi elucidado somente em 1965 por Roscoe Brady (BRADY; KANFER; SHAPIRO, 1965), quando foi demonstrado que a degradação do substrato era mediada pela enzima GCase (BRADY et al., 1966). Em 1989, o gene *GBA1* foi descrito, mostrando estar localizado no cromossomo 1 (HOROWITZ et al., 1989).

### 2.2.2 Fisiopatogênese

A deficiência total ou parcial da GCase, a qual atua no metabolismo dos glicosíngolípídeos, ocorre devido a mutações no gene *GBA1*. O principal substrato a ser

metabolizado pela GCase é o GC a partir da via de hidrólise do substrato em ceramida e glicose (GRABOWSKI, 2013). Outra via em que a GCase atua é na formação de esfingosina (Sph) e ceramida a partir do substrato glicosilesfingosina (GlcSph), o qual constitui uma forma deacilada do GC, sendo potencialmente tóxico e geralmente apresenta níveis aumentados em pacientes com comprometimento neurológico, sugerindo uma importante contribuição na patogênese da forma neuronopática da DG (ORVISKY et al., 2002) (Figura 3). Como consequência, tal deficiência leva ao acúmulo principalmente do substrato GC nos lisossomos de macrófagos (SMITH; MULLIN; SCHAPIRA, 2017). Esses macrófagos ingurgitados de glicolípídeos são conhecidos como CG e são característicos da doença na análise histológica, sendo distribuídas por todo o corpo e comprometendo o funcionamento de diferentes órgãos, o que caracteriza a doença como multissistêmica (MARKUSZEWSKA-KUCZYNSKA et al., 2015).



**Figura 3.** Reações de degradação catalisadas pela enzima GCase representando a DG e os principais órgãos afetados nessa doença (Autora, 2019).

### 2.2.3 Manifestações clínicas

As principais manifestações clínicas da DG incluem hepatoesplenomegalia, trombocitopenia, anemia, problemas ósseos e pulmonares, além de envolvimento neurológico nas formas neuronopáticas da doença (GRABOWSKI, 2012; HRUSKA et al., 2008). Os sintomas variam entre os pacientes, inclusive entre os que possuem o mesmo genótipo e/ou apresentam o mesmo nível de deficiência da atividade enzimática (BIEGSTRATEN et al., 2011; STIRNEMANN et al., 2017). A DG é classificada em três principais categorias: DG

tipo I (sem acometimento neurológico) e DG tipos II e III (com envolvimento neurológico). (SIDRANSKY, 2004).

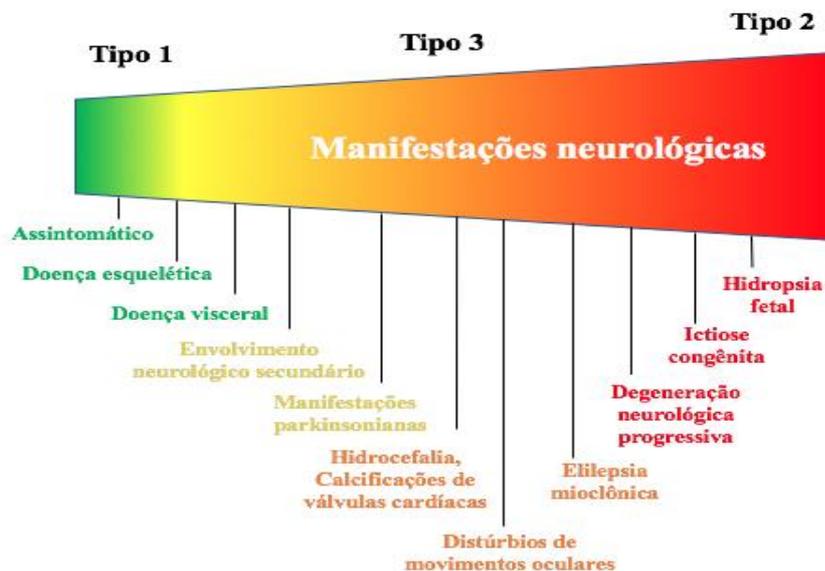
- DG tipo I: conhecida como forma não neuronopática (OMIM 230800), corresponde a mais de 90% dos casos de DG no mundo (GRABOWSKI, 2013; ZIMRAN et al., 2018). Essa forma é caracterizada por uma grande variabilidade na progressão e gravidade da doença, variando de indivíduos assintomáticos até pacientes com grave comprometimento de determinados órgãos, acomete crianças e adultos, podendo ocorrer o início dos sintomas da doença em qualquer idade. As manifestações clínicas mais comuns são hepatoesplenomegalia, anemia, trombocitopenia e problemas ósseos. As citopenias decorrem do sequestro esplênico e da infiltração da medula óssea, já o acúmulo de CG na medula óssea pode levar a diferentes doenças ósseas, incluindo a osteonecrose. Quando as manifestações clínicas aparecem precocemente, geralmente o quadro da doença está associado a um grave e rápido comprometimento dos órgãos afetados. A sobrevida do paciente pode ser normal dependendo da gravidade das complicações (GRABOWSKI, 2004). Pacientes com DG tipo I possuem risco aumentado de desenvolvimento de mieloma múltiplo (MM), carcinoma hepatocelular (HCC), linfoma, doença de Parkinson (DP) e leucemia (DAVIDSON et al., 2018; GEGG; SCHAPIRA, 2018; LANDGREN et al., 2007; MISTRY et al., 2013; ZIMRAN et al., 2005).

- DG tipo II: conhecida como forma neuronopática aguda (OMIM 230900), é o tipo mais raro da doença, representando em torno de 2% dos casos (STIRNEMANN et al., 2017). É caracterizado pelo aparecimento precoce das manifestações clínicas sistêmicas e do envolvimento do sistema nervoso central (SNC), resultando em óbito nos primeiros dois anos de vida devido à rápida progressão da doença (GRABOWSKI, 2013; SIDRANSKY, 2004). Nesse tipo de DG ocorre o comprometimento do cérebro, fígado, baço e pulmões, sendo a falência pulmonar uma das principais causas de falecimento dos pacientes (MIGNOT et al., 2006). Entre as principais manifestações clínicas da DG tipo II estão: atraso no desenvolvimento, problemas oculares como estrabismo, paralisia do olhar vertical, opistótono, espasticidade, hidropsia fetal, ictiose congênita, entre outras (GOKER-ALPAN et al., 2003; TAYEBI; STONE; SIDRANSKY, 1999).

- DG tipo III: conhecida como forma neuronopática crônica (OMIM 231000), corresponde à forma intermediária da DG, pois compromete as funções do SNC de maneira mais lenta e gradual em comparação à DG tipo II (GRABOWSKI, 2013; SIDRANSKY, 2012), representando em torno de 5% dos casos (STIRNEMANN et al., 2017). Essa forma da DG

inclui pacientes com manifestações sistêmicas e comprometimento neurológico que podem se manifestar ao longo do tempo, geralmente acompanhado de epilepsia, ataxia, paralisia do olhar vertical, além de demência. Além disso, pacientes com DG tipo III podem apresentar doença cardíaca valvular (HRUSKA et al., 2008).

Apesar da DG ser classificada em diferentes tipos, muitas vezes não é possível fazer uma distinção entre as diferentes formas da doença. Portanto, a DG pode ser considerada como um espectro de fenótipos, visto que ela apresenta uma heterogeneidade de manifestações clínicas, variando desde pacientes assintomáticos até pacientes com sintomas extremamente graves (SIDRANSKY, 2004) (Figura 4).



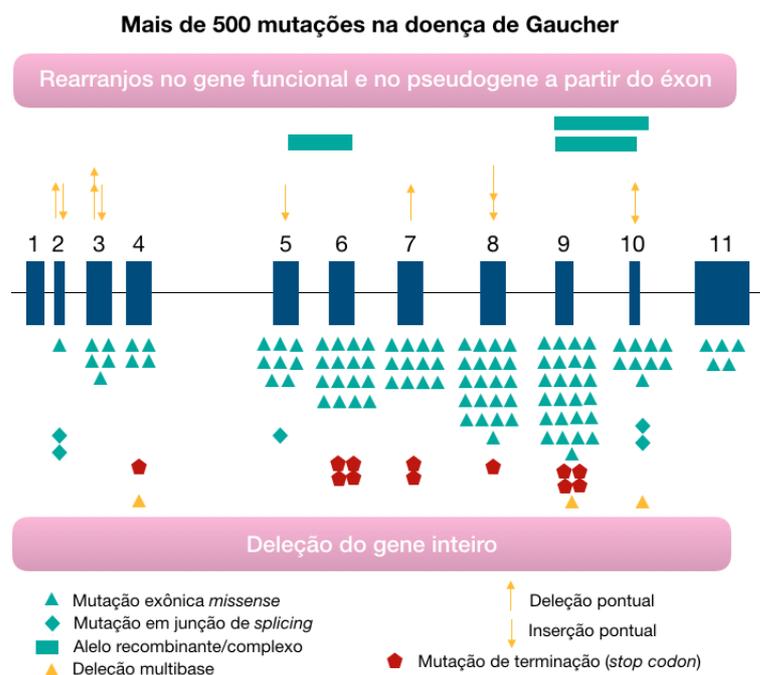
**Figura 4.** Classificação clínica da DG como um espectro de fenótipos (adaptado de SIDRANSKY, 2004).

### 2.2.4 Genética

O gene *GBA1* está localizado no *locus* 1q21, é dividido em 11 éxons e compreende 7,6 kb de DNA genômico (Figura 5). O *GBA1* possui um pseudogene, conhecido como *GBAP*, que apresenta 96% de homologia de sequência, representa 5,7 kb do genoma e está localizado a 16 kb do gene funcional (HOROWITZ et al., 1989; WINFIELD et al., 1997). O RNA mensageiro transcrito a partir do *GBA1* apresenta dois sítios de iniciação da tradução, sendo um localizado no éxon 1 e o outro no éxon 2. Ambos os sítios são eficientemente traduzidos e produzem proteínas funcionais. Enquanto o primeiro códon ATG utilizado para

o início da tradução produz uma proteína com 39 resíduos de aminoácidos na sequência do peptídeo sinal, o segundo ATG produz uma proteína com 19 resíduos de aminoácidos, sendo ambos processados para gerar uma GCase madura contendo 497 aminoácidos (HRUSKA et al., 2008). Dessa forma, existem duas nomenclaturas para designar as mutações. A forma recomendada pela *Human Genome Variation Society* (HGVS) é nomear de acordo com o aminoácido da metionina do primeiro sítio de iniciação da tradução, considerando a proteína de 39 resíduos de aminoácidos na sequência do peptídeo sinal. Porém, por muitos anos, as mutações no *GBAI* foram descritas considerando o primeiro aminoácido da proteína madura, sendo essa forma de nomenclatura mais conhecida e predominantemente utilizada nos estudos (GRABOWSKI, 2013; HRUSKA et al., 2008).

Já foram descritas na base de dados *The Human Gene Mutation Database* cerca de 500 variantes patogênicas no *GBAI* (HGMD, 2019; www.hgmd.cf.ac.uk), incluindo diferentes tipos de mutações, tais como: de ponto (*missense*, *nonsense* e sinônima), em sítios de *splicing*, mutações que alteram o quadro de leitura (*frameshift*), inserções e deleções, além de alelos complexos resultantes de eventos de recombinação ou conversão com o *GBAP*. A presença de variantes no *GBAI* pode resultar na alteração da estabilidade e/ou da capacidade catalítica da GCase (GRABOWSKI, 2013).



**Figura 5.** Estrutura do gene *GBAI* representando os tipos e as localizações das mutações mais comuns (Adaptado de VANIER; FROISSART, 2013).

A distribuição e a frequência das diferentes mutações variam conforme a população em estudo. De uma maneira geral, três dessas alterações são frequentemente encontradas na população de pacientes com DG, sendo elas: N370S (c.1226A>G; p.Asn409Ser), L444P (c.1448T>C; p.Leu483Pro) e 84GG (c.84dupG), sendo a N370S e a L444P as primeiras mutações descritas (GRABOWSKI, 2013; TSUJI et al., 1988, 1987). A frequência dessas duas mutações em pacientes brasileiros é semelhante a de outras populações, correspondendo a 50% e 25% dos alelos mutantes identificados, respectivamente. Além disso, a mutação G377S (c.1246G>A; p.Gly416Ser) é frequente no Brasil, representando a terceira variante mais frequente entre os pacientes com DG no nosso país (ROZENBERG et al., 2006). Em pacientes com DG de origem Ashkenazi, quatro mutações (N370S, L444P, 84GG e IVS2+1G>A) representam cerca de 90% dos alelos causadores da doença. Porém, essas mesmas mutações representam em torno de 50% dos alelos patogênicos em outras populações (HUGHES; PASTORES, 2010).

Eventos de recombinação entre *GBA1* e *GBAP* ocorrem com frequência, podendo dar origem aos alelos complexos. O alelo complexo mais comum é o Rec*Nci*I, o qual compreende 3 mutações (L444P, A456P e V460V) *in cis* no éxon 10 do *GBA1* (HRUSKA et al., 2008; ZAMPIERI et al., 2017). Visto que existe uma grande heterogeneidade de mutações no *GBA1*, é extremamente importante realizar a análise completa do gene, bem como de suas regiões de junção éxon-íntron, para definir o genótipo dos pacientes com DG. Além disso, diferentes técnicas de análise genética podem ser utilizadas para detecção de alelos recombinantes, além de deleções e/ou inserções no *GBA1* (BASGALUPP et al., 2018). É importante destacar que a análise molecular deve ser extremamente cuidadosa e específica para análise do gene funcional (*GBA1*), garantindo que a amplificação não ocorra no *GBAP*, evitando um resultado falso positivo.

### **2.2.5 Variabilidade fenotípica e correlação genótipo-fenótipo**

Existe uma grande variabilidade fenotípica em pacientes com DG. Embora exista a predominância de determinadas variantes, como a N370S e a L444P, há uma intensa heterogeneidade alélica dessa doença, o que dificulta estabelecer uma associação genótipo-fenótipo. Pacientes com mesmo genótipo, inclusive irmãos gêmeos, podem apresentar diferentes fenótipos, complicações e respostas ao tratamento, da mesma forma que indivíduos com diferentes genótipos muitas vezes apresentam manifestações clínicas semelhantes (BIEGSTRAATEN et al., 2011; DAVIDSON et al., 2018; HRUSKA et al., 2008; MISTRY

et al., 2017). Portanto, não existe uma correlação direta entre determinadas mutações e manifestações clínicas da doença, nem entre a quantidade de substrato acumulado e/ou níveis de atividade da GCase e fenótipo dos pacientes (SIDRANSKY, 2012).

A mutação N370S geralmente tem um efeito menor sobre o fenótipo dos pacientes, sendo considerada neuroprotetora, pois protege os indivíduos de desenvolver a forma neuronopática da doença (HUANG; ZHANG; CHEN, 2015; PASTORES; HUGHES, 1993). Quando presente em homozigose, os pacientes apresentam um amplo espectro de sintomas clínicos, variando desde a forma assintomática até multissistêmica (HOROWITZ; ZIMRAN, 1994). No entanto, menos frequentemente, pacientes com essa mutação podem apresentar envolvimento neurológico, apresentando sintomas como estrabismo, desordens de movimentos dos olhos, demência, tremor, entre outros (ALFONSO et al., 2007). Já a mutação L444P apresenta um efeito maior sobre o fenótipo dos pacientes e está associada à forma neuronopática quando presente nos dois alelos do *GBA1* (DANDANA et al., 2016; GRABOWSKI, 2012), assim como a variante D409H (c.1342G>C; p.Asp448His) está associada a problemas cardiovasculares graves, sendo fatal em pacientes homozigotos (BOHLEGA et al., 2000).

Eventos de recombinação podem ocorrer entre *GBA1* e *GBAP*, resultando em alelos recombinantes, sendo o *RecNciI* o mais comum entre os alelos complexos. Esse alelo apresenta três mutações de ponto, sendo que em duas delas ocorre a substituição de aminoácidos (L444P e A456P) e a outra é uma variante silenciosa, na qual a mudança da base não altera o aminoácido (V460V), todas localizadas no éxon 10 do gene. Estudos sugerem que os pacientes heterozigotos para as alterações L444P e *RecNciI* apresentam um pior prognóstico, sendo o alelo L444P fortemente associado com a forma neuronopática da DG. O alelo recombinante em homozigose representa uma forma letal da doença, geralmente nos primeiros dias de vida, sugerindo que a presença de alelos complexos está associada à maior gravidade da DG (EL-MORSY et al., 2011; TAYEBI et al., 2003). Além disso, a variante L444P combinada com o alelo complexo *RecNciI* está associada ao tipo II da DG, enquanto que o genótipo L444P/L444P está associado ao tipo III da DG (HRUSKA et al., 2008).

Existem diversos fatores que estão agindo sobre o fenótipo da DG, atuando como modificadores, entre eles: alelos complexos, genes contíguos (inclusive o pseudogene), substratos alternativos, proteínas transportadoras, entre diversos modificadores genéticos e fatores ambientais (Figura 6) (SIDRANSKY, 2004).



**Figura 6.** Fatores que contribuem para a variabilidade fenotípica observada em pacientes com DG (adaptado de SIDRANSKY, 2004).

### 2.2.6 Modificadores do fenótipo

A DG apresenta uma ampla heterogeneidade fenotípica, apesar de algumas mutações já terem sido associadas a determinados fenótipos. A presença de uma mutação específica no *GBA1* não é suficiente para explicar as divergências fenotípicas (GOKER-ALPAN et al., 2005). Dessa forma, diversos fatores como modificadores genéticos parecem estar influenciando as diferentes apresentações clínicas dos pacientes (SIDRANSKY, 2004). De forma geral, genes modificadores podem alterar o fenótipo clínico por meio de quatro mecanismos básicos: alterando penetrância, expressividade, dominância e/ou pleiotropia (DAVIDSON et al., 2018). Os modificadores do fenótipo da DG podem estar envolvidos em diferentes processos, sejam em etapas metabólicas, em genes que codificam proteínas ativadoras, em erros durante o transporte, processamento ou degradação da GCase. Entender os mecanismos que envolvem a fisiopatogênese da doença é extremamente importante, bem como possíveis modificadores do fenótipo da DG, pois permitirão o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e possibilitarão o estabelecimento de novas correlações

genótipo-fenótipo. Entre os principais genes modificadores do fenótipo da DG estão: *SCARB2*, *GBA2* e *PSAP*.

Estudos funcionais e clínicos sugerem que a proteína receptora LIMP-2 (*Lysosomal Integral Membrane Protein type 2*; proteína lisossomal integral de membrana do tipo 2), a qual transporta a GCase e é codificada pelo gene *SCARB2*, pode modificar a expressividade da DG (DAVIDSON et al., 2018). A proteína LIMP-2 é expressa constitutivamente e é responsável pela ligação e pelo direcionamento da GCase aos lisossomos (RECZEK et al., 2007). Essa ligação entre a enzima e a proteína é pH-dependente, sendo favorecida em pH neutro do retículo endoplasmático (RE) e interrompida ao chegar em pH ácido dentro dos lisossomos (ZACHOS et al., 2012), local em que a GCase é liberada do seu receptor LIMP-2, tornando-se disponível para degradação do substrato GC (RECZEK et al., 2007; ZACHOS et al., 2012). A deficiência da GCase também pode ser consequência de distúrbios que ocorrem durante o transporte e o direcionamento da enzima ao lisossomo. Dessa forma, um mau dobramento da enzima durante seu transporte para RE pode levar a sua degradação prematura via proteossomo. Até recentemente, era descrito que a LIMP-2 direcionava a GCase para o lisossomo apenas por uma rota independente de manose-6-fosfato. Porém, atualmente está estabelecido que essa proteína transporta a GCase para o lisossomo tanto por uma via independente como também como parte de um complexo com manose-6-fosfato (DAVIDSON et al., 2018).

Mutações no gene *SCARB2* estão associadas à síndrome de insuficiência renal com ação mioclônica, a qual apresenta herança autossômica recessiva e é caracterizada por dano renal, epilepsia mioclônica progressiva e ataxia (BLANZ et al., 2010). Alterações nesse gene também causam deficiência da proteína LIMP-2. Como consequência, a proteína fica retida dentro do RE e interfere na atividade da GCase, pois impede o transporte da enzima para os lisossomos (BLANZ et al., 2010). Dessa forma, a análise molecular do *SCARB2*, bem como a identificação de mutações e a análise de expressão gênica, sugerem que a proteína LIMP-2 tem importância fundamental na biogênese e na manutenção de endossomos tardios e lisossomos, inclusive na fusão entre lisossomos e autofagossomos (GLEICH et al., 2013). Mutações no *SCARB2* já foram identificadas em pacientes com DG com sintomas graves, associadas com a redução da quantidade da proteína LIMP-2 disponível e também com a redução da atividade da GCase (VELAYATI et al., 2011). Portanto, a LIMP-2 é essencial para o correto direcionamento da GCase aos lisossomos em pacientes com DG, sendo o *SCARB2* um forte candidato a modificador do fenótipo da DG. Um prejuízo na função de

LIMP-2 acarreta uma redução da atividade da GCase, ocasionando o acúmulo de GC, a liberação da GCase para o meio extracelular e/ou a degradação da enzima via proteossomo (VELAYATI et al., 2011).

O gene *GBA2* codifica uma glicocerebrosidade não-lisossomal associada à membrana do RE e ao complexo de Golgi, a qual é responsável pela hidrólise de O-glicosídeos e GC (KÖRSCHEN et al., 2013). Em pacientes com DG, a deficiência da atividade da GCase pode causar um aumento na expressão do *GBA2* como mecanismo compensatório (DAVIDSON et al., 2018). Quando há uma deficiência enzimática de GCase 1 e 2 concomitantemente, geralmente ocorre um maior acúmulo de GC dentro e fora dos lisossomos, em órgãos que são afetados na DG, tais como fígado, baço, medula óssea, sugerindo um papel do *GBA2* como fator modificador da DG (YILDIZ et al., 2013).

Da mesma forma que a LIMP-2, a Sap-C é essencial para a atividade da GCase devido ao seu papel de ativadora da enzima (GRABOWSKI, 2013; VACCARO et al., 2010), embora o mecanismo pelo qual essa ativação ocorra ainda não esteja bem estabelecido. Um possível mecanismo sugere que a Sap-C induz alterações na membrana, intermediando a exposição de GC e facilitando a interação entre a GCase e o substrato GC (TAMARGO et al., 2012). Além de ser responsável pela ativação da GCase, a Sap-C atua protegendo a enzima de degradação proteolítica (SUN; QI; GRABOWSKI, 2003).

Muito raramente, a DG pode ser causada por mutações patogênicas no gene *PSAP*, levando à deficiência da Sap-C, sem apresentar deficiência da GCase. Poucos casos de deficiência de Sap-C foram descritos na literatura e apesar de não terem sido identificados pacientes com deficiência de GCase e Sap-C concomitantemente, Sap-C parece ser um forte candidato a modificador do fenótipo da DG, visto que variantes do gene *PSAP* podem influenciar as manifestações clínicas bem como a intensidade dos sintomas apresentados pelos pacientes com DG (DAVIDSON et al., 2018; TAMARGO et al., 2012).

Visto que existem diversos fatores que estão influenciando as diferentes manifestações clínicas da DG, a possibilidade de ampliar o conhecimento desses modificadores do fenótipo da DG através da descoberta de novos genes envolvidos nas diferentes apresentações clínicas da doença é extremamente importante para compreender os mecanismos envolvidos na DG.

### 2.2.7 Diagnóstico

O diagnóstico da DG geralmente tem início com o aparecimento dos sintomas do indivíduo, levando à suspeita clínica da doença. O método padrão-ouro de diagnóstico é a medida da atividade da GCase em leucócitos e/ou fibroblastos, podendo ser também realizado a partir de sangue impregnado em papel filtro (SOZMEN; SEZER, 2017). Existem diversos protocolos utilizados para a análise da atividade enzimática, variável entre diferentes laboratórios e que pode ser realizada por diferentes métodos, como ensaio fluorimétrico e/ou espectrometria de massa em tandem (WOLF et al., 2018). A maioria deles utiliza um substrato sintético (4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo) associado a detergentes para solubilizar e estabilizar a enzima (GRABOWSKI, 2013). Geralmente, pacientes com DG apresentam uma atividade residual da enzima cerca de 10-15% do valor de um indivíduo saudável (STIRNEMANN et al., 2017).

Mesmo sendo o teste padrão-ouro para diagnóstico, a dosagem da atividade enzimática pode não diferenciar indivíduos heterozigotos daqueles que não apresentam mutações no *GBAI*. Dessa forma, a análise genética pode ser indicada para identificação de heterozigotos, sendo também, uma ferramenta extremamente importante para o diagnóstico dos pacientes com DG, podendo auxiliar na classificação da forma clínica da DG ou na distinção entre as formas neuronopáticas e não-neuronopáticas da doença (GRABOWSKI, 2013). A investigação genética pode ser realizada a partir da busca das mutações mais frequentes no gene tais como N370S e L444P, como também do sequenciamento completo do *GBAI*, utilizando a metodologia de Sanger ou *Next-generation sequencing* (NGS).

### 2.2.8 Tratamento

Existem dois tratamentos principais disponíveis para pacientes com DG: a terapia de reposição enzimática (TRE) e a terapia de redução de substrato (TRS) (STIRNEMANN et al., 2017). De acordo com os dados do Ministério da Saúde, existem cerca de 700 pacientes com DG realizando tratamento no Brasil, sendo que aproximadamente 96% deles utilizam a TRE e 4% estão em uso da TRS (<http://portalms.saude.gov.br>).

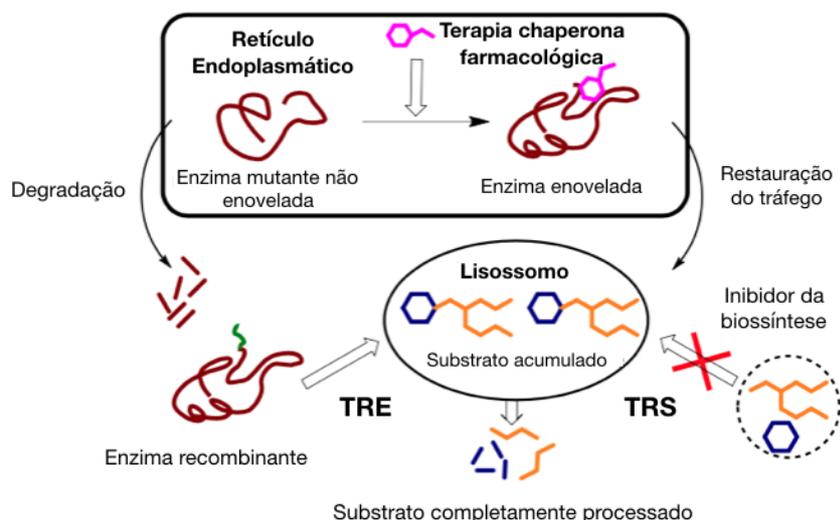
A TRE consiste na administração intravenosa de uma forma recombinante da enzima GCase, sendo que a dose varia de acordo com as manifestações clínicas de cada paciente. Geralmente a infusão ocorre quinzenalmente, podendo variar em casos específicos e requer a supervisão de um profissional da saúde treinado. O objetivo dessa terapia é repor a GCase

que está deficiente em pacientes com DG através da administração exógena da enzima recombinante, permitindo que ocorra a redução do acúmulo do substrato GC e melhora dos sintomas apresentados pelos pacientes. É importante a presença de um farmacêutico para o monitoramento da administração da dose adequada a cada paciente. A TRE teve seu início com a utilização da enzima GCCase purificada de placenta humana, denominada Alglucerase, que foi posteriormente substituída pela forma recombinante da enzima (Imiglucerase). As formas utilizadas de TRE que estão aprovadas pelo *Food and Drug Administration* (FDA) e pelo Ministério da Saúde (MS), e comercialmente disponíveis para o tratamento de pacientes com DG são: imiglucerase, alfavelaglicerase e alfataliglicerase. As diferenças entre essas três formas estão na forma como são produzidas e na sua composição. O tratamento com TRE apresenta algumas desvantagens, dentre as quais destacam-se: elevado custo (estima-se um gasto de até 300 mil dólares/ano por paciente) (HOLLAK et al., 2011), incapacidade da enzima atravessar a barreira hemato-encefálica (mais efetiva para pacientes com DG tipo I) (CHARROW; SCOTT, 2015; HOLLAK et al., 2009), administração intravenosa quinzenalmente, eficácia e distribuição da enzima não uniformes em diferentes tecidos e aumento da produção de anticorpos contra a enzima recombinante (WEINREB; LEE, 2013). A TRE tem sido altamente efetiva para reversão de manifestações viscerais, hematológicas e ósseas (MISTRY et al., 2017), apresentando uma redução de 50 – 60% do volume do baço em pacientes com DG no período de dois a cinco anos em tratamento; além de uma redução de 30 – 40% do tamanho do fígado em até cinco anos de tratamento; e aumento do número de plaquetas em torno de duas vezes dentro de cinco anos de TRE (ELSTEIN, 2013).

A TRS atua diretamente sobre o substrato acumulado e consiste de pequenos compostos inibidores da síntese do substrato GC, os quais podem se difundir rapidamente em vários tecidos, inclusive para os ossos e SNC (WAGNER et al., 2018). Em vez de repor a enzima que está deficiente, essa abordagem atua inibindo o acúmulo de GC no interior dos lisossomos, por meio da inibição da enzima glicosilceramida sintase, a qual é responsável pela síntese de GC. Os inibidores aprovados pelo FDA e MS que estão comercialmente disponíveis para o tratamento de pacientes com DG são: miglustate e eliglustate. A administração do medicamento é via oral e ocorre diariamente. Essa abordagem tem como vantagem a utilização de uma molécula pequena administrada via oral que não é capaz de provocar resposta imunológica e permite cruzar a barreira hemato-encefálica, podendo favorecer pacientes com as formas neuronopáticas da doença. Porém, ainda não se sabe se a TRS tem impacto na prevenção ou se pode reverter as manifestações neurológicas

apresentadas pelos pacientes (CERAVOLO et al., 2017). A TRS tem se mostrado efetiva para doença visceral, similarmente à TRE, porém as respostas hematológicas são mais lentas e menos efetivas comparadas à TRE (MISTRY et al., 2017). Os efeitos colaterais da TRS são mais expressivos que os da TRE e podem incluir diarreia, tremor, parestesia, cefaléia, artralgia, perda de peso, entre outros (VAN ROSSUM; HOLSOPPLE, 2016).

Outros tipos de tratamento para DG que estão emergindo como alternativas são: uso de chaperonas, terapia gênica, transplante de células-tronco, entre outros (TRAPERO; LLEBARIA, 2013). As chaperonas têm sido bastante exploradas não só para DG, mas também para outras doenças. Por terem um tamanho pequeno, essas moléculas se distribuem uniformemente entre os tecidos e têm potencial de atravessar a barreira hemato-encefálica, o que poderia prevenir o acúmulo do substrato GC no SNC de pacientes com a forma neuronopática da doença (Figura 7) (SÁNCHEZ-FERNÁNDEZ; GARCÍA FERNÁNDEZ; ORTIZ MELLET, 2016; TRAPERO; LLEBARIA, 2013). Uma estratégia terapêutica seria o uso de TRE ou TRS combinado com chaperonas farmacológicas podendo ser uma forma de tratamento mais efetivo do que o uso dessas moléculas de forma isolada. Além disso, o uso de terapia gênica vem crescendo consideravelmente nos últimos anos para diferentes doenças genéticas, inclusive para algumas DLs (EMERY, 2004; GIUGLIANI et al., 2016; GONZALEZ; BALDO, 2017; WILLIAMS, 2014).



**Figura 7.** Representação esquemática de estratégias terapêuticas disponíveis para DG (Adaptado de SÁNCHEZ-FERNÁNDEZ; GARCÍA FERNÁNDEZ; ORTIZ MELLET, 2016).

### 2.2.9 Biomarcadores

Os biomarcadores são substâncias que podem ser mensuradas em amostras biológicas e são extremamente importantes para monitorar a resposta ao tratamento em pacientes com DG. Diferentes moléculas têm sido utilizadas como indicadores do estado da DG, auxiliando no diagnóstico, no prognóstico e no monitoramento da resposta ao tratamento. Essas substâncias são liberadas pelas CG ou por células com acúmulo de GC e seus níveis estão alterados em pacientes com DG quando comparados a indivíduos saudáveis. O acúmulo de GC é responsável pela ativação dos macrófagos, os quais liberam citocinas e diversas moléculas no plasma dos pacientes. Entre as moléculas liberadas pelos macrófagos ativados estão a enzima quitotriosidase (QT), a quimiocina *chemokine (C-C motif) ligand 18/Pulmonary and Activation-Regulated Chemokine* (CCL18/PARC) e a GlcSph, sendo estas, entre outras, consideradas biomarcadores da DG.

A QT é uma enzima pertencente à família das quitinases sendo sintetizada e secretada principalmente por macrófagos ativados (ELMONEM; VAN DEN HEUVEL; LEVTCHENKO, 2016). Os níveis plasmáticos de QT não são diretamente proporcionais à gravidade das manifestações da DG, mas tendem a diminuir após o início do tratamento (BODAMER; HUNG, 2010). Pacientes com DG geralmente apresentam níveis de atividade da QT aumentados, podendo chegar em até 1000 vezes os dos valores de referência (GRABOWSKI, 2013; HARMANCI; BAYRAKTAR, 2008). QT não é um biomarcador específico para DG, visto que este pode estar elevado em diferentes condições. Porém, esse biomarcador pode ser usado para monitorar a eficácia do tratamento, podendo ter um valor prognóstico (STIRNEMANN et al., 2017). Além disso, tanto pacientes com DG quanto indivíduos saudáveis podem apresentar deficiência da enzima QT devido à duplicação bialélica de 24 pares de bases (dup24; rs3831317) no éxon 10 do gene *CHIT1*, o qual codifica essa enzima (GRABOWSKI, 2013).

A CCL18/PARC é sintetizada e liberada pelas CG, resultando em níveis aumentados em até 50 vezes no plasma de pacientes com DG comparados aos indivíduos saudáveis e tem a função de mediar a quimiotaxia dos leucócitos. Essa proteína está diretamente associada com a quantidade de substrato acumulado nos macrófagos e com a resposta ao tratamento, sendo que altos níveis de CCL18/PARC estão associados com um pior prognóstico da doença (STIRNEMANN et al., 2017). Estudos mostram que altos níveis de CCL18/PARC aumentam o risco de desenvolvimento de complicações ósseas, principalmente osteonecrose

(PAVLOVA et al., 2011; PAVLOVA; DEEGAN; COX, 2012), porém esta proteína pode não ser um fator determinante para o diagnóstico da DG uma vez que está alterada em diversas doenças inflamatórias (STIRNEMANN et al., 2017). O uso dessa proteína como biomarcador pode ser uma alternativa para pacientes que apresentam a dup24 no *CHIT1*, e que, portanto, não apresentam níveis elevados de QT.

Outro biomarcador que atualmente tem sido considerado como o mais promissor para DG, por ser mais específico e sensível que QT e CCL18/PARC, é a GlcSph (STIRNEMANN et al., 2017). Esse biomarcador parece ter grande valor para o monitoramento dos pacientes com DG, mas ainda não está acessível à grande parte dos laboratórios (STIRNEMANN et al., 2017). Estudos têm mostrado que os níveis de GlcSph estão elevados no plasma especificamente em pacientes com DG. Pacientes não tratados apresentam níveis plasmáticos de GlcSph até 500 vezes maior quando comparado ao valor de referência. Enquanto a concentração dessa proteína no cérebro de pacientes com DG tipo I apresenta níveis normais, em pacientes com DG tipos II e III os valores de GlcSph podem chegar a mais de 1000 vezes o valor normal (NILSSON; SVENNERHOLM, 1982), destacando seu envolvimento no comprometimento do SNC (ORVISKY et al., 2002). Portanto, o acúmulo de GlcSph pode causar disfunção neuronal, levando principalmente aos sintomas neurológicos relacionados à DG (STIRNEMANN et al., 2017).

Os elevados níveis de GlcSph podem estar relacionados com o genótipo do paciente, o que poderia refletir no progresso e na melhora dos sintomas após o início do tratamento em pacientes com DG. Pacientes homozigotos para N370S apresentam níveis menores de GlcSph que pacientes heterozigotos compostos para N370S/L444P e homozigotos para L444P (DEKKER et al., 2011; ROLFS et al., 2013). Pacientes em tratamento com TRE apresentam níveis reduzidos de GlcSph após os primeiros seis meses (ROLFS et al., 2013), sendo observada uma redução ainda maior em pacientes em tratamento com TRS, mais especificamente com eliglustate (SMID et al., 2016). Estudos têm mostrado que a GlcSph apresenta efeitos tóxicos em diferentes tipos celulares, incluindo oligodendrócitos, células neuronais, células *natural killers* (NK) e osteoblastos, o que contribui para as características clínicas apresentadas pelos pacientes com DG (MISTRY et al., 2010; NAIR et al., 2015; SUEYOSHI; MAEHARA; ITO, 2001; TOHYAMA; MATSUDA; SUZUKI, 2001).

Em virtude da ativação dos macrófagos pelo acúmulo de GC em pacientes com DG, algumas funções do organismo podem ser afetadas, como por exemplo, o metabolismo do ferro. Para avaliar se há um mau funcionamento nesse processo, um importante biomarcador

a ser utilizado é a ferritina, a qual é responsável pelo direcionamento do ferro aos tecidos (LI et al., 2009; ORINO, 2016). Pacientes com DG tipo I geralmente apresentam níveis de ferritina aumentados bem como de hepcidina, a qual é o hormônio regulador da homeostase do ferro, enquanto que os níveis de saturação de transferrina e ferro sérico são mantidos normais. Pacientes com DG geralmente apresentam níveis significativamente reduzidos de ferritina após o início do tratamento (STIRNEMANN et al., 2011). Esse biomarcador é mais utilizado para avaliar a resposta ao tratamento do que como um indicador de gravidade da doença, visto que existem poucos estudos associando esse biomarcador a complicações ósseas e idade de início do tratamento (KOPPE et al., 2016; MEKINIAN et al., 2012; STEIN et al., 2010).

Há diversos biomarcadores descritos para DG, porém, nenhum deles é satisfatoriamente eficiente, específico e confiável para ser utilizado sozinho a fim de auxiliar no prognóstico e na avaliação da taxa de resposta ao tratamento. Portanto, existe uma necessidade de buscar novos biomarcadores que atendam essas características e que sejam específicos para DG. O uso combinado de diferentes biomarcadores em associação aos achados laboratoriais de pacientes com DG poderiam auxiliar no acompanhamento desses pacientes e na eficácia do tratamento.

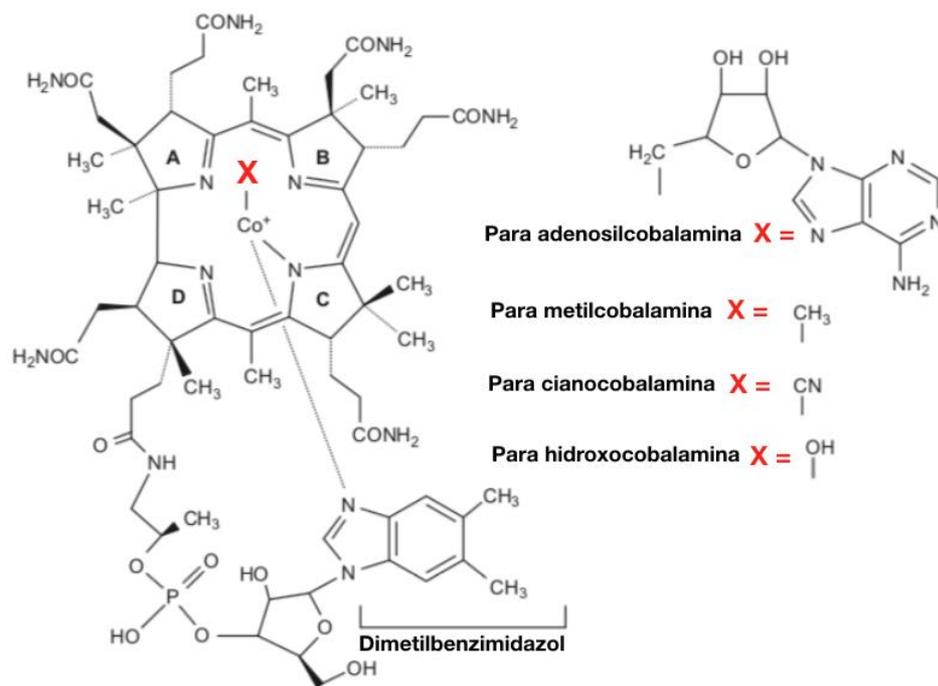
#### **2.2.10 Centro de Referência para doença de Gaucher no Rio Grande do Sul (CRDG-RS)**

O CRDG-RS foi criado em 2003 visando a realização do diagnóstico, o acompanhamento e o tratamento de pacientes com DG de diferentes regiões do Estado do Rio Grande do Sul, e segue as orientações previstas no protocolo do Ministério da Saúde (MS). Esse Centro está localizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), onde há uma equipe multidisciplinar responsável pelo acompanhamento desses pacientes, por meio de consultas, avaliações a partir de exames, além do tratamento de TRE aos pacientes que são encaminhados para o Centro. Atualmente, o CRDG-RS acompanha um total de 45 pacientes, sendo 42 com DG tipo I e 3 com DG tipo III.

### **2.3 Vitamina B<sub>12</sub>**

A vitamina B<sub>12</sub> (B<sub>12</sub>, cobalamina, Cbl) é hidrossolúvel, sintetizada exclusivamente por um pequeno grupo de bactérias sendo estocada primariamente no fígado. A estrutura da B<sub>12</sub> é representada por um íon cobalto (Co) localizado no centro da estrutura em anel tetrapirrólico, o qual é composto por um grupo nucleotídico, que consiste em uma base 5,6-dimetilbenzimidazol (DMB) e uma ribose fosforilada esterificada com 1-amino,2-propanol

(Figura 8). Essa vitamina está presente em alimentos de origem animal, tais como leite, ovos, carne, entre outros. Os seres humanos necessitam de uma ingestão diária de 2,4 µg dessa vitamina (HANNIBAL et al., 2018; STRAND et al., 2013). A Cbl tem um papel extremamente importante em diversos processos, como eritropoiese (RETIEF; GOTTLIEB; HERBERT, 1966), síntese de DNA (HERRMANN; OBEID, 2012), prevenção de problemas cardíacos (HERRMANN; GEISEL, 2002), manutenção da função neurológica (STRAND et al., 2013), além de estar associada ao risco de desenvolvimento de câncer (CHOI et al., 2004).

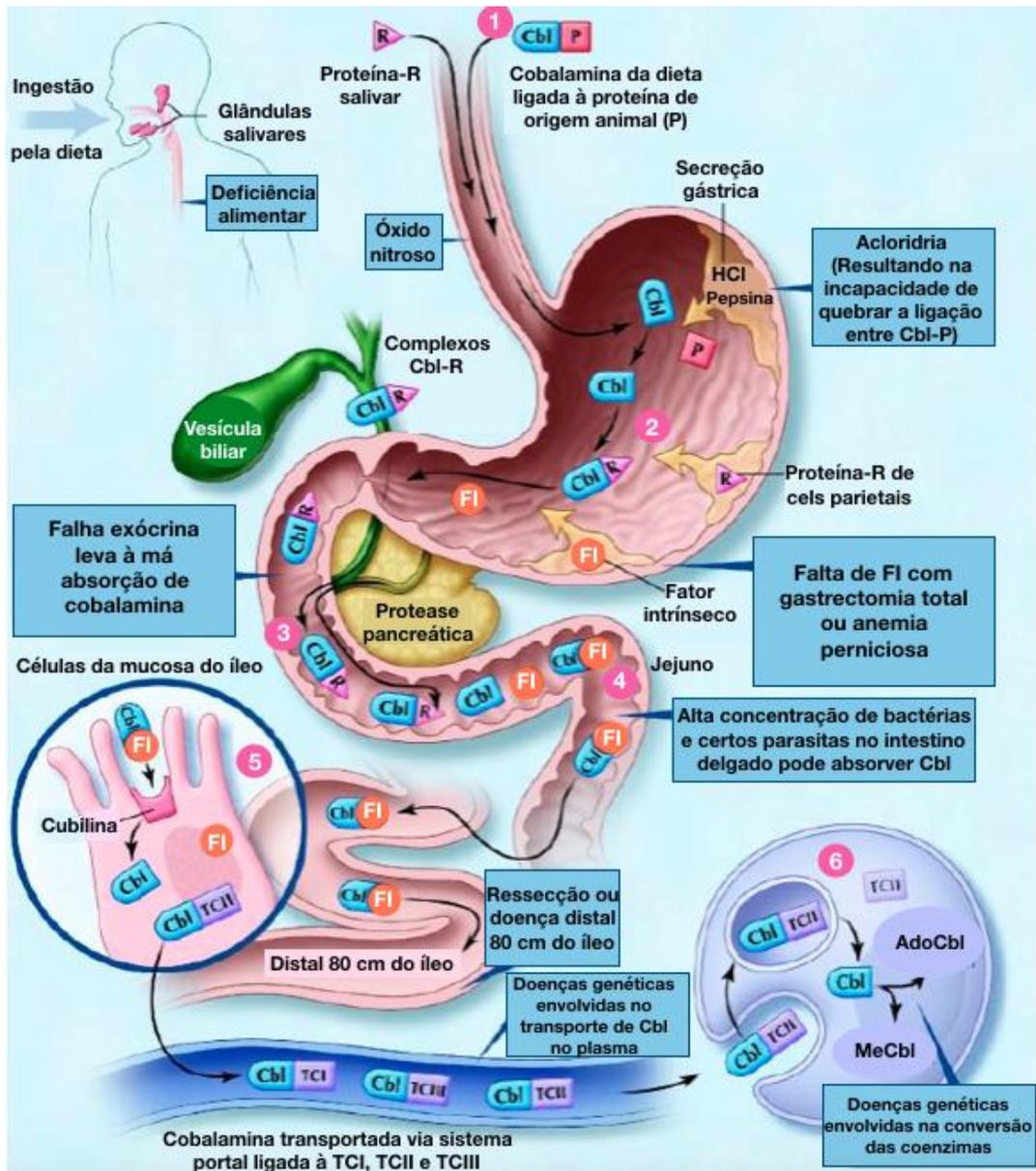


**Figura 8.** Estrutura da vitamina B<sub>12</sub>. A estrutura de cianocobalamina é quando no lugar do X está o grupo – CN. As principais formas biológicas de cobalamina têm o grupo ciano substituído pelos grupos adenosil, metil ou hidroxil, os quais são encontrados nas formas adenosilcobalamina, metilcobalamina e hidroxocobalamina, respectivamente (adaptado de SMITH; WARREN; REFSUM, 2018).

### 2.3.1 Metabolismo da vitamina B<sub>12</sub>

O metabolismo da B<sub>12</sub> é complexo, requer vários processos e uma falha em alguma das etapas envolvidas pode levar à deficiência de B<sub>12</sub>. Em humanos, a absorção de Cbl pela dieta envolve diferentes proteínas, tais como haptocorrina (HC), fator intrínseco (FI) e transcobalamina (TC). A via metabólica da Cbl começa quando a vitamina entra no estômago e é ligada à proteína de origem animal (P). No estômago, pepsina e ácido clorídrico (HCl)

agem rompendo a ligação da proteína (P) com a Cbl, liberando Cbl na forma livre. A maior parte da Cbl livre é então ligada à proteína-R, sendo esta secretada pelas células parietais e salivares. O FI também é secretado no estômago, porém sua ligação à Cbl é fraca na presença de proteína-R. Subsequentemente, o complexo Cbl-R é transportado até o duodeno, onde enzimas pancreáticas degradam esse complexo, liberando Cbl na forma livre. A Cbl é então ligada ao FI. O complexo Cbl-FI permanece intacto até a porção terminal do íleo, onde ocorre a absorção de Cbl por meio de receptores de células da mucosa, chamados de cubilina. Por fim, a Cbl é ligada a proteínas transportadoras, chamadas de TCI, TCII e TCIII. A TCII (embora represente apenas uma pequena fração (aproximadamente 10%) das TCs) é a mais importante, pois é capaz de transportar Cbl para todas as células do corpo. A Cbl ligada à TC é chamada de holo-TC, a qual corresponde à fração de vitamina B<sub>12</sub> metabolicamente ativa. A Cbl é subsequentemente transportada sistemicamente via portal. Dentro de cada célula, o complexo Cbl-TCII é desfeito por endocitose, a Cbl é liberada e convertida enzimaticamente em duas formas de coenzimas: metilcobalamina (MeCbl) e adenosilcobalamina (AdoCbl) (Figura 9). (ANDRÈS et al., 2004).

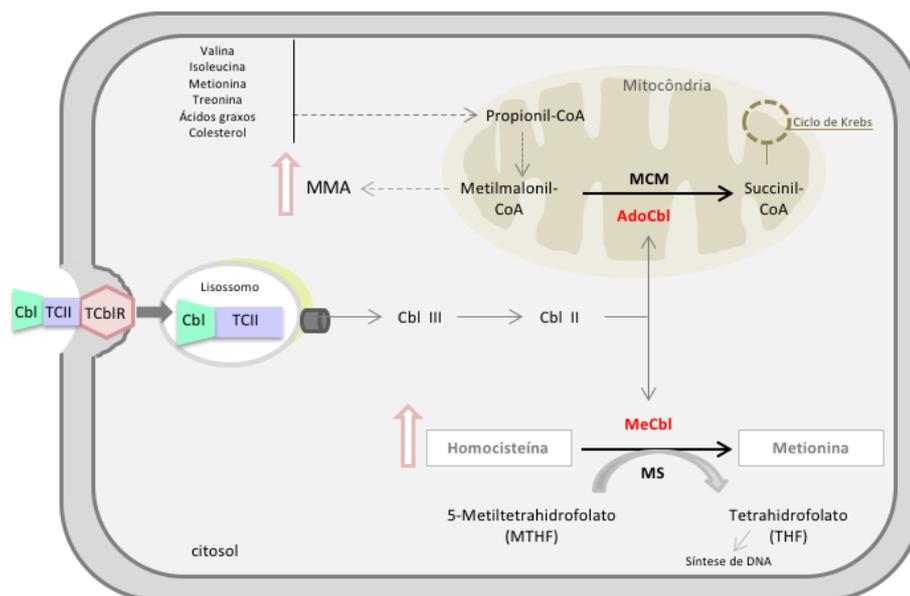


**Figura 9.** Metabolismo da vitamina B<sub>12</sub>. Representação das etapas envolvidas desde a absorção de Cbl através da dieta até sua conversão em duas formas de coenzimas. A figura indica alguns erros que podem ocorrer durante o processo, bem como as doenças associadas (adaptado de ANDRÈS et al., 2004).

A B<sub>12</sub> é absorvida pelas células via endocitose mediada por receptor, e este micronutriente é então liberado da proteína transportadora TC no lisossomo (QUADROS; SEQUEIRA, 2013). Cbl livre sai do lisossomo com o auxílio de duas proteínas, chamadas de transportadores *cbIF* (LMBRD1) e *cbIJ* (ABCD4) (COELHO et al., 2012; GAILUS et al., 2010; RUTSCH et al., 2011). Mutações nos genes *cbIF* e *cbIJ* (COELHO et al., 2012; GAILUS et al., 2010; RUTSCH et al., 2011), bem como distúrbios não relacionados à via

lisossomal e endocítica (STOCKLER et al., 2014; ZHAO et al., 2014), levam à deficiência funcional de vitamina B<sub>12</sub> e ao início de deterioração neurológica.

A Cbl atua como cofator das enzimas metionina sintase (MS) e metilmalonil-CoA mutase (MCM), as quais estão envolvidas na síntese de metionina (Met) a partir de homocisteína (Hcy) e na conversão de metilmalonil-CoA a succinil-CoA, respectivamente (Figura 10). Dessa forma, quando há deficiência de Cbl, as concentrações séricas de homocisteína (Hcy) e ácido metilmalônico (MMA) estão aumentadas (HERRMANN; OBEID, 2012). Tal deficiência pode ocorrer por diferentes causas, seja nutricional devido a uma dieta pobre em Cbl ou funcional em decorrência de falhas na absorção, no processamento intracelular ou no transporte dessa vitamina (HANNIBAL; DIBELLO; JACOBSEN, 2013).

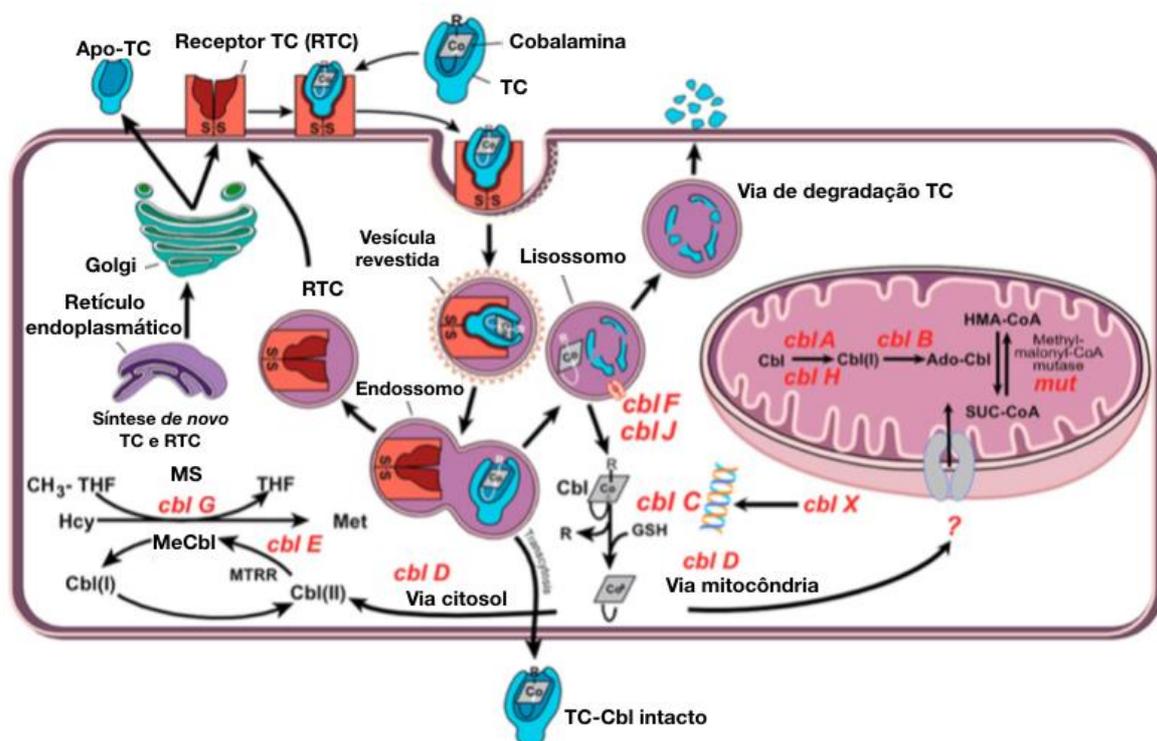


**Figura 10.** Representação esquemática das reações que necessitam de Cbl como cofator. No citosol, a Cbl atua na forma de MeCbl como cofator da enzima MS na conversão de Hcy a Met. Na mitocôndria, a Cbl atua na forma de AdoCbl como cofator da enzima MCM na conversão de metilmalonil-CoA a succinil-CoA (Autora, 2019).

### 2.3.2 Status de B<sub>12</sub>

Os sintomas de deficiência de B<sub>12</sub> variam desde anemia megaloblástica, problemas neurológicos, sintomas cardiovasculares e até mesmo acidúria metilmalônica, entre outras (SMITH; WARREN; REFSUM, 2018). Insuficiência de B<sub>12</sub> em humanos é causada não

somente pela quantidade de ingestão desse micronutriente ou pela má absorção, mas também por doenças genéticas relacionadas a problemas na absorção e no transporte dessa vitamina, como alguns EIM causados por mutações em genes que codificam proteínas específicas envolvidas nesses processos (WATKINS; ROSENBLATT, 2013). São conhecidos diferentes grupos de genes, chamados de *cblA-G* e *mut*, os quais estão associados ao metabolismo e ao transporte da B<sub>12</sub>. Uma alteração em cada um desses genes será responsável por uma determinada condição associada a um dado fenótipo (Figura 11) (HANNIBAL et al., 2016; SMITH; WARREN; REFSUM, 2018).



**Figura 11.** Processamento celular e tráfego da vitamina B<sub>12</sub> proveniente da dieta. A Cbl entra na célula via endocitose mediada pelo receptor TC (RTC). No lisossomo, a Cbl é liberada, a apo-TC é degradada e o RTC é retornado à superfície celular para ser reutilizado. Cbl sai do lisossomo via transportadores *cblF/cblJ*. No citosol, Cbl sofre processamento pela enzima *cblC*. Após seu processamento, a Cbl é direcionada através da *cblD* para o citosol, onde irá atuar como cofator da MS ou para a mitocôndria, onde irá atuar como cofator da MCM. Deficiências nutricionais e funcionais da B<sub>12</sub> levam à inativação das enzimas MS e MCM e aumento nos níveis dos metabólitos tHcy e MMA (adaptado de HANNIBAL et al., 2016).

A deficiência de B<sub>12</sub> pode causar danos neurológicos irreversíveis, os quais necessitam de uma detecção precoce para o manejo dos pacientes. Sendo assim, a análise dos

níveis dos metabólitos tHcy e MMA é extremamente importante para avaliar o *status* desse micronutriente (HERRMANN; OBEID, 2013). Muitas vezes, a deficiência de B<sub>12</sub> apresenta sintomas não específicos, como fadiga, mal-estar, vertigem e comprometimento cognitivo, os quais podem ser atribuídos à idade avançada. Portanto, uma detecção precoce da deficiência de B<sub>12</sub> deve ser realizada visando evitar o agravamento dos sintomas apresentados (Figura 12) (PALACIOS et al., 2013). Recentemente, uma nova ferramenta para diagnóstico de insuficiência de B<sub>12</sub> foi proposta, a qual utiliza dados combinados de quatro biomarcadores: B<sub>12</sub>, holo-TC, tHcy e MMA como indicadores do *status* de B<sub>12</sub> (FEDOSOV et al., 2015). Tal ferramenta encontra-se restrita à pesquisa, pois necessita de validação, principalmente quanto aos aspectos cognitivos (KVESTAD et al., 2017; SMITH; WARREN; REFSUM, 2018). O diagnóstico de insuficiência de B<sub>12</sub> ainda é um desafio, visto que não há um teste padrão-ouro estabelecido para definir uma deficiência desse micronutriente e a avaliação clínica é um fator extremamente importante nesse processo (SMITH; WARREN; REFSUM, 2018).



**Figura 12.** Representação de algumas características clínicas apresentadas por indivíduos com deficiência de B<sub>12</sub> (adaptado de HUNT; HARRINGTON; ROBINSON, 2014).

Existe uma tendência no aumento da prevalência de deficiência de B<sub>12</sub> conforme o aumento da idade, mas isso não está bem elucidado (BAILEY et al., 2011). Muitas vezes, a deficiência desse micronutriente em idosos é acompanhada de alterações metabólicas devido à maior propensão de desenvolver disfunção gástrica e outras complicações que interferem na

absorção da vitamina B<sub>12</sub> (HANNIBAL et al., 2016). De uma forma geral, a prevalência de deficiência de B<sub>12</sub> é alta em diferentes grupos na população, variando de 30 – 60%. Em países como a Índia, onde grande parte da população é vegetariana, mais de 70% das mulheres grávidas apresentam níveis insuficientes de B<sub>12</sub>, o que representa grandes implicações de saúde tanto para a mãe quanto para o bebê (SMITH; WARREN; REFSUM, 2018; YAJNIK et al., 2008). Cabe destacar que vegetarianos e veganos geralmente apresentam insuficiência de B<sub>12</sub>, variando de 11 até 90% dos casos (RIZZO et al., 2016).

### **2.3.3 Biomarcadores do *status* de B<sub>12</sub>**

Estudos apontam que os metabólitos tHcy e MMA são considerados indicadores mais sensíveis dos níveis de vitamina B<sub>12</sub> do que a dosagem dessa vitamina no soro (VOGIATZOGLOU et al., 2009). Um resultado normal de Cbl no soro pode não refletir o estado funcional adequado de B<sub>12</sub> (DAVID SMITH; REFSUM, 2012). Apenas cerca de 20% da vitamina B<sub>12</sub> total no soro está na forma ativa de holo-TC (NEXO; HOFFMANN-LÜCKE, 2011). Portanto, a dosagem de Cbl total no soro não é sensível para verificar a deficiência dessa vitamina. Para um diagnóstico mais preciso e para poder avaliar funcionalmente a B<sub>12</sub> é necessário dosar os níveis de holo-TC (DEVALIA et al., 2014) e de seus biomarcadores funcionais MMA e tHcy no plasma (Tabela 1) (APARICIO-UGARRIZA et al., 2015; YETLEY et al., 2011). Uma deficiência de B<sub>12</sub> não diagnosticada pode ser uma falha grave na prevenção de sintomas expressivos que os pacientes podem apresentar, principalmente em relação ao desenvolvimento neurológico (SPENCE, 2016).

**Tabela 1.** Biomarcadores do *status* de B<sub>12</sub> com suas vantagens e limitações.

Biomarcador	Utilidade	Vantagens	Desvantagens
Vitamina B <sub>12</sub>	Fornece informação sobre o <i>status</i> de B <sub>12</sub> e estoque no fígado. É um indicador razoável do <i>status</i> de B <sub>12</sub> em um grupo populacional. Correlacionado com a ingestão de B <sub>12</sub> . Geralmente seu valor sobre o <i>status</i> de B <sub>12</sub> discorda com outros biomarcadores.	Ensaio amplamente disponível e de baixo custo. Não sofre influência por ingestão recente de B <sub>12</sub> . Não necessita de jejum antes da coleta da amostra. Não é influenciado pela idade do indivíduo.	Leva meses para aumentar após a ingestão pela dieta ou suplementação de baixa dose, mas responde a intervenções de alta dose. Pode resultar em falso positivo.
Holo-TC	Fornece informação da B <sub>12</sub> disponível para as células. É correlacionada com a ingestão de B <sub>12</sub> .	Maior sensibilidade à ingestão recente, respondendo em algumas horas. É um indicador mais sensível de deficiência do que a B <sub>12</sub> sérica, mas a prevalência populacional de deficiência é similar. Não sofre influência por infecção.	Concentrações podem estar aumentadas pela ingestão recente se os estoques estiverem baixos. Os ensaios são limitados comparados à B <sub>12</sub> . Não é um indicador funcional do <i>status</i> de B <sub>12</sub> . Custo mais elevado que a B <sub>12</sub> sérica e menos disponível nos laboratórios.
MMA	Reflete o nível de B <sub>12</sub> para a função metabólica (atividade da MCM). Concentrações aumentam quando B <sub>12</sub> < 300 pmol/L.	O biomarcador mais sensível para o <i>status</i> de B <sub>12</sub> . Reflete estoque no fígado. Responde mais rapidamente a intervenções que a B <sub>12</sub> , mas não à ingestão recente. Não sofre influência pelos níveis de folato nem pelo <i>status</i> de vitamina B <sub>6</sub> .	Análise requer um equipamento de alto custo. Os níveis aumentam conforme a idade, não sendo totalmente decorrente de disfunção hepática. Aumenta em indivíduos com disfunção renal e necessita da mensuração de creatinina especialmente em idosos.
tHcy	Reflete o nível de B <sub>12</sub> para a função metabólica (atividade da MS). Concentrações aumentam quando B <sub>12</sub> < 300 pmol/L.	tHcy responde rapidamente à melhora no <i>status</i> de indivíduos com deficiência de B <sub>12</sub> .	Não é específico para avaliar o <i>status</i> de B <sub>12</sub> , visto que os níveis estão elevados em outras condições como deficiência de folato e vitamina B <sub>6</sub> , além de insuficiência renal e hipotireoidismo.

B<sub>12</sub>: Vitamina B<sub>12</sub>; holo-TC: holo-transcobalamina; MMA: ácido metilmalônico; tHcy: homocisteína total (adaptado de ALLEN et al., 2018).

O teste preferencialmente utilizado para determinar o *status* de B<sub>12</sub> é a mensuração dos níveis totais dessa vitamina no soro, sendo um ensaio disponível na maioria dos laboratórios (APARICIO-UGARRIZA et al., 2015; HUNT; HARRINGTON; ROBINSON, 2014). Os valores de referência variam de acordo com cada laboratório, mas as definições mais utilizadas pelos laboratórios são: normais (>250 pmol/L), baixos níveis (150-249 pmol/L) e deficiência aguda (<149 pmol/L) (CLARKE et al., 2003; MIRKAZEMI et al., 2012; SELHUB et al., 2008).

Estudos mostram que os níveis séricos de B<sub>12</sub> nem sempre representam o *status* celular dessa vitamina (CARMEL, 2000; DEVALIA et al., 2014; LYSNE et al., 2016; SOLOMON, 2004). Pacientes com EIM da vitamina B<sub>12</sub> podem apresentar níveis séricos normais de B<sub>12</sub> e ao mesmo tempo uma deficiência dessa vitamina a nível celular (GREEN, 2017; HANNIBAL et al., 2016; SOLOMON, 2015). Solomon e colaboradores (2015) identificaram uma deficiência funcional de B<sub>12</sub> devido ao estresse oxidativo em idosos que apresentavam valores séricos normais de B<sub>12</sub>.

Apesar dos níveis séricos isolados de B<sub>12</sub> não refletirem o *status* dessa vitamina, quando elevados auxiliam na avaliação de doenças tais como câncer (ARENDDT et al., 2016) e síndrome linfoproliferativa autoimune (conhecida como ALPS) (BOWEN et al., 2012). Níveis elevados de vitamina B<sub>12</sub> estão associados com inflamação e a maioria desses casos envolve fisiopatologicamente uma desordem de TCs que pode ser tanto quantitativa como qualitativa (ANDRÈS et al., 2013).

Em idosos, a holo-TC tem sido o biomarcador mais indicado para avaliar o *status* de B<sub>12</sub> comparado aos metabólitos tHcy e MMA (VALENTE et al., 2011). Os valores de referência desse biomarcador em indivíduos saudáveis é de 20-125 pmol/L (VALENTE et al., 2011). Ainda não estão estabelecidos os mecanismos que controlam a homeostase de holo-TC tanto em indivíduos saudáveis quanto em pacientes com doenças que afetam o metabolismo da vitamina B<sub>12</sub>. Estudos adicionais são necessários para elucidar esses mecanismos e para avaliar o valor diagnóstico desse biomarcador.

A Hcy é um metabólito do metabolismo de 1 carbono que é remetilado pela MeCbl dependente da enzima MS ou pela betaína-homocisteína metiltransferase (BHMT) como parte do ciclo da metionina, e degradado pela cistationina β-sintase (CBS) na via de transulfuração. A conversão de Hcy a Met pela enzima MS depende da disponibilidade de vitamina B<sub>12</sub> e folato como cofatores. Portanto, deficiências nutricionais em algum desses

micronutrientes levam ao acúmulo de tHcy no soro e na urina. Além disso, em casos de EIM que afetam o processamento e o transporte de vitamina B<sub>12</sub> ou de folato levam ao aumento desse metabólito, ocasionando uma condição chamada de hiperhomocisteinemia (HANNIBAL et al., 2016).

Os valores de referência dos níveis plasmáticos normais de tHcy em humanos é de 5-15 µmol/L (UELAND et al., 1993), sendo que em alguns casos os valores acima de 13 µmol/L podem ser considerados elevados em adultos (JACQUES et al., 1999). Além disso, estudos apontam que os intervalos de referência podem variar conforme o gênero e a idade do indivíduo (JACOBSEN et al., 1994; RASMUSSEN et al., 1996; VAN BEYNUM et al., 2005). Os níveis de tHcy são mais elevados no soro comparados aos níveis desse metabólito no plasma devido à liberação de Hcy ligada aos componentes celulares (JACOBSEN et al., 1994). Apesar de ser um biomarcador de deficiência de B<sub>12</sub>, a tHcy não é um indicador específico de deficiência de B<sub>12</sub>, visto que suas concentrações também são elevadas em outras condições como deficiência de folato, deficiência de B<sub>6</sub> e em pacientes com doença renal e hipotireoidismo (DEVALIA et al., 2014; HUNT; HARRINGTON; ROBINSON, 2014). Portanto, esse biomarcador não é indicado para determinar o *status* de B<sub>12</sub>, se utilizado isolado (HANNIBAL et al., 2016).

Níveis de MMA aumentam quando ocorre a inativação da enzima MCM, a qual é dependente de AdoCbl na mitocôndria. Deficiências nutricional e funcional de B<sub>12</sub> resultam na inativação da MCM levando ao acúmulo do seu substrato metilmalonil-CoA, o qual entra na circulação como MMA livre. A reação catalisada pela MCM não é afetada por outras vitaminas do metabolismo de um carbono, sendo esse biomarcador mais específico para determinar o *status* de B<sub>12</sub> (CLARKE et al., 2003). Valores séricos de MMA entre 260 – 350 nmol/L indicam níveis elevados desse metabólito (CLARKE et al., 2003) Porém, cabe ressaltar que existem algumas condições patológicas, como insuficiência renal, que levam ao aumento dos níveis de MMA (IQBAL et al., 2013). Estudos já mostraram casos de indivíduos com níveis elevados de vitamina B<sub>12</sub> que também apresentavam concentrações elevadas de MMA, o que poderia refletir a ocorrência de insuficiência renal nesses indivíduos em vez de deficiência de B<sub>12</sub> (CLARKE et al., 2003).

Dessa forma, recomenda-se o uso combinado de diferentes biomarcadores para avaliar o *status* de B<sub>12</sub> (HANNIBAL et al., 2016; IQBAL et al., 2013).

### 2.3.4 Vitamina B<sub>12</sub> e doença de Gaucher

Algumas manifestações clínicas da DG são observadas em indivíduos com deficiência de vitamina B<sub>12</sub>, principalmente em relação ao envolvimento neurológico, sugerindo que exista um mecanismo de patogênese comum a essas doenças. Uma hipótese é que a disfunção lisossomal na DG leva à deficiência funcional de vitamina B<sub>12</sub> por uma falha em algum dos processos, tais como: absorção, degradação intralisossomal de TC ou no transporte de B<sub>12</sub> para o citoplasma, comprometendo as reações bioquímicas em que a B<sub>12</sub> atua como cofator (MS e MCM). Ainda não está estabelecido se o acúmulo de glicosíngolipídeos afeta o tráfego de vitamina B<sub>12</sub> dentro do lisossomo e se prejudica o seu transporte para o citoplasma (HANNIBAL et al., 2017).

Estudos que avaliaram precocemente o *status* de vitamina B<sub>12</sub> em pacientes com DG reportaram altos níveis de TC circulante que não foram correlacionados com níveis séricos de B<sub>12</sub>, sugerindo que o aumento dos níveis de TC na DG resultam de um processo inflamatório. Porém, cabe destacar que outros biomarcadores do *status* de B<sub>12</sub>, como MMA e tHcy, não foram mensurados (GILBERT; WEINREB, 1976). Embora a holo-TC represente a fração bioativa de B<sub>12</sub>, há uma limitação quanto ao uso isolado desse biomarcador na verificação do *status* de B<sub>12</sub>. Isso porque apenas uma pequena fração desse micronutriente está ligada à holo-TC, permitindo que ocorram variações a nível sérico de holo-TC. Outros estudos identificaram baixos níveis de holo-TC em pacientes com diferentes doenças que não apresentavam deficiência de vitamina B<sub>12</sub> (HANNIBAL et al., 2017).

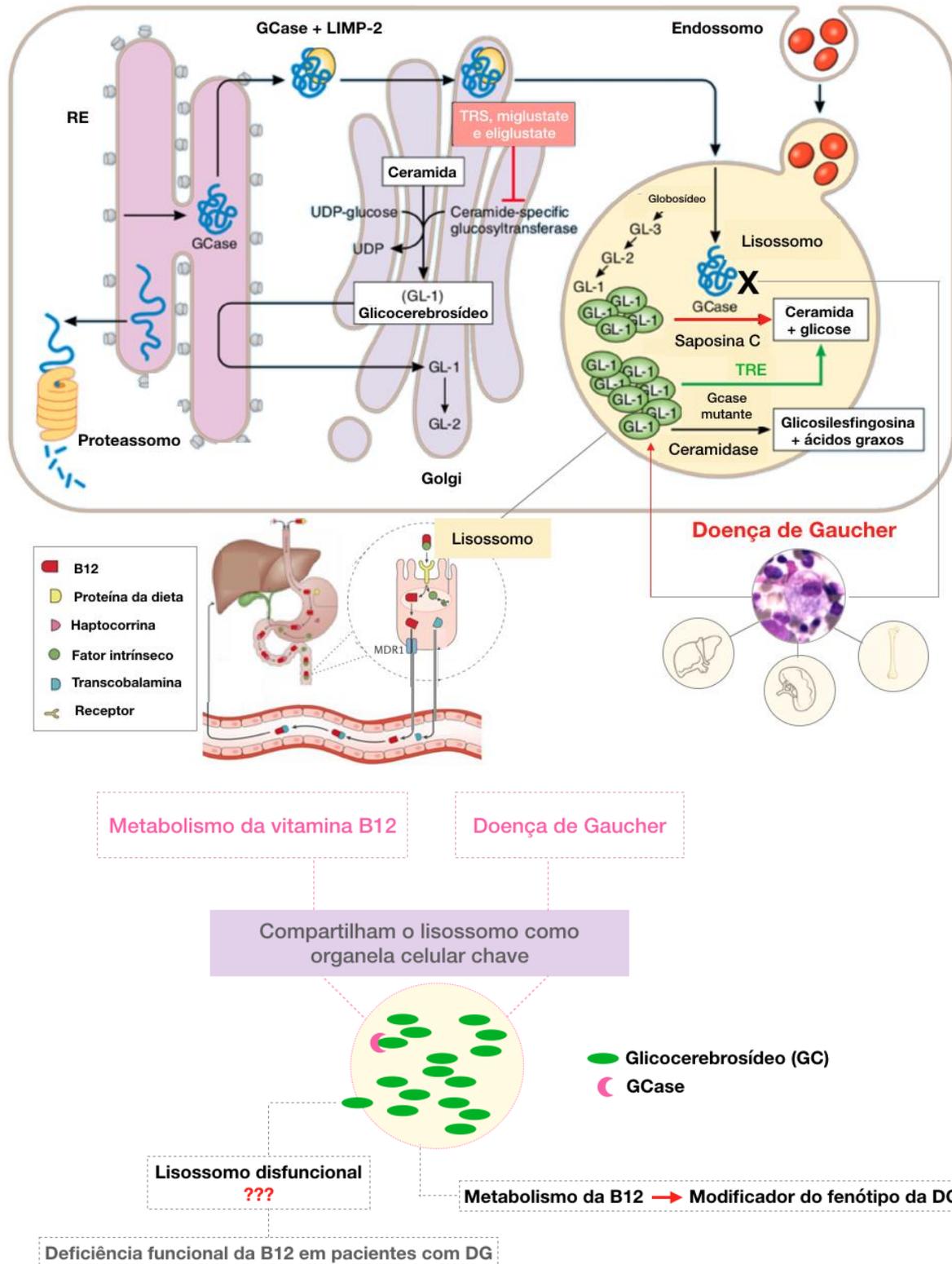
Gielchinsky e colaboradores (2001) avaliaram uma coorte de 85 pacientes com DG, os quais eram judeus Ashkenazi e não realizavam tratamento para a doença, e 122 indivíduos saudáveis. Esse estudo mostrou uma alta incidência de baixos valores séricos de vitamina B<sub>12</sub> e de elevados valores de tHcy e MMA; porém, esses achados não foram estatisticamente significativos em relação aos controles, visto que a maioria dos indivíduos saudáveis de origem Ashkenazi apresentam baixos níveis de vitamina B<sub>12</sub>. Esse *status* de vitamina B<sub>12</sub> nessa população específica pode ser devido ao fato de ser frequente a doação de sangue, o que poderia prejudicar o estoque desse micronutriente no fígado, além das diferenças étnicas entre esses indivíduos (ELSTEIN et al., 1998; GIELCHINSKY et al., 2001; HANNIBAL et al., 2017; VEINOT et al., 1999).

Elstein e colaboradores (1998) realizaram um estudo baseado em um questionário e identificaram uma alta incidência de complicações neurológicas em pacientes com as formas neuropáticas da DG, sendo que estes pacientes apresentaram concomitantemente deficiência

de vitamina B<sub>12</sub> e gamopatias. Porém, os níveis dos metabólitos tHcy e MMA não foram analisados nesse estudo, o que dificulta a avaliação do *status* de vitamina B<sub>12</sub> nesses pacientes.

Um estudo longitudinal e observacional de uma coorte envolvendo oito centros de diferentes países da Europa avaliou o *status* de vitamina B<sub>12</sub> em pacientes adultos com DG tipo I na presença ou na ausência de polineuropatia. Os resultados mostraram uma elevação estatisticamente significativa nos níveis séricos de tHcy e MMA em pacientes com polineuropatia comparados aos que não tinham comprometimento neurológico, com valores variando de baixos a normais de vitamina B<sub>12</sub> em ambos os grupos. Contudo, cabe ressaltar que os pacientes de ambos os grupos apresentaram níveis dos metabólitos tHcy e MMA dentro dos valores de referência, o que pode ter sido por estarem recebendo tratamento com TRE há mais de dois anos (BIEGSTRATEN et al., 2010).

### 3. MARCO CONCEITUAL



**Figura 13.** Marco conceitual da DG envolvendo o metabolismo da vitamina B<sub>12</sub>.

#### 4. JUSTIFICATIVA

A DG apresenta alta heterogeneidade fenotípica, apesar de ter sua causa definida. Embora cerca de 500 mutações no gene *GBAI* já tenham sido descritas como causadoras da doença, não há uma associação bem estabelecida entre determinada mutação e as diferentes manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes. Dessa forma, sabe-se que existem diversos fatores, como modificadores genéticos, que contribuem para a variabilidade fenotípica observada em pacientes com DG. Portanto, conhecer os mecanismos fisiopatogênicos envolvidos na DG é extremamente importante para que seja possível melhorar o manejo desses pacientes. Apesar de o tratamento ser uma excelente estratégia terapêutica, há diferenças interpessoais na resposta clínico-laboratorial aos medicamentos utilizados.

Tendo em vista que a DG é causada por uma deficiência enzimática que ocorre devido a mutações patogênicas no gene que codifica essa enzima, o diagnóstico genético da DG é recomendado e deve ser realizado. Muitos laboratórios realizam a investigação das mutações mais comuns e acabam não identificando o genótipo completo dos pacientes. É importante que seja realizada a análise genética de todo o gene *GBAI* para identificação das mutações bialélicas. Em alguns casos, há pacientes que não apresentam o genótipo definido mesmo tendo realizado a análise completa do gene por sequenciamento. Cabe ressaltar que cada metodologia apresenta suas limitações e os pesquisadores devem ter isso em mente. Nesses casos, sabendo a clínica do paciente, é essencial realizar a análise molecular utilizando diferentes metodologias. A técnica de *Multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA) permite detectar a presença de deleções e duplicações em determinadas regiões do genoma. O emprego dessa técnica para investigar alterações no gene *GBAI* em pacientes com DG é extremamente útil, visto que há casos em que não são identificadas as alterações causadoras da doença. Essa metodologia é inovadora e foi realizada pela primeira vez em pacientes com DG, o que permitirá que outras pessoas tenham conhecimento e acesso a este método, favorecendo o uso dessa técnica para investigar a presença de deleções e duplicações no gene *GBAI* em pacientes com DG que não apresentam genótipo estabelecido. Além disso, a identificação dessas alterações genéticas no *GBAI* pode contribuir para o melhor entendimento da DG.

Por se tratar de uma doença rara, existem poucos estudos de frequências alélicas de mutações no Brasil. Sendo assim, faz-se necessário a realização de um estudo mais abrangente, que possa representar os pacientes com DG de todas as regiões do país. A

iniciativa de caracterizar pacientes com DG de diferentes Centros de Referência para a doença partiu do CRDG-RS, o qual dispõe de laboratório de investigação genética, e que auxilia na caracterização genética de pacientes de outras regiões. O presente estudo proporcionou a parceria entre os Centros com objetivos em comum, que é fazer o melhor para os pacientes. Portanto, a caracterização de pacientes com DG de diferentes regiões do país é de suma relevância para estabelecer se existe um perfil alélico específico em determinadas regiões por meio da comparação das frequências alélicas das mutações identificadas nesses pacientes. Saber se existe ou não uma variabilidade de frequências alélicas no *GBA1* em todo o território brasileiro, poderá contribuir para um melhor entendimento da doença e auxiliar no manejo dos pacientes com DG.

Na DG, a deficiência da enzima GCCase prejudica a conversão de GC em ceramida e glicose, resultando no acúmulo do substrato nos lisossomos. Esse acúmulo de glicosfingolípido pode estar afetando o funcionamento adequado dessa organela. O presente estudo é o primeiro a investigar a relação entre uma doença lisossômica estabelecida e o metabolismo da vitamina B<sub>12</sub>. O metabolismo desse micronutriente pode estar envolvido na modificação do fenótipo dos pacientes com DG, sendo relevante investigar o papel da vitamina B<sub>12</sub> na progressão da doença tanto na parte clínica quanto molecular, uma vez que tanto o metabolismo da B<sub>12</sub> quanto os distúrbios moleculares observados na DG envolvem o lisossomo como um compartimento celular chave. Além disso, foi relatado que níveis de vitamina B<sub>12</sub> estão diminuídos na DG, níveis de holo-TC estão elevados e que pacientes com outras condições neurodegenerativas, como doença de Alzheimer, apresentam anormalidades envolvendo as vias lisossomal, endocítica e celular da vitamina B<sub>12</sub>. Portanto, a investigação do metabolismo de B<sub>12</sub> em pacientes com DG é inovador e importante para avaliar se existe uma deficiência funcional desse micronutriente nesses pacientes, a qual pode ser causada pelo mau funcionamento dos lisossomos devido ao acúmulo de GC.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo geral**

Caracterizar o genótipo e o metabolismo da vitamina B<sub>12</sub> em pacientes com DG.

### **5.2 Objetivos específicos**

5.2.1 Identificar, por meio de MLPA, mutações no *GBAI* em pacientes com DG que não possuíam o genótipo estabelecido;

5.2.2 Avaliar a existência de um perfil alélico específico dos pacientes com DG da região Sul e de outras regiões do Brasil;

5.2.3 Avaliar o metabolismo da vitamina B<sub>12</sub> em células de pacientes com DG;

5.2.4 Analisar biomarcadores do *status* da vitamina B<sub>12</sub> em pacientes com DG.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGHION H. La maladie de Gaucher dans l'enfance. Paris, France: Faculte de Medecine; 1934.
- ALFONSO, Pilar et al. Mutation analysis and genotype/phenotype relationships of Gaucher disease patients in Spain. **Journal of Human Genetics**, [s. l.], v. 52, n. 5, p. 391–396, 2007.
- ALLEN, Lindsay H. et al. OUP accepted manuscript. **Work, Aging and Retirement**, [s. l.], v. 148, n. suppl\_4, p. 1995S–2027S, 2018.
- ANDRÈS, E. et al. The pathophysiology of elevated vitamin b12 in clinical practice. **Qjm**, [s. l.], v. 106, n. 6, p. 505–515, 2013.
- ANDRÈS, Emmanuel et al. Vitamin B12 (cobalamin) deficiency in elderly patients. **Cmaj**, [s. l.], v. 171, n. 3, p. 251–259, 2004.
- APARICIO-UGARRIZA, Raquel et al. A review of the cut-off points for the diagnosis of vitamin B12 deficiency in the general population. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)**, [s. l.], v. 53, n. 8, p. 1149–59, 2015.
- ARENDT, Johan Frederik Håkonsen et al. Elevated plasma vitamin B12 levels and cancer prognosis: A population-based cohort study. **Cancer Epidemiology**, [s. l.], v. 40, p. 158–165, 2016.
- BAILEY, Regan L. et al. Monitoring of vitamin B-12 nutritional status in the United States by using plasma methylmalonic acid and serum vitamin B-12. **The American Journal of Clinical Nutrition**, [s. l.], v. 94, n. 2, p. 552–561, 2011.
- BASGALUPP, Suelen P. et al. Use of a multiplex ligation-dependent probe amplification method for the detection of deletions/duplications in the GBA1 gene in Gaucher disease patients. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, [s. l.], v. 68, p. 17–20, 2018.
- BELLETTATO, Cinzia Maria et al. Inborn Errors of Metabolism Involving Complex Molecules: Lysosomal and Peroxisomal Storage Diseases. **Pediatric Clinics of North America**, [s. l.], v. 65, n. 2, p. 353–373, 2018.
- BEUTLER, E. et al. Gaucher disease: gene frequencies in the Ashkenazi Jewish population. **American journal of human genetics**, [s. l.], v. 52, n. 1, p. 85–8, 1993.
- BEUTLER, Ernest. Gaucher disease: multiple lessons from a single gene disorder. **Acta Paediatrica**, [s. l.], v. 95, n. 0, p. 103–109, 2006.
- BIEGSTRAATEN, M. et al. A monozygotic twin pair with highly discordant Gaucher

phenotypes. **Blood cells, molecules & diseases**, [s. l.], v. 46, n. 1, p. 39–41, 2011.

BIEGSTRAATEN, Marieke et al. Peripheral neuropathy in adult type 1 Gaucher disease: a 2-year prospective observational study. **Brain**, [s. l.], v. 133, n. 10, p. 2909–2919, 2010.

BLANZ, Judith et al. Disease-causing mutations within the lysosomal integral membrane protein type 2 (LIMP-2) reveal the nature of binding to its ligand  $\beta$ -glucocerebrosidase. **Human Molecular Genetics**, [s. l.], v. 19, n. 4, p. 563–572, 2010.

BLAU, Nenad et al. **Physician's guide to the treatment and follow-up of metabolic diseases**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2006.

BODAMER, Olaf A.; HUNG, Christina. Laboratory and genetic evaluation of Gaucher disease. **Wiener medizinische Wochenschrift (1946)**, [s. l.], v. 160, n. 23–24, p. 600–4, 2010.

BOHLEGA, S. et al. Gaucher disease with oculomotor apraxia and cardiovascular calcification (Gaucher type IIIC). **Neurology**, [s. l.], v. 54, n. 1, p. 261–3, 2000.

BOWEN, Raffick A. R. et al. Elevated vitamin B12 levels in autoimmune lymphoproliferative syndrome attributable to elevated haptocorrin in lymphocytes. **Clinical Biochemistry**, [s. l.], v. 45, n. 6, p. 490–492, 2012.

BRADY, R. O. et al. Demonstration of a deficiency of glucocerebrosidase-cleaving enzyme in Gaucher's disease. **The Journal of clinical investigation**, [s. l.], v. 45, n. 7, p. 1112–5, 1966.

BRADY, R. O.; KANFER, J. N.; SHAPIRO, D. METABOLISM OF GLUCOCEREBROSIDES. II. EVIDENCE OF AN ENZYMATIC DEFICIENCY IN GAUCHER'S DISEASE. **Biochemical and biophysical research communications**, [s. l.], v. 18, p. 221–5, 1965.

BRAVO, Heydy et al. Investigation of newborns with abnormal results in a newborn screening program for four lysosomal storage diseases in Brazil. **Molecular Genetics and Metabolism Reports**, [s. l.], v. 12, p. 92–97, 2017.

CARMEL, Ralph. Current Concepts in Cobalamin Deficiency. **Annual Review of Medicine**, [s. l.], v. 51, n. 1, p. 357–375, 2000.

CERAVOLO, Ferdinando et al. Combination therapy in a patient with chronic neuronopathic Gaucher disease: a case report. **Journal of Medical Case Reports**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 19, 2017.

CHARROW, Joel; SCOTT, C. Ronald. Long-term treatment outcomes in Gaucher disease. **American Journal of Hematology**, [s. l.], v. 90, p. S19–S24, 2015.

CHOI, Sang-Woon et al. Vitamin B-12 Deficiency Induces Anomalies of Base Substitution and Methylation in the DNA of Rat Colonic Epithelium. **The Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 134, n. 4, p. 750–755, 2004.

CLARKE, Robert et al. Screening for vitamin B-12 and folate deficiency in older persons. **The American Journal of Clinical Nutrition**, [s. l.], v. 77, n. 5, p. 1241–1247, 2003.

COELHO, David et al. Mutations in ABCD4 cause a new inborn error of vitamin B12 metabolism. **Nature Genetics**, [s. l.], v. 44, n. 10, p. 1152–1155, 2012.

COLONETTI, Karina; ROESCH, Luiz Fernando; SCHWARTZ, Ida Vanessa Doederlein. The microbiome and inborn errors of metabolism: Why we should look carefully at their interplay? **Genetics and Molecular Biology**, [s. l.], v. 41, n. 3, p. 515–532, 2018.

COX, Timothy M.; CACHÓN-GONZÁLEZ, M. Begoña. The cellular pathology of lysosomal diseases. **The Journal of Pathology**, [s. l.], v. 226, n. 2, p. 241–254, 2012.

DANDANA, Azza et al. Gaucher Disease: Clinical, Biological and Therapeutic Aspects. **Pathobiology**, [s. l.], v. 83, n. 1, p. 13–23, 2016.

DAVID SMITH, A.; REFSUM, Helga. Do we need to reconsider the desirable blood level of vitamin B12? **Journal of Internal Medicine**, [s. l.], v. 271, n. 2, p. 179–182, 2012.

DAVIDSON, Brad A. et al. **Exploring genetic modifiers of Gaucher disease: The next horizon**. [s.l: s.n.]. v. 39, n. 12, p. 1739-1751, 2018.

DEKKER, Nick et al. Elevated plasma glucosylsphingosine in Gaucher disease: relation to phenotype, storage cell markers, and therapeutic response. **Blood**, [s. l.], v. 118, n. 16, p. e118-27, 2011.

DEVALIA, Vinod et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of cobalamin and folate disorders. **British Journal of Haematology**, [s. l.], v. 166, n. 4, p. 496–513, 2014.

EL-MORSY, Zakarya et al. Glucosidase acid beta gene mutations in Egyptian children with Gaucher disease and relation to disease phenotypes. **World Journal of Pediatrics**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 326–330, 2011.

ELMONEM, Mohamed A.; VAN DEN HEUVEL, Lambertus P.; LEVTCHENKO, Elena N. Immunomodulatory Effects of Chitotriosidase Enzyme. **Enzyme Research**, [s. l.], v. 2016, p.

1–9, 2016.

ELSTEIN, Deborah et al. Echocardiographic assessment of pulmonary hypertension in Gaucher's disease. **The Lancet**, [s. l.], v. 351, n. 9115, p. 1544–1546, 1998.

ELSTEIN, Deborah. Assessment of individual organs: other organs. In: **Gaucher Disease: Basic and Clinical Perspectives**. Unitec House, 2 Albert Place, London N3 1QB, UK: Future Medicine Ltd, 2013. p. 202–213.

EMERY, David W. Gene therapy for genetic diseases: On the horizon. **Clinical and Applied Immunology Reviews**, [s. l.], v. 4, n. 6, p. 411–422, 2004.

FEDOSOV, Sergey N. et al. Combined indicator of vitamin B12 status: Modification for missing biomarkers and folate status and recommendations for revised cut-points. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, [s. l.], v. 53, n. 8, p. 1215–1225, 2015.

FERREIRA, Carlos R. et al. A proposed nosology of inborn errors of metabolism. **Genetics in Medicine**, [s. l.], p. 1–5, 2018.

FERREIRA, Carlos R.; GAHL, William A. Lysosomal storage diseases. **Metabolic Diseases: Foundations of Clinical Management, Genetics, and Pathology**, [s. l.], v. 2, p. 367–440, 2017.

GABRIELLI, Orazio et al. 12 year follow up of enzyme-replacement therapy in two siblings with attenuated mucopolysaccharidosis I: the important role of early treatment. **BMC Medical Genetics**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 19, 2016.

GAILUS, Susann et al. A novel mutation in LMBRD1 causes the cblF defect of vitamin B12 metabolism in a Turkish patient. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 17–24, 2010.

GAUCHER, Philippe CE. De l'epithelioma primitive de las rate, hypertrophie idiopathique de la rate sans leucemie. Paris1882.

GEGG, Matthew E.; SCHAPIRA, Anthony H. V. The role of glucocerebrosidase in Parkinson disease pathogenesis. **The FEBS Journal**, [s. l.], v. 285, n. 19, p. 3591–3603, 2018.

GIELCHINSKY, Y. et al. High prevalence of low serum vitamin B12 in a multi-ethnic Israeli population. **British Journal of Haematology**, [s. l.], v. 115, n. 3, p. 707–709, 2001.

GILBERT, Harriet S.; WEINREB, Neal. Increased Circulating Levels of Transcobalamin II

in Gaucher's Disease. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 295, n. 20, p. 1096–1101, 1976.

GIUGLIANI, Roberto et al. Emerging drugs for the treatment of mucopolysaccharidoses. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 9–26, 2016.

GLEICH, Kurt et al. Abnormal Processing of Autophagosomes in Transformed B Lymphocytes from SCARB2-Deficient Subjects. **BioResearch Open Access**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 40–46, 2013.

GOKER-ALPAN, O. et al. Divergent phenotypes in Gaucher disease implicate the role of modifiers. **Journal of Medical Genetics**, [s. l.], v. 42, n. 6, p. e37–e37, 2005.

GOKER-ALPAN, Ozlem et al. Phenotypic continuum in neuronopathic Gaucher disease: an intermediate phenotype between type 2 and type 3. **The Journal of pediatrics**, [s. l.], v. 143, n. 2, p. 273–6, 2003.

GONZALEZ, Esteban Alberto; BALDO, Guilherme. Gene Therapy for Lysosomal Storage Disorders. **Journal of Inborn Errors of Metabolism and Screening**, [s. l.], v. 5, p. 232640981668978, 2017.

GRABOWSKI, Gregory A. Gaucher disease: lessons from a decade of therapy. **The Journal of Pediatrics**, [s. l.], v. 144, n. 5, p. S15–S19, 2004.

GRABOWSKI, Gregory A. Gaucher disease and other storage disorders. **Hematology. American Society of Hematology. Education Program**, [s. l.], v. 2012, p. 13–8, 2012.

GRABOWSKI, Gregory A. **Advances in Gaucher disease: Basic and clinical perspectives**. Unitec House, 2 Albert Place, London N3 1QB, UK: Future Medicine Ltd, 2013.

GREEN, Ralph. Review Article Vitamin B 12 deficiency from the perspective of a practicing hematologist. **Blood**, [s. l.], v. 129, n. 19, p. 2603–2612, 2017.

HANNIBAL, Luciana et al. Biomarkers and Algorithms for the Diagnosis of Vitamin B12 Deficiency. **Frontiers in Molecular Biosciences**, [s. l.], v. 3, p. 27, 2016.

HANNIBAL, Luciana et al. Hampered Vitamin B12 Metabolism in Gaucher Disease? **Journal of Inborn Errors of Metabolism and Screening**, [s. l.], v. 5, p. 232640981769235, 2017.

HANNIBAL, Luciana et al. Transcellular transport of cobalamin in aortic endothelial cells. **FASEB Journal**, [s. l.], v. 32, n. 10, p. 5506–5519, 2018.

HANNIBAL, Luciana; DIBELLO, Patricia M.; JACOBSEN, Donald W. Proteomics of vitamin B12 processing. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, [s. l.], v. 51, n. 3, p. 477–88, 2013.

HARDING, Cary O. Gene and Cell Therapy for Inborn Errors of Metabolism. In: **Inherited Metabolic Diseases**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2017. p. 155–171.

HARMANCI, Ozgur; BAYRAKTAR, Yusuf. Gaucher disease: new developments in treatment and etiology. **World journal of gastroenterology**, [s. l.], v. 14, n. 25, p. 3968–73, 2008.

HERRMANN, Wolfgang; GEISEL, Jürgen. Vegetarian lifestyle and monitoring of vitamin B-12 status. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, [s. l.], v. 326, n. 1–2, p. 47–59, 2002.

HERRMANN, Wolfgang; OBEID, Rima. Cobalamin Deficiency. In: [s.l: s.n.]. p. 301–322.

HERRMANN, Wolfgang; OBEID, Rima. Utility and limitations of biochemical markers of vitamin B12 deficiency. **European Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 43, n. 3, p. 231–237, 2013.

HOFFMANN, Georg F.; ZSCHOCKE, Johannes; NYHAN, William L. Inherited Metabolic Diseases: A Clinical Approach. **Inherited Metabolic Diseases: A Clinical Approach**, [s. l.], p. 1–605, 2017.

HOLLAK, Carla E. M. et al. Limitations of drug registries to evaluate orphan medicinal products for the treatment of lysosomal storage disorders. **Orphanet journal of rare diseases**, [s. l.], v. 6, p. 16, 2011.

HOLLAK, Carla EM et al. Enzyme therapy for the treatment of type 1 Gaucher disease: clinical outcomes and dose – response relationships. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 10, n. 16, p. 2641–2652, 2009.

HOROWITZ, M. et al. The human glucocerebrosidase gene and pseudogene: structure and evolution. **Genomics**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 87–96, 1989.

HOROWITZ, Mia; ZIMRAN, Ari. Mutations causing gaucher disease. **Human Mutation**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 1–11, 1994.

HRUSKA, Kathleen S. et al. Gaucher disease: mutation and polymorphism spectrum in the glucocerebrosidase gene (GBA). **Human Mutation**, [s. l.], v. 29, n. 5, p. 567–583, 2008.

HUANG, W. J.; ZHANG, X.; CHEN, W. W. Gaucher disease: a lysosomal neurodegenerative disorder. **European review for medical and pharmacological sciences**, [s. l.], v. 19, n. 7, p. 1219–26, 2015.

HUGHES, Derrallynn A. Enzyme, substrate, and myeloma in Gaucher disease. **American Journal of Hematology**, [s. l.], v. 84, n. 4, p. 199–201, 2009.

HUGHES, Derrallynn A.; PASTORES, Gregory M. The pathophysiology of GD – current understanding and rationale for existing and emerging therapeutic approaches. **Wiener Medizinische Wochenschrift**, [s. l.], v. 160, n. 23–24, p. 594–599, 2010.

HUNT, Alesia; HARRINGTON, Dominic; ROBINSON, Susan. Vitamin B12 deficiency. **BMJ (Clinical research ed.)**, [s. l.], v. 349, p. g5226, 2014.

IQBAL, Navaid et al. Serum methylmalonic acid and holotranscobalamin-II as markers for vitamin B12 deficiency in end-stage renal disease patients. **Annals of clinical and laboratory science**, [s. l.], v. 43, n. 3, p. 243–9, 2013.

JACOBSEN, D. W. et al. Rapid HPLC determination of total homocysteine and other thiols in serum and plasma: sex differences and correlation with cobalamin and folate concentrations in healthy subjects. **Clinical chemistry**, [s. l.], v. 40, n. 6, p. 873–81, 1994.

JACQUES, Paul F. et al. The Effect of Folic Acid Fortification on Plasma Folate and Total Homocysteine Concentrations. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 340, n. 19, p. 1449–1454, 1999.

KANG, Lulu et al. A rare form of Gaucher disease resulting from saposin C deficiency. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, [s. l.], v. 68, p. 60–65, 2018.

KOPPE, Tiago et al. The prognostic value of the serum ferritin in a southern Brazilian cohort of patients with Gaucher disease. **Genetics and molecular biology**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 30–4, 2016.

KÖRSCHEN, Heinz G. et al. The Non-lysosomal  $\beta$ -Glucosidase GBA2 Is a Non-integral Membrane-associated Protein at the Endoplasmic Reticulum (ER) and Golgi. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 288, n. 5, p. 3381–3393, 2013.

KRUSZKA, Paul; REGIER, Debra. Inborn Errors of Metabolism: From Preconception to Adulthood. **American family physician**, [s. l.], v. 99, n. 1, p. 25–32, 2019.

KVESTAD, Ingrid et al. Vitamin B-12 status in infancy is positively associated with

development and cognitive functioning 5 y later in Nepalese children. **The American Journal of Clinical Nutrition**, [s. l.], v. 105, n. 5, p. 1122–1131, 2017.

LANDGREN, Ola et al. Risk of Malignant Disease Among 1525 Adult Male US Veterans With Gaucher Disease. **Archives of Internal Medicine**, [s. l.], v. 167, n. 11, p. 1189, 2007.

LI, Jau Yi et al. Scara5 is a ferritin receptor mediating non-transferrin iron delivery. **Developmental cell**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 35–46, 2009.

LYSNE, Vegard et al. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Activation is Associated with Altered Plasma One-Carbon Metabolites and B-Vitamin Status in Rats. **Nutrients**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 26, 2016.

MARKUSZEWSKA-KUCZYNSKA, Alicja et al. Atypical cytomorphology of Gaucher cells is frequently seen in bone marrow smears from untreated patients with Gaucher disease type 1. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, [s. l.], v. 53, n. 1, p. 62–69, 2015.

MCGILL, JJ et al. Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis VI from 8 weeks of age—a sibling control study. **Clinical Genetics**, [s. l.], v. 77, n. 5, p. 492–498, 2010.

MEIKLE, P. J. et al. Prevalence of lysosomal storage disorders. **JAMA**, [s. l.], v. 281, n. 3, p. 249–54, 1999.

MEKINIAN, Arsène et al. Ferritinemia during type 1 Gaucher disease: mechanisms and progression under treatment. **Blood cells, molecules & diseases**, [s. l.], v. 49, n. 1, p. 53–7, 2012.

MIGNOT, Cyril et al. Type 2 Gaucher disease: 15 new cases and review of the literature. **Brain & development**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 39–48, 2006.

MIRKAZEMI, C. et al. Vitamin B12 deficiency in Australian residential aged care facilities. **The journal of nutrition, health & aging**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 277–80, 2012.

MISTRY, P. K. et al. Glucocerebrosidase gene-deficient mouse recapitulates Gaucher disease displaying cellular and molecular dysregulation beyond the macrophage. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 107, n. 45, p. 19473–19478, 2010.

MISTRY, Pramod K. et al. Gaucher disease and malignancy: a model for cancer pathogenesis in an inborn error of metabolism. **Critical reviews in oncogenesis**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 235–46, 2013.

MISTRY, Pramod K. et al. Gaucher disease: Progress and ongoing challenges. **Molecular**

**Genetics and Metabolism**, [s. l.], v. 120, n. 1–2, p. 8–21, 2017.

MOTTA, Marialetizia et al. Gaucher disease due to saposin C deficiency is an inherited lysosomal disease caused by rapidly degraded mutant proteins. **Human Molecular Genetics**, [s. l.], v. 23, n. 21, p. 5814–5826, 2014.

NAIR, Shiny et al. Type II NKT-TFH cells against Gaucher lipids regulate B-cell immunity and inflammation. **Blood**, [s. l.], v. 125, n. 8, p. 1256–71, 2015.

NEXO, Ebba; HOFFMANN-LÜCKE, Elke. Holotranscobalamin, a marker of vitamin B-12 status: analytical aspects and clinical utility. **The American journal of clinical nutrition**, [s. l.], v. 94, n. 1, p. 359S–365S, 2011.

NILSSON, Olle; SVENNERHOLM, Lars. Accumulation of Glucosylceramide and Glucosylsphingosine (Psychosine) in Cerebrum and Cerebellum in Infantile and Juvenile Gaucher Disease. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 39, n. 3, p. 709–718, 1982.

NYHAN, William L. et al. **Atlas of inherited metabolic diseases**. [s.l.] : Hodder Arnold, 2012.

ORINO, Koichi. Physiological implications of mammalian ferritin-binding proteins interacting with circulating ferritin and a new aspect of ferritin- and zinc-binding proteins. **BioMetals**, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 15–24, 2016.

ORVISKY, Eduard et al. Glucosylsphingosine accumulation in tissues from patients with Gaucher disease: correlation with phenotype and genotype. **Molecular genetics and metabolism**, [s. l.], v. 76, n. 4, p. 262–70, 2002.

PALACIOS, Gonzalo et al. Algorithm for the early diagnosis of vitamin B 12 deficiency in elderly people. **Nutr Hosp**, [s. l.], v. 28, n. 5, p. 1447–1452, 2013.

PASTORES, Gregory M.; HUGHES, Derralynn A. **Gaucher Disease**. [s.l.: s.n.], 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301446>>.

PAVLOVA, Elena V. et al. Potential biomarkers of osteonecrosis in Gaucher disease. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, [s. l.], v. 46, n. 1, p. 27–33, 2011.

PAVLOVA, Elena V; DEEGAN, Patrick B.; COX, Timothy M. Biomarkers for osteonecrosis in Gaucher disease. **Expert Opinion on Medical Diagnostics**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 1–13, 2012.

PLATT, Frances M.; LACHMANN, Robin H. Treating lysosomal storage disorders: Current

practice and future prospects. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, [s. l.], v. 1793, n. 4, p. 737–745, 2009.

QUADROS, Edward V.; SEQUEIRA, Jeffrey M. Cellular uptake of cobalamin: transcobalamin and the TCbIR/CD320 receptor. **Biochimie**, [s. l.], v. 95, n. 5, p. 1008–18, 2013.

RASMUSSEN, K. et al. Age- and gender-specific reference intervals for total homocysteine and methylmalonic acid in plasma before and after vitamin supplementation. **Clinical chemistry**, [s. l.], v. 42, n. 4, p. 630–6, 1996.

RECZEK, David et al. LIMP-2 Is a Receptor for Lysosomal Mannose-6-Phosphate-Independent Targeting of  $\beta$ -Glucocerebrosidase. **Cell**, [s. l.], v. 131, n. 4, p. 770–783, 2007.

RETIEF, F. P.; GOTTLIEB, C. W.; HERBERT, V. Mechanism of vitamin B12 uptake by erythrocytes. **The Journal of clinical investigation**, [s. l.], v. 45, n. 12, p. 1907–15, 1966.

RIZZO, Gianluca et al. Vitamin B12 among Vegetarians: Status, Assessment and Supplementation. **Nutrients**, [s. l.], v. 8, n. 12, 2016.

ROLFS, Arndt et al. Glucosylsphingosine Is a Highly Sensitive and Specific Biomarker for Primary Diagnostic and Follow-Up Monitoring in Gaucher Disease in a Non-Jewish, Caucasian Cohort of Gaucher Disease Patients. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 8, n. 11, p. e79732, 2013.

ROZENBERG, R. et al. High frequency of mutation G377S in Brazilian type 3 Gaucher disease patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [s. l.], v. 39, n. 9, p. 1171–1179, 2006.

RUTSCH, Frank et al. LMBRD1: the gene for the cb1F defect of vitamin B12 metabolism. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, [s. l.], v. 34, n. 1, p. 121–126, 2011.

SÁNCHEZ-FERNÁNDEZ, Elena M.; GARCÍA FERNÁNDEZ, José M.; ORTIZ MELLET, Carmen. Glycomimetic-based pharmacological chaperones for lysosomal storage disorders: Lessons from Gaucher, GM1-gangliosidosis and Fabry diseases. **Chemical Communications**, [s. l.], v. 52, n. 32, p. 5497–5515, 2016.

SCHNABEL, D.; SCHRÖDER, M.; SANDHOFF, K. Mutation in the sphingolipid activator protein 2 in a patient with a variant of Gaucher disease. **FEBS letters**, [s. l.], v. 284, n. 1, p. 57–9, 1991.

SELHUB, Jacob et al. The use of Blood Concentrations of Vitamins and their Respective Functional Indicators to Define Folate and Vitamin B<sub>12</sub> Status. **Food and Nutrition Bulletin**, [s. l.], v. 29, n. 2\_suppl1, p. S67–S73, 2008.

SHARMA, Suvasini; PRASAD, Asuri N. Inborn errors of metabolism and epilepsy: Current understanding, diagnosis, and treatment approaches. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 18, n. 7, 2017.

SHEMESH, Elad et al. Enzyme replacement and substrate reduction therapy for Gaucher disease. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, [s. l.], v. 2013, n. 1, 2013.

SIDRANSKY, Ellen. Gaucher disease: Complexity in a “simple” disorder. **Molecular Genetics and Metabolism**, [s. l.], v. 83, n. 1–2, p. 6–15, 2004.

SIDRANSKY, Ellen. Gaucher Disease: Insights from a Rare Mendelian Disorder. **Discov Med**, [s. l.], v. 14, n. 77, p. 273–281, 2012.

SMID, Bouwien E. et al. Biochemical response to substrate reduction therapy versus enzyme replacement therapy in Gaucher disease type 1 patients. **Orphanet journal of rare diseases**, [s. l.], v. 11, p. 28, 2016.

SMITH, A. David; WARREN, Martin J.; REFSUM, Helga. Vitamin B<sub>12</sub>. **Advances in Food and Nutrition Research**, [s. l.], v. 83, p. 215–279, 2018.

SMITH, Laura; MULLIN, Stephen; SCHAPIRA, Anthony H. V. Insights into the structural biology of Gaucher disease. **Experimental Neurology**, [s. l.], v. 298, n. Pt B, p. 180–190, 2017.

SOLOMON, L. R. Cobalamin-responsive disorders in the ambulatory care setting: unreliability of cobalamin, methylmalonic acid, and homocysteine testing. **Blood**, [s. l.], v. 105, n. 3, p. 978–985, 2004.

SOLOMON, L. R. Functional cobalamin (vitamin B<sub>12</sub>) deficiency: role of advanced age and disorders associated with increased oxidative stress. **European Journal of Clinical Nutrition**, [s. l.], v. 69, n. 6, p. 687–692, 2015.

SOZMEN, Eser Yıldırım; SEZER, Ebru Demirel. Methods for Determination of  $\alpha$ -Glycosidase,  $\beta$ -Glycosidase, and  $\alpha$ -Galactosidase Activities in Dried Blood Spot Samples. In: **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**. [s.l.: s.n.]. v. 1594p. 255–264.

SPENCE, J. David. Metabolic vitamin B<sub>12</sub> deficiency: a missed opportunity to prevent

dementia and stroke. **Nutrition Research**, [s. l.], v. 36, n. 2, p. 109–116, 2016.

STARETZ-CHACHAM, O. et al. Lysosomal Storage Disorders in the Newborn. **PEDIATRICS**, [s. l.], v. 123, n. 4, p. 1191–1207, 2009.

STEIN, Philip et al. Hyperferritinemia and iron overload in type 1 Gaucher disease. **American journal of hematology**, [s. l.], v. 85, n. 7, p. 472–6, 2010.

STIRNEMANN, Jérôme et al. A review of gaucher disease pathophysiology, clinical presentation and treatments. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 1–30, 2017.

STIRNEMANN, Jérôme et al. Impact of imiglucerase on the serum glycosylated-ferritin level in Gaucher disease. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, [s. l.], v. 46, n. 1, p. 34–38, 2011.

STOCKLER, Sylvia et al. Single point mutation in Rabenosyn-5 in a female with intractable seizures and evidence of defective endocytotic trafficking. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 141, 2014.

STRAND, Tor A. et al. Cobalamin and folate status predicts mental development scores in North Indian children 12–18 mo of age. **The American Journal of Clinical Nutrition**, [s. l.], v. 97, n. 2, p. 310–317, 2013.

SUEYOSHI, N.; MAEHARA, T.; ITO, M. Apoptosis of Neuro2a cells induced by lysosphingolipids with naturally occurring stereochemical configurations. **Journal of lipid research**, [s. l.], v. 42, n. 8, p. 1197–202, 2001.

SUN, Ying; QI, Xiaoyang; GRABOWSKI, Gregory A. Saposin C Is Required for Normal Resistance of Acid  $\beta$ -Glucosidase to Proteolytic Degradation. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 278, n. 34, p. 31918–31923, 2003.

SUN, Ying; ZHANG, Wujuan. Glycosphingolipid aspects of Gaucher disease lipidomics. In: **Gaucher Disease: Basic and Clinical Perspectives**. Unitec House, 2 Albert Place, London N3 1QB, UK: Future Medicine Ltd, 2013. p. 94–106.

TAMARGO, Rafael J. et al. The role of saposin C in Gaucher disease. **Molecular Genetics and Metabolism**, [s. l.], v. 106, n. 3, p. 257–263, 2012.

TAYEBI, Nahid et al. Reciprocal and Nonreciprocal Recombination at the Glucocerebrosidase Gene Region: Implications for Complexity in Gaucher Disease. **The**

**American Journal of Human Genetics**, [s. l.], v. 72, n. 3, p. 519–534, 2003.

TAYEBI, Nahid; STONE, Deborah L.; SIDRANSKY, Ellen. Type 2 Gaucher Disease: An Expanding Phenotype. **Molecular Genetics and Metabolism**, [s. l.], v. 68, n. 2, p. 209–219, 1999.

TOHYAMA, J.; MATSUDA, J.; SUZUKI, K. Psychosine is as potent an inducer of cell death as C6-ceramide in cultured fibroblasts and in MOCH-1 cells. **Neurochemical research**, [s. l.], v. 26, n. 6, p. 667–71, 2001.

TRAPERO, Ana; LLEBARIA, Amadeu. Glucocerebrosidase inhibitors for the treatment of Gaucher disease. **Future Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 5, n. 5, p. 573–590, 2013.

TSUJI, S. et al. Genetic heterogeneity in type 1 Gaucher disease: multiple genotypes in Ashkenazic and non-Ashkenazic individuals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 85, n. 7, p. 2349–52, 1988.

TSUJI, Shoji et al. A Mutation in the Human Glucocerebrosidase Gene in Neuronopathic Gaucher's Disease. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 316, n. 10, p. 570–575, 1987.

TYLKI-SZYMAŃSKA, A. et al. Non-neuronopathic Gaucher disease due to saposin C deficiency. **Clinical Genetics**, [s. l.], v. 72, n. 6, p. 538–542, 2007.

UELAND, P. M. et al. Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. **Clinical chemistry**, [s. l.], v. 39, n. 9, p. 1764–79, 1993.

VACCARO, A. M. et al. Saposin C mutations in Gaucher disease patients resulting in lysosomal lipid accumulation, saposin C deficiency, but normal prosaposin processing and sorting. **Human Molecular Genetics**, [s. l.], v. 19, n. 15, p. 2987–2997, 2010.

VALENTE, E. et al. Diagnostic Accuracy of Holotranscobalamin, Methylmalonic Acid, Serum Cobalamin, and Other Indicators of Tissue Vitamin B12 Status in the Elderly. **Clinical Chemistry**, [s. l.], v. 57, n. 6, p. 856–863, 2011.

VAN BEYNUM, Ingrid M. et al. Total homocysteine and its predictors in Dutch children. **The American Journal of Clinical Nutrition**, [s. l.], v. 81, n. 5, p. 1110–1116, 2005.

VAN ROSSUM, Alison; HOLSOPPLE, Megan. Enzyme Replacement or Substrate Reduction? A Review of Gaucher Disease Treatment Options. **Hospital Pharmacy**, [s. l.], v. 51, n. 7, p. 553–563, 2016.

VANIER, Marie T.; FROISSART, Roseline. Diagnostic testing (enzyme and mutational analysis). In: **Gaucher Disease: Basic and Clinical Perspectives**. Unitec House, 2 Albert Place, London N3 1QB, UK: Future Medicine Ltd, 2013. p. 170–181.

VEINOT, J. P. et al. Gaucher's disease with valve calcification: possible role of Gaucher cells, bone matrix proteins and integrins. **The Canadian journal of cardiology**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 211–6, 1999.

VELAYATI, Arash et al. A mutation in SCARB2 is a modifier in gaucher disease. **Human Mutation**, [s. l.], v. 32, n. 11, p. 1232–1238, 2011.

VOGIATZOGLOU, A. et al. Determinants of Plasma Methylmalonic Acid in a Large Population: Implications for Assessment of Vitamin B12 Status. **Clinical Chemistry**, [s. l.], v. 55, n. 12, p. 2198–2206, 2009.

WAGNER, Victoria F. et al. Attitudes of Individuals with Gaucher Disease toward Substrate Reduction Therapies. **Journal of Genetic Counseling**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 169–176, 2018.

WATKINS, David; ROSENBLATT, David S. Lessons in biology from patients with inborn errors of vitamin B12 metabolism. **Biochimie**, [s. l.], v. 95, n. 5, p. 1019–1022, 2013.

WEINREB, Neal J.; LEE, Robert E. Causes of death due to hematological and non-hematological cancers in 57 US patients with type 1 Gaucher Disease who were never treated with enzyme replacement therapy. **Critical reviews in oncogenesis**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 177–95, 2013.

WILLIAMS, David A. Curing genetic disease with gene therapy. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association**, [s. l.], v. 125, p. 122- 8; discussion 128-9, 2014.

WINFIELD, S. L. et al. Identification of three additional genes contiguous to the glucocerebrosidase locus on chromosome 1q21: implications for Gaucher disease. **Genome research**, [s. l.], v. 7, n. 10, p. 1020–6, 1997.

WOLF, Pavlina et al. Tandem mass spectrometry assay of  $\beta$ -glucocerebrosidase activity in dried blood spots eliminates false positives detected in fluorescence assay. **Molecular Genetics and Metabolism**, [s. l.], v. 123, n. 2, p. 135–139, 2018.

YAJNIK, C. S. et al. Vitamin B12 and folate concentrations during pregnancy and insulin resistance in the offspring: the Pune Maternal Nutrition Study. **Diabetologia**, [s. l.], v. 51, n. 1, p. 29–38, 2008.

YETLEY, Elizabeth A. et al. Biomarkers of vitamin B-12 status in NHANES: a roundtable summary. **The American Journal of Clinical Nutrition**, [s. l.], v. 94, n. 1, p. 313S–321S, 2011.

YILDIZ, Yildiz et al. Functional and genetic characterization of the non-lysosomal glucosylceramidase 2 as a modifier for Gaucher disease. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 151, 2013.

ZACHOS, Christina et al. A Critical Histidine Residue Within LIMP-2 Mediates pH Sensitive Binding to Its Ligand  $\beta$ -Glucocerebrosidase. **Traffic**, [s. l.], v. 13, n. 8, p. 1113–1123, 2012.

ZAMPIERI, Stefania et al. GBA Analysis in Next-Generation Era: Pitfalls, Challenges, and Possible Solutions. **Journal of Molecular Diagnostics**, [s. l.], v. 19, n. 5, p. 733–741, 2017.

ZHAO, Hua et al. Impaired Lysosomal Cobalamin Transport in Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, [s. l.], v. 43, n. 3, p. 1017–1030, 2014.

ZIMRAN, Ari et al. Incidence of malignancies among patients with type I Gaucher disease from a single referral clinic. **Blood cells, molecules & diseases**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 197–200, 2005.

ZIMRAN, Ari et al. Demographics and patient characteristics of 1209 patients with Gaucher disease: Descriptive analysis from the Gaucher Outcome Survey (GOS). **American Journal of Hematology**, [s. l.], v. 93, n. 2, p. 205–212, 2018.

## **7. CAPÍTULOS**

Os resultados da tese serão apresentados nos capítulos a seguir.

## 7.1 CAPÍTULO 1 – Artigo 1

**Título do artigo:** “Use of a multiplex ligation-dependent probe amplification method for the detection of deletions/duplications in the *GBA1* gene in Gaucher disease patients”

**Autores:** Suelen P. Basgalupp, Marina Siebert, Filippo Pinto e Vairo, Anisse Marques Chami, Louise Lapagesse de Camargo Pinto, Gerson da S. Carvalho, Ida Vanessa D. Schwartz.

**Situação:** Publicado

**Revista:** Blood Cells, Molecules and Diseases

**Referência:** Blood Cells, Molecules and Diseases. 2018;68:17–20. doi:10.1016/j.bcmed.2016.10.013

## Use of a multiplex ligation-dependent probe amplification method for the detection of deletions/duplications in the *GBAI* gene in Gaucher disease patients

Suelen P. Basgalupp<sup>a,c</sup>, Marina Siebert<sup>b,c,d</sup>, Filippo Pinto e Vairo<sup>e</sup>, Anisse Marques Chami<sup>f</sup>, Louise Lapagesse de Camargo Pinto<sup>g</sup>, Gerson da S. Carvalho<sup>h</sup>, Ida Vanessa D. Schwartz<sup>a,c,e,i</sup>

<sup>a</sup>Postgraduate Program in Medical Sciences, School of Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>b</sup>Postgraduate Program in Sciences of Gastroenterology and Hepatology, School of Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>c</sup>Basic Research and Advanced Investigations in Neurosciences (BRAIN) Laboratory, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil

<sup>d</sup>Molecular and Protein Analysis Unit, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil

<sup>e</sup>Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil

<sup>f</sup>Rede Mater Dei de Saúde, Belo Horizonte, Brazil

<sup>g</sup>Hospital Infantil Joana de Gusmão, Florianópolis, Brazil

<sup>h</sup>Hospital da Criança de Brasília José de Alencar; Brasília, Brazil

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

### Abstract

Gaucher disease (GD) is caused by the deficient activity of  $\beta$ -glucocerebrosidase due to pathogenic mutations in the *GBAI*. This gene has a pseudogene (*GBAP*) with 96% of sequence homology. Recombination (Rec) events in the *GBAI* seem to be facilitated by an increased degree of homology and proximity to the *GBAP*. The objectives of this study were to validate the P338-X1 GBA kit (MRC-Holland) for Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) and to detect larger deletions/duplications present in *GBAI* in GD patients from Brazil. Thirty-three unrelated Brazilian GD patients, previously genotyped by the Sanger method (both pathogenic alleles identified = 29 patients, only one allele identified = 3 patients, no pathogenic alleles identified = 1 patient), were evaluated by the MLPA assay. MLPA was compatible with the previous results obtained by Sanger sequencing and identified an additional allele (a heterozygous deletion in intron 7 in one patient with only one mutation identified by Sanger). Our data suggest that, although larger deletions/duplications do not appear to be frequent in GD, the P338-X1 GBA kit for MLPA appears to be a good method for *GBAI* analysis. Additional investigations should be

performed in order to characterize the remaining four uncharacterized alleles of our sample.

## **Keywords**

Gaucher disease, *GBA1*, Molecular diagnosis, MLPA

## **1. Introduction**

Gaucher disease (GD) is one of the most common lysosomal storage disorders. It is inherited as an autosomal recessive disorder and is caused by deficient activity of the  $\beta$ -glucocerebrosidase enzyme due to pathogenic mutations in the *GBA1* gene. The function of this enzyme is to catalyze the hydrolysis of the glycolipid glucocerebroside to ceramide and glucose [1]. Enzyme deficiency leads to the accumulation of non-degraded substrate in tissues, especially in the cells of the reticuloendothelial system, resulting in the formation of Gaucher cells, which will harm the regular function of certain organs [2]. GD frequency is estimated to be around 1 in 40,000–60,000 individuals in the general population and may affect 1 in 850 in the Ashkenazi Jewish population [3].

The disorder is divided into three types, based on the absence (type I) or presence and severity (types II and III) of primary involvement of the central nervous system (CNS) [1]. Type I, or nonneuronopathic GD, is by far the most common type, representing more than 90% of cases, and it includes patients with great variability in the progression and severity of the disease. Type II, or acute neuronopathic GD, is the rarest and the most severe form of the disease; these patients generally die before 2 years of age. Type III, or chronic neuronopathic GD, is the intermediate form of the disease because it commits the functions of CNS more slowly and gradually than type II; these patients survive until 20–30 years of age [1], [4].

The clinical features associated with GD include hepatosplenomegaly, anemia, thrombocytopenia, bone and lungs problems. The laboratory diagnosis of GD is based on the measurement of  $\beta$ -glucocerebrosidase in leukocytes and/or fibroblasts. Analysis of the *GBA1* gene is complementary to the biochemical diagnosis [5]. Often, the genotype-phenotype correlation is very difficult to establish because there is a wide phenotypic variability among patients with GD. Defining the patient's genotype is extremely important as it can help in the definition of the prognosis, the severity, and rate of progression of the clinical manifestations of the disease. The presence of at least one N370S allele prevents the development of neurological manifestations and confers type I disease, whereas the presence of the L444P

allele in homozygosity is highly associated with CNS involvement [6].

The *GBA1* gene is located on chromosome 1q21 and spans 7.6 kb of genomic DNA divided into 11 exons. A highly homologous 5.7 kb pseudogene (*GBAP*) is located 16 kb downstream, with the same organization of exons [7]. The *GBAP* is transcribed, but it does not produce a functional protein [8]. *GBA1* and *GBAP* share more than 96% exonic sequence homology, enhancing the likelihood of homologous recombination. Recombination events between *GBA1* and *GBAP* have been identified, resulting from gene conversion, fusion or duplication and are responsible for several different identified mutant alleles [9]. To date, over 400 different pathogenic *GBA1* mutations have been reported. These include missense mutations, nonsense mutations, small insertions or deletions that lead to either frameshifts or in-frame alterations, splice junction mutations and complex alleles carrying two or more mutations in cis (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>, September 2016; [3]).

Our aims in the present study were to validate the P338-X1 GBA kit (MRC-Holland) for MLPA and to detect large deletions and/or duplications in *GBA1* in GD patients from Southern Brazil.

## 2. Materials and methods

The study was approved by the institutional review board of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

### 2.1. Patients

DNA samples from 33 unrelated patients with GD (type I = 27; type II = 4; type III = 2) were analyzed. The diagnosis of GD was established by the demonstration of deficient  $\beta$ -glucocerebrosidase activity in leukocytes and/or fibroblasts. *GBA1* gene was previously analyzed by Sanger sequencing in all patients (both mutations identified = 29 patients, only one mutation = 3, no identified mutation = 1; no pathogenic alleles identified = 5/66; point mutation alleles = 47/66; Rec alleles = 14/66) (Table 1). The location of the mutations found is as follow: R163\* (exon 6); E236K and H311R (exon 8); N370S and G377S (exon 9); L444P, L444R, A456P and Rec*NciI* (exon 10).

Table 1. Genotypes and phenotypes of Gaucher patients included in the present study.

Genotype by Sanger	MLPA results	Number of patients (33)	GD Type
N370S/N370S	Normal	1	I
G377S/G377S	Normal	1	I
N370S/R163*	Normal	1	I
N370S/L444P + A456P	Low signal exon 10	1	I
N370S/L444P	Low signal exon 10	7	I
N370S/RecNciI	Low signal exon 10	11	I
N370S/L444R	Low signal exon 10	2	I
N370S/?	Normal	2	I
L444P/RecNciI	Low signal exon 10	2	II
RecNciI/?	Low signal intron 7 and exon 10	1	II
L444P + E326K/H311R	Low signal exon 10	1	II
L444P/L444P	Low signal exon 10	2	III
No mutations found	Normal	1	I

Location of mutations –R163\* (exon 6); E236K and H311R (exon 8); N370S and G377S (exon 9); L444P, L444R, A456P and RecNciI (exon 10).

## 2.2. Multiplex ligation-dependent probe amplification assay

The MLPA kit (P338-X1 GBA kit, MRC Holland) for the *GBA1* gene contains one probe for each of the following regions of *GBA1*: 5'UTR, exons 3, 4, 6, 8, 9, 10, and intron 7; it is used to determine gene or exon deletion/duplication (Fig. 1). The probes do not cover the entire length of the corresponding regions. The assay conditions and reactions were performed according to the manufacturer's recommendations [MRC Holland, Amsterdam, The Netherlands (www.mlpa.com)]. The amplified products were analyzed using the ABI 3500 equipment (Thermo Fisher Scientific). Data results were analyzed using Coffalyser software for MLPA [MRC Holland, Amsterdam, The Netherlands (https://coffalyser.wordpress.com/)]. Subjects with wild-type genotype were included as controls in all reactions.



Fig. 1. Schematic representation of probes used in the present study. The MLPA kit contains one probe for each of the following regions of *GBA1*: 5'UTR, exons 3, 4, 6, 8, 9, 10, and intron 7. Each probe is represented by a red star in the corresponding region.

### 3. Results

Table 1 shows the results of the Sanger sequencing and MLPA. No evidence for deletion/duplication was found.

Of 66 alleles, 13 (19.7%) were found to have L444P, and 2 (3.03%), L444R, confirming our sequencing results. However, we were unable to distinguish if the reduced signal was due to the presence of *RecNciI* (exon 10), L444P + A456P (exon 10) or L444P + E326K (exon 10). Only one patient presented a heterozygous deletion in intron 7; according to the sequencing, this patient is also heterozygous for *RecNciI* (Fig. 2d). These results were compatible with the previous analysis by Sanger sequencing. After MLPA analysis, 4 uncharacterized alleles from 4 GD patients still remain.

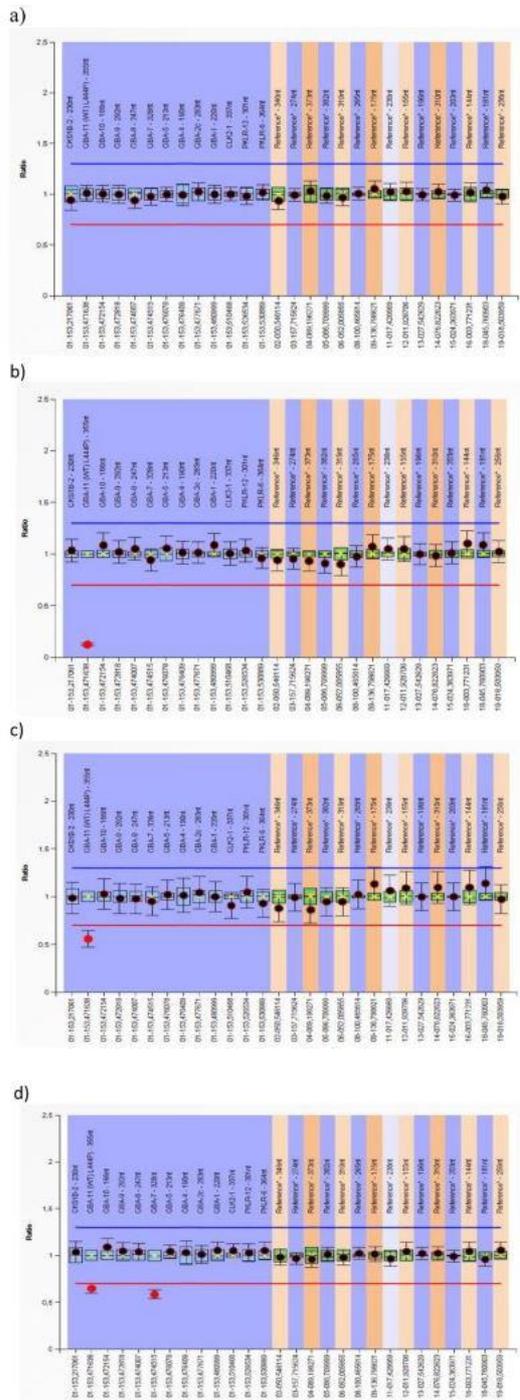


Fig. 2. The representative amplicon coverage plot of four GD patients. The horizontal axis shows the chromosome number and the genomic position. The vertical axis shows the final ratio. (a) The patient had no alteration in any of the MLPA probes. This patient had only one allele identified by Sanger sequencing, heterozygous for N370S mutation. (b) The patient had a very low signal of probe located on exon 10. This patient is homozygous for L444P mutation. For this reason, there was almost no signal for the corresponding probe. (c) The patient had a reduced signal for exon 10 probe. This patient has L444R mutation in one allele. (d) The patient had a reduced signal of exon 10 probe, which is in agreement with Sanger sequencing. This patient is heterozygous for RecNcil (L444P, A456P, V460V in cis). Also, there was a reduced signal in the intron 7 probe. The deletion is denoted by the red spots below the deletion cut-off line (red) in the ratio chart.

#### 4. Discussion

This is the first analysis of the *GBA1* gene by the MLPA technique in Brazilian patients with GD. Genotyping of GD patients is usually made by the Sanger sequencing. The identification of both mutations in the *GBA1* can provide useful information regarding the prognosis of the patients, and it is essential for carrier diagnosis. However, large deletions and duplications that span entire exons are not detected by sequencing techniques, and additional investigation, such as MLPA, should be performed.

Restrictive factors of the MLPA kit are as follows: a) probes reach only part of the gene's coding region; and, b) not all coding regions are covered due to *GBAP* homology and do not cover the full extension of each exon, which may not detect some variation of the gene structure in the uncovered regions. This method is used for relative quantification of 40 different DNA sequences in a single reaction performance, and it only requires a thermocycler, a capillary electrophoresis equipment, and a concentration of 20 ng of human DNA. Among the different applications of this technique are: detection of deletions and duplications in exons of a variety of human genes; trisomy detection, such as Down syndrome; and characterization of chromosomal aberrations in cell lines and tumor samples [10]. This technique can also be used for prenatal diagnosis [11], and it allows molecular diagnosis of gene copy-number alterations in human genetic diseases [12]. Moreover, this technique can be used as screening for deletions/duplications as well as to exclude important missense mutation in *GBA1* (such as L444P) given that the specific probe covers the region in which the mutation is located. When the MLPA result suggests a single exon deletion, the result should be confirmed by an additional technique, such as Sanger sequencing of the target region. Although Sanger sequencing is used for various diseases, it is likely that the MLPA technique will be implemented as a basic technique for molecular analysis of genetic diseases and will be used in molecular diagnostic laboratories, both to confirm and to detect copy number variations (CNVs) on rare genetic diseases [12].

The L444P mutation is the second most common pathogenic variant in *GBA1*, and it may occur alone or in cis with other mutations. This mutation derives from the pseudogene sequence [13]. Many protocols of genetic analysis for GD patients include only the investigation of the most frequent mutations; this prevents the differentiation between L444P alleles and those resulting from recombination events. Among the most prevalent complex alleles is the *RecNciI*, which includes 3 distinct mutations located at exon 10 (L444P, A456P

and V460V) of *GBA1* [14].

The exon 10 probe generates a normal signal at the 444 position, but it generates reduced signal when L444P or L444R is present. Results herein showed that it is not possible to differentiate patients who have the *RecNciI* allele from those with L444P or L444R.

This technique is extremely necessary for the analysis of genes that comprise a large number of exons, such as the DMD gene, which contains 79 exons and is associated with Duchenne Muscular Dystrophy (DMD). The deletion and/or duplication analysis of this gene by another method, such as Southern blot, would be more laborious when compared to the MLPA technique, which is performed in 48 h [15].

MLPA can also be applied not only in patients with GD but also in patients with other lysosome storage disorders (LS, such as Fabry, MPS II, and Niemann-Pick type C disease). Presently, there are MLPA probes also available for Krabbe, Tay-Sachs and Pompe disease [16].

## **5. Conclusions**

In the present study, all variants at the 444 amino acid position were detected by a reduced signal in the exon 10 MLPA probe set. However, alterations among L444P, L444R or *RecNciI* could not be distinguished based solely on the MLPA results. After MLPA analysis, 4 uncharacterized alleles from 4 GD patients still remain. Giving that the probes do not cover all regions of the gene, an additional approach is necessary to evaluate uncovered regions of *GBA1* (exons 1, 2, 5, 11, promoter and 3'UTR). Also, the GD patient that had a variant in *GBA1* intron 7 will be further studied by Sanger sequencing and mRNA analysis to evaluate the splicing alteration.

The MLPA technique can contribute for a better understanding of the pathophysiology of GD and should be implemented in molecular diagnosis laboratories, increasing the detection of non-identified variants. The use of this approach in the diagnosis of GD is innovative and will serve as reference to future studies regarding the real prevalence of large deletions/duplications not only in GD but also in other LSD.

## **Conflict of interest**

No disclosure to declare.

## Acknowledgements

We would like to thank MRC-Holland for donating the kit that was used in this study. We would also like to thank Citogem for the distribution of MLPA kits in Brazil. Financial support for this study was provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil project # 308816/2013-7) and Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA, Brazil, project # 15-0637). S.P.B. received a scholarship from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil).

## References

1. E. Beutler, G.A. Grabowski. **Gaucher Disease** C. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, D. Valle (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (8th ed), McGraw-Hill, New York (2001).
2. O. Harmanci, Y. Bayraktar. **Gaucher disease: new developments in treatment and etiology**, *World J. Gastroenterol.*, 14 (25) (2008), pp. 3968-3973 Jul 7.
3. G.A. Grabowski, G.A. Petsko, E.H. Kolodny. **Gaucher Disease. The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease** McGraw-Hill Companies, New York (2013).
4. Sidransky E. (2012) Gaucher disease: insights from a rare Mendelian disorder. *Discov. Med.* Oct;14(77):273–81.
5. Bennett LL, Mohan D. (2013) Gaucher disease and its treatment options. *Ann. Pharmacother.* Sep; 47(9):1182–93.
6. W.J. Huang, X. Zhang, W.W. Chen. **Gaucher disease: a lysosomal neurodegenerative disorder** *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 19 (2015), pp. 1219-1226.
7. Horowitz M, Wilder S, Horowitz Z, Reiner O, Gelbart T, Beutler E. (1989) The human glucocerebrosidase gene and pseudogene: structure and evolution. *Genomics.* Jan;4(1):87–96.
8. J. Sorge, E. Gross, C. West, E. Beutler. **High level transcription of the glucocerebrosidase pseudogene in normal subjects and patients with Gaucher disease**, *J. Clin. Invest.*, 86 (1990), pp. 1137-1141
9. Hruska KS, LaMarca ME, Scott CR, Sidransky E. (2008) Gaucher disease: mutation and polymorphism spectrum in the glucocerebrosidase gene (GBA). *Hum. Mutat.* May;29(5):567–83.

10. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. (2002) Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.*, v 30, n. 12 e57.
11. A.S. Willis, I. Ignatia van den Veyver, C.M. Eng. **Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) and prenatal diagnosis** *Prenat. Diagn.*, 32 (2012), pp. 315-320.
12. L. Stuppia, I. Antonucci, G. Palka, V. Gatta. **Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of Gene copy number alterations in human genetic diseases** *Int. J. Mol. Sci.*, 13 (2012), pp. 3245-3276.
13. N. Tayebi, K.J. Reissner, E.K. Lau, B.K. Stubblefield, A.C. Klineburgess, B.M. Martin, E. Sidransky. **Genotypic heterogeneity and phenotypic variation among patients with type 2 Gaucher's disease**, *Pediatr. Res.*, 43 (1998), pp. 571-578.
14. B. Cormand, T.L. Harboe, L. Gort, C. Campoy, M. Blanco, N. Chamoles, A. Chabás, L. Vi lageliu, M. Grinberg. **Mutation analysis of Gaucher disease patients from Argentina: high prevalence of the RecNciI mutation**, *Am. J. Med. Genet.*, 80 (1998), pp. 343-351.
15. M. Schwartz, M. Dunø. **Improved molecular diagnosis of dystrophin Gene mutations using the multiplex ligation-dependent probe amplification method** *Genet. Test.*, 8 (2004), pp. 361-367.
16. R. Giugliani, A.C. Brusius-Facchin, G. Pasqualim, S. Leistner-Segal, M. Riegel, U. Matte. **Current molecular genetics strategies for the diagnosis of lysosomal storage disorders**, *Expert. Rev. Mol. Diagn.*, 16 (2015), pp. 113-123.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As conclusões da tese serão apresentadas abaixo, de acordo com os objetivos específicos.

*1. Identificar, por meio de MLPA, mutações no GBA1 em pacientes com DG que não possuíam o genótipo estabelecido;*

A partir da realização da técnica de MLPA foi possível identificar uma deleção em uma paciente com DG que apresentava mutação identificada em apenas um alelo. Os resultados foram concordantes com as análises prévias realizadas por sequenciamento de Sanger. O método MLPA é uma excelente ferramenta diagnóstica que permite detectar deleções e inserções de determinadas regiões genômicas, podendo ser utilizado para diagnóstico genético de diversas doenças. Os resultados sugerem que, embora esse tipo de alteração não pareça ser tão frequente em pacientes com DG, essa técnica pode auxiliar no diagnóstico genético de DG, especialmente em casos de pacientes que apresentam genótipo incompleto. A técnica utilizada pode contribuir para melhor compreender alguns mecanismos envolvidos na DG e poderá ser implementada em laboratórios de diagnóstico genético, o que poderá aumentar a detecção de variantes que não foram identificadas por outras metodologias.

*2. Avaliar a existência de um perfil alélico específico em pacientes com DG da região Sul e de outras regiões do Brasil;*

A partir da análise das frequências alélicas de pacientes com DG de diferentes regiões do Brasil, o estudo sugere que existe um perfil alélico específico no *GBA1* diferente entre os pacientes da região Sul comparado aos pacientes de outras regiões do país. Os alelos N370S, RecNciI e L444P foram mais representativos na região Sul, totalizando mais de 75% dos alelos identificados, enquanto que os mesmos alelos representaram cerca de 50% do total nas demais regiões do Brasil. Essa diferença de perfil alélico entre as diferentes regiões pode ser decorrente do processo de imigração, visto que o Brasil é composto por uma população heterogênea, tais como Europeus, Africanos e Ameríndios. Portanto, os três alelos identificados que representam a maior fração do Sul do Brasil podem ser advindos de origem ancestral, visto que a maior parte dessa população é de origem Européia. Uma análise de

haplótipos em uma amostra de pacientes que represente todas as regiões do país poderá fornecer informações sobre a origem dos diferentes alelos, o que poderá definir as diferenças de perfis alélicos entre os pacientes brasileiros com DG.

### *3. Avaliar o metabolismo da vitamina B<sub>12</sub> em células de pacientes com DG;*

Os resultados obtidos sugerem que não existe uma deficiência funcional da vitamina B<sub>12</sub> em pacientes com DG. Os níveis dos biomarcadores do *status* de B<sub>12</sub> foram analisados e os dados mostraram valores dentro da normalidade, os quais não foram significativamente diferentes nas formas neuronopática e não-neuronopática da DG. Porém, embora o transporte e o processamento de B<sub>12</sub> pareçam estar preservados nas células de pacientes com DG, é importante que os pacientes com DG que apresentam deficiência de B<sub>12</sub> sejam monitorados e avaliados quanto ao uso de cobalamina. Novos estudos com uma coorte de pacientes com DG são extremamente necessários para confirmar esses achados, visto que o estudo foi realizado em linhagens celulares comerciais e o número de fibroblastos utilizados nesse estudo era reduzido.

### *4. Analisar biomarcadores do status de vitamina B<sub>12</sub> em pacientes com DG;*

A partir da análise de biomarcadores do *status* de vitamina B<sub>12</sub> em amostras de plasma de pacientes com DG, o estudo mostrou que pacientes brasileiros com DG tipo I apresentam níveis normais de vitamina B<sub>12</sub>, o que difere de um estudo prévio que demonstrou uma alta prevalência de níveis reduzidos de vitamina B<sub>12</sub> em pacientes com DG da população judeus Ashkenazi. Além disso, nenhum paciente apresentou níveis de biomarcadores funcionais (tHcy e MMA) sugestivos de deficiência de B<sub>12</sub>. Portanto, o acúmulo de glicocerebrosídeo nos lisossomos parece não afetar o processamento e o tráfego da vitamina B<sub>12</sub>, não ocasionando uma deficiência funcional de B<sub>12</sub> em pacientes com DG tipo I. O presente estudo ressalta a importância do monitoramento de pacientes com DG quanto à deficiência de B<sub>12</sub> diagnosticada em estágio inicial e o uso potencial de cobalamina como suplementação.

## 9. PERSPECTIVAS FUTURAS

A DG é uma doença rara e, muitas vezes, acaba sendo sub-diagnosticada devido ao número restrito de médicos e profissionais da saúde que atuam na área da genética, mais especificamente em EIM. Visto que a DG apresenta uma heterogeneidade fenotípica, faz-se necessário investigar possíveis fatores modificadores do fenótipo da doença, os quais poderão identificar futuros alvos terapêuticos para a DG.

Apesar de a TRE ser uma excelente estratégia terapêutica para os pacientes com DG, muitos deles apresentam diferenças na resposta clínico-laboratorial aos medicamentos. Dessa forma, as intervenções médicas na DG devem ser aprimoradas por meio de um diagnóstico mais preciso, o que levará a uma melhor resposta ao tratamento. Além disso, o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que possam auxiliar as terapias já existentes, representa uma maneira de aprimorar e otimizar o manejo desses pacientes.

Visando adequado diagnóstico dos pacientes com DG, para os casos em que não foram identificadas as mutações causadoras da doença, diferentes técnicas devem ser realizadas para definir o genótipo desses pacientes. Como perspectiva do trabalho realizado, a implementação da técnica de MLPA como rotina no laboratório de diagnóstico genético, poderá ser realizada proporcionando um aumento da taxa de detecção de variantes não identificadas por outras metodologias. Além disso, a técnica de MLPA poderá ser utilizada não só para o diagnóstico de DG, mas também para a investigação de outras doenças, inclusive aquelas em que as mutações mais comuns são do tipo deleção ou inserção.

A partir da análise do perfil das frequências alélicas de mutações no gene *GBAI* em pacientes com DG de diferentes regiões do Brasil, o próximo passo do estudo será avaliar a origem alélica nessas populações por meio da análise de haplótipos nesses pacientes provenientes de diferentes centros de referência para a DG.

O presente estudo avaliou o metabolismo celular da vitamina B<sub>12</sub> em fibroblastos de pacientes com DG, os quais foram adquiridos comercialmente, sendo analisados somente um paciente de cada tipo de DG, bem como o mesmo número de indivíduos saudáveis. Para avaliar um efeito maior, a caracterização do metabolismo celular da B<sub>12</sub> poderá ser realizada em fibroblastos de uma coorte de pacientes com DG, os quais serão mais representativos, além da vantagem de ter dados disponíveis sobre as manifestações clínicas desses pacientes. A análise dos biomarcadores de B<sub>12</sub> ajudará a interpretar o *status* de B<sub>12</sub> na coorte de pacientes com DG com maior acurácia e confiabilidade.

Uma outra abordagem a ser realizada é a investigação do metabolismo do ferro como fator modificador da DG. A hiperferritinemia tem sido, cada vez mais, associada à DG e ainda é discutido sobre a etiologia da ferritina na DG. Sabe-se que a ferritina é originada a partir da ativação de macrófagos. Porém, não se sabe se na DG a ferritina seria resultado de um processo inflamatório influenciado por citocinas, se seria motivada por sobrecarga de ferro nos macrófagos ou se seria de uma etiologia compartilhada entre esses dois fatores. Um estudo recente demonstrou que a hiperferritinemia observada em pacientes com DG tipo I está relacionada a um defeito no metabolismo do ferro e ao sequestro de ferro nas células Gaucher. Dessa forma, a análise de mutações em genes envolvidos em diferentes vias do metabolismo do ferro é uma estratégia promissora que poderá fornecer informações relevantes dos mecanismos envolvidos na DG.

## **10. ANEXOS**

---

### **10.1 ANEXO I**



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

**COMISSÃO CIENTÍFICA**

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

**Projeto:** 160101

**Data da Versão do Projeto:** 29/02/2016

**Pesquisadores:**

IDA VANESSA DOEDERLEIN SCHWARTZ

FILIPPO PINTO VAIRO

SUELEN PORTO BASGALUPP

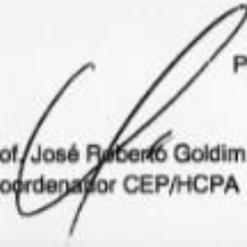
MARINA SIEBERT

**Título:** ANÁLISE MOLECULAR DO GENE GBA1 EM PACIENTES BRASILEIROS COM  
DOENÇA DE GAUCHER

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

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

Porto Alegre, 09 de junho de 2016.

  
Prof. José Roberto Goldim  
Coordenador CEP/HCPA

---

**10.2 ANEXO II**

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nº do projeto GPPG ou CAAE \_\_\_\_\_

### Título do Projeto: **ANÁLISE MOLECULAR DO GENE *GBA1* EM PACIENTES BRASILEIROS COM DOENÇA DE GAUCHER**

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa cujo objetivo é identificar a presença de variantes na estrutura do gene *GBA1*, o qual codifica a enzima glicocerebrosidase que está deficiente em pacientes com doença de Gaucher (DG) devido a mutações nesse gene. Alguns estudos indicam que podem ocorrer diferenças nos sintomas clínicos apresentados pelos pacientes com a mesma forma da doença. Existem diferentes fatores envolvidos na manifestação de diferentes características clínicas da doença e um deles pode ser a presença de diferentes variações no gene envolvido na DG. Os achados do presente estudo serão correlacionados com as manifestações clínicas dos pacientes com DG, o que poderá contribuir para um melhor entendimento de como a doença está progredindo, por que os pacientes apresentam sintomas diferentes e o motivo pelo qual existem diferentes respostas ao tratamento entre os pacientes. Esta pesquisa está sendo realizada pelo laboratório B.R.A.I.N (*Basic Research and Advanced Investigations in Neurosciences*) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Se você aceitar participar da pesquisa, os procedimentos envolvidos em sua participação são os seguintes: Coletar 5 mL de sangue para análise molecular do gene *GBA1*; consultar prontuários para buscar dados clínicos e laboratoriais. Se você permitir, o material coletado que restar após a realização da análise molecular deste estudo será armazenado e utilizado em estudos futuros, desde que você consinta novamente. Em relação ao armazenamento do material biológico, você declara que:

( ) Autorizo o armazenamento do material biológico que restar após a realização da análise molecular do gene *GBA1*;

( ) Não autorizo o armazenamento do material biológico que restar após a realização da análise molecular do gene *GBA1*.

Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação na pesquisa são semelhantes aos envolvidos na coleta de sangue para exames laboratoriais de rotina (manchas roxas e dor no local da coleta). O desconforto e os riscos associados à coleta de sangue serão minimizados pela sua realização por profissional treinado.

Os possíveis benefícios decorrentes da participação na pesquisa são indiretos, ou seja, a participação na pesquisa não lhe trará benefícios diretos, porém, contribuirá para um melhor entendimento da doença, o que futuramente poderá levar ao desenvolvimento de uma terapia mais

efetiva. Não existe nenhum prazo para que você receba o resultado originado desta pesquisa, mas este lhe será informado assim que estiver disponível. Você pode optar por não saber o resultado do teste.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante de sua participação na pesquisa, você receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável Dra. Ida Vanessa D. Schwartz, pelo telefone (51) 3359 8011 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 3359 7640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

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

\_\_\_\_\_  
Nome do participante da pesquisa

\_\_\_\_\_  
Assinatura

\_\_\_\_\_  
Nome do pesquisador que aplicou o Termo

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Local e Data: \_\_\_\_\_

---

**10.3 ANEXO III**



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

COMISSÃO CIENTÍFICA

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

**Projeto:** 170094

**Data da Versão do Projeto:** 15/02/2017

**Pesquisadores:**

IDA VANESSA DOEDERLEIN SCHWARTZ

TATIELE NALIN

SUELEN PORTO BASGALUPP

MARINA SIEBERT

**Título:** Enzimas lisossomais e receptores envolvidos no metabolismo de glicoesfingolípídeos e vitamina B12: um estudo bioquímico baseado na doença de Gaucher

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.

- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG)

Porto Alegre, 25 de janeiro de 2018.



Prof. José Roberto Goldim  
Coordenador CEP/HCPA

---

**10.4 ANEXO IV**

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nº do projeto GPPG ou CAAE \_\_\_\_\_

### **Título do Projeto: Enzimas lisossomais e receptores envolvidos no metabolismo de glicosfingolípídeos e vitamina B<sub>12</sub>: um estudo bioquímico baseado na doença de Gaucher**

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa cujo objetivo é caracterizar o metabolismo da vitamina B<sub>12</sub> em pacientes com diferentes tipos da doença de Gaucher (DG). O presente estudo proporciona uma excelente oportunidade para investigar o papel da vitamina B<sub>12</sub>, a qual pode estar influenciando a ocorrência dos diferentes sintomas clínicos apresentados pelos pacientes. Você está sendo convidado a participar porque já possui o diagnóstico de DG. Existem diversos fatores envolvidos na manifestação de diferentes características clínicas da doença e um deles pode ser uma anormalidade no metabolismo dessa vitamina. Os achados do presente estudo serão relacionados com as manifestações clínicas dos pacientes com DG, o que poderá contribuir para um melhor entendimento de como a doença está progredindo, porque os pacientes apresentam sintomas diferentes e o motivo pelo qual existem diferentes respostas ao tratamento entre os pacientes. Se você aceitar participar da pesquisa, os procedimentos envolvidos em sua participação são os seguintes: Coletar 10 mL de sangue para análise de metabólitos envolvidos no metabolismo da vitamina B<sub>12</sub>; coletar uma biópsia de pele para análise do metabolismo da vitamina B<sub>12</sub> e autorizar a consulta do seu prontuário para buscar dados clínicos e laboratoriais relacionados à doença. Se você permitir, o material coletado que restar após a realização da análise bioquímica deste estudo será armazenado e utilizado em estudos futuros, sendo que entraremos em contato com você novamente para que você autorize a utilização. Em relação às coletas, você declara que autorizou a coleta de:

- ( ) 10 mL de sangue para análise de metabólitos envolvidos no metabolismo da vitamina B<sub>12</sub>;
- ( ) Biópsia de pele para análise do metabolismo da vitamina B<sub>12</sub> em fibroblastos.

Em relação ao armazenamento do material biológico, você declara que:

- ( ) Autorizo o armazenamento do material biológico que restar após a realização da análise bioquímica relacionada ao metabolismo da vitamina B<sub>12</sub>, sabendo que serei recontactado;
- ( ) Não autorizo o armazenamento do material biológico que restar após a realização da análise bioquímica relacionada ao metabolismo da vitamina B<sub>12</sub>, devendo o mesmo ser devidamente descartado.

Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação na pesquisa são semelhantes aos envolvidos na coleta de sangue para exames laboratoriais de rotina (manchas roxas e dor no local da coleta). O desconforto e os riscos associados à coleta de sangue serão minimizados pela sua realização por profissional treinado.

A participação na pesquisa não lhe trará benefícios diretos, porém, contribuirá para um melhor entendimento da doença, o que futuramente poderá levar ao desenvolvimento de uma terapia mais efetiva para outros pacientes. Não existe nenhum prazo para que você receba o resultado originado desta pesquisa, e o mesmo não altera o prognóstico e tratamento da sua doença, no entanto, você poderá ter acesso ao resultado, caso você desejar, assim que estiver disponível. Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante de sua participação na pesquisa, você receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável Dra. Ida Vanessa D. Schwartz, pelo telefone (51) 3359 8011 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 3359 7640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

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

\_\_\_\_\_  
Nome do participante da pesquisa

\_\_\_\_\_  
Assinatura

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

\_\_\_\_\_  
Nome do pesquisador que aplicou o Termo

\_\_\_\_\_  
Assinatura

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

---

**10.5 ANEXO V**

## Ficha para coleta de dados dos exames clínicos, laboratoriais e de imagem

Nome do paciente: \_\_\_\_\_

Sexo: ( ) Feminino ( ) Masculino

Data de nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_ Centro de vínculo: \_\_\_\_\_

Esplenectomizado: ( ) Sim ( ) Não

Idade do início dos sintomas: \_\_\_\_\_

Data do diagnóstico: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Idade ao diagnóstico: \_\_\_\_\_

Dosagem de  $\beta$ -glicosidase: \_\_\_\_\_

Genótipo: \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

Escore de gravidade SSI: \_\_\_\_\_

Tipo de DG: \_\_\_\_\_

Exames laboratoriais:

EXAME	ANTES DO TRATAMENTO	APÓS TRATAMENTO (6, 12 e 18 MESES)	VALOR DE REFERÊNCIA
Ferritina			
Saturação de transferrina			
Ferro sérico			
Quitotriosidase			
Hemoglobina			
Plaquetas			
Aspartato aminotransferase (AST)			
Alanina aminotransferase (ALT)			
Tempo de protrombina (TP)			
Lactato desidrogenase (LDH)			
Quantificação de Fe em tecido hepático por RM			
<i>Bone marrow burden</i> por RM			

**Apresentação clínica antes do tratamento:**

Hepatomegalia: ( ) Sim ( ) Não  
Esplenomegalia: ( ) Sim ( ) Não  
Anemia: ( ) Sim ( ) Não  
Plaquetopenia: ( ) Sim ( ) Não  
Alterações ósseas: ( ) Sim ( ) Não  
Comprometimento neurológico: ( ) Sim ( ) Não  
Enfermidades não relacionadas a DG: ( ) Sim ( ) Não

Observações: \_\_\_\_\_

**Apresentação clínica após 6 meses de início do tratamento:**

Hepatomegalia: ( ) Sim ( ) Não  
Esplenomegalia: ( ) Sim ( ) Não  
Anemia: ( ) Sim ( ) Não  
Plaquetopenia: ( ) Sim ( ) Não  
Alterações ósseas: ( ) Sim ( ) Não  
Comprometimento neurológico: ( ) Sim ( ) Não  
Enfermidades não relacionadas a DG: ( ) Sim ( ) Não

Observações: \_\_\_\_\_

**Apresentação clínica após 12 meses de início do tratamento:**

Hepatomegalia: ( ) Sim ( ) Não  
Esplenomegalia: ( ) Sim ( ) Não  
Anemia: ( ) Sim ( ) Não  
Plaquetopenia: ( ) Sim ( ) Não  
Alterações ósseas: ( ) Sim ( ) Não  
Comprometimento neurológico: ( ) Sim ( ) Não  
Enfermidades não relacionadas a DG: ( ) Sim ( ) Não

Observações: \_\_\_\_\_

**Apresentação clínica após 18 meses de início do tratamento:**

Hepatomegalia: ( ) Sim ( ) Não  
Esplenomegalia: ( ) Sim ( ) Não  
Anemia: ( ) Sim ( ) Não  
Plaquetopenia: ( ) Sim ( ) Não  
Alterações ósseas: ( ) Sim ( ) Não  
Comprometimento neurológico: ( ) Sim ( ) Não  
Enfermidades não relacionadas a DG: ( ) Sim ( ) Não

Observações: \_\_\_\_\_

---

**10.6 ANEXO VI**

# Hampered Vitamin B<sub>12</sub> Metabolism in Gaucher Disease?

Journal of Inborn Errors of Metabolism  
& Screening  
2017, Volume 5: 1–7  
© The Author(s) 2017  
DOI: 10.1177/2326409817692359  
journals.sagepub.com/home/jem



Luciana Hannibal, PhD<sup>1</sup>, Marina Siebert, PhD<sup>2</sup>, Suélen Basgalupp, MSc<sup>2</sup>,  
Filippo Varo, MD, PhD<sup>2</sup>, Ute Spiekerkoetter, MD<sup>1</sup>,  
and Henk J. Blom, PhD<sup>1</sup>

## Abstract

Untreated vitamin B<sub>12</sub> deficiency manifests clinically with hematological abnormalities and combined degeneration of the spinal cord and polyneuropathy and biochemically with elevated homocysteine (Hcy) and methylmalonic acid (MMA). Vitamin B<sub>12</sub> metabolism involves various cellular compartments including the lysosome, and a disruption in the lysosomal and endocytic pathways induces functional deficiency of this micronutrient. Gaucher disease (GD) is characterized by dysfunctional lysosomal metabolism brought about by mutations in the enzyme beta-glucocerebrosidase (Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM): 606463; Enzyme Commission (EC) 3.2.1.45, gene: *GBA1*). In this study, we collected and examined available literature on the associations between GD, the second most prevalent lysosomal storage disorder in humans, and hampered vitamin B<sub>12</sub> metabolism. Results from independent cohorts of patients show elevated circulating holotranscobalamin without changes in vitamin B<sub>12</sub> levels in serum. Gaucher disease patients under enzyme replacement therapy present normal levels of Hcy and MMA. Although within the normal range, a significant increase in Hcy and MMA with normal serum vitamin B<sub>12</sub> was documented in treated GD patients with polyneuropathy versus treated GD patients without polyneuropathy. Thus, a functional deficiency of vitamin B<sub>12</sub> caused by disrupted lysosomal metabolism in GD is a plausible mechanism, contributing to the neurological form of the disorder but this awaits confirmation. Observational studies suggest that an assessment of vitamin B<sub>12</sub> status prior to the initiation of enzyme replacement therapy may shed light on the role of vitamin B<sub>12</sub> in the pathogenesis and progression of GD.

## Keywords

Gaucher disease, vitamin B<sub>12</sub>, lysosomal disease, homocysteine, methylmalonic acid, transcobalamin, lysosomal trafficking, polyneuropathy, cobalamin, enzyme replacement therapy

## Introduction

Lysosomal storage disorders (LDs) are a broad group of more than 50 rare, life-threatening diseases characterized by abnormal degradation of glycans, carbohydrates, lipids and proteins, and lysosomal transporter and trafficking.<sup>1</sup>

The concept of LDs or lysosomal disorders was developed in the early 1960s, after the discovery that Pompe disease was caused by a deficiency in the lysosomal enzyme  $\alpha$ -glucosidase.<sup>2</sup> Lysosomal storage disorder may be caused not only by defective enzymes but also by enzyme activator proteins (eg, Prosaposin [PSAP] deficiency), membrane proteins (eg, Danon disease), transporters (eg, cystinosis), or enzyme signaling (eg, mucopolysaccharidosis type II). Lysosomal storage disorders are characterized by an abnormal storage of a variety of molecules, including triglycerides, sterols, sphingolipids, sulfatides, sphingomyelin, gangliosides, and lipofuscins.<sup>3</sup> The buildup of

substrates within lysosomes results in impaired function of the affected organs (eg, liver, spleen, bone, and nervous system), causing a wide and diverse range of clinical features. In addition, the release of lysosomal acid hydrolases into the

<sup>1</sup>Laboratory of Clinical Biochemistry and Metabolism, Department of Pediatrics, Medical Center, University of Freiburg, Freiburg, Germany

<sup>2</sup>Hospital de Clínicas de Porto Alegre—HCPA, Medical Genetics Service, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Received August 9, 2016, and in revised form December 27, 2016. Accepted for publication December 28, 2016.

## Corresponding Authors:

Luciana Hannibal, PhD, and Henk J. Blom, PhD, Laboratory of Clinical Biochemistry and Metabolism, Department for Pediatrics, Medical Center, University of Freiburg, Mathildenstr 1, Freiburg 79106, Germany.

Emails: luciana.hannibal@uniklinik-freiburg.de; henk.blom@uniklinik-freiburg.de



This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 3.0 License (<http://www.creativecommons.org/licenses/by/3.0/>) which permits any use, reproduction and distribution of the work without further permission provided the original work is attributed as specified on the SAGE and Open Access pages (<https://us.sagepub.com/en-us/ram/open-access-at-sage>).

cytoplasm will cause cellular damage, which may worsen disease progression. Also, dysregulation of apoptosis may cause disease manifestations in some LDs. Indeed, increased apoptosis has been noted in a number of the sphingolipidoses and in neuronal ceroid lipofuscinoses.<sup>4</sup> Since different mechanisms related to apoptosis, cholesterol metabolism dysregulation, inflammation, and alteration in signal transduction are also related to the pathogenesis of these conditions, we prefer to use the term “lysosomal disorder” than “lysosomal storage disorder.”<sup>5</sup> To date, more than 60 different proteins were identified as causing LDs.<sup>6</sup> Individually, LDs are rare, inherited disorders with an estimated frequency from 1 in 25 000 to 1 in 250 000 live newborns, but the overall incidence of all LDs is estimated to be 1 in 7000 live newborns, which makes them a relevant public health issue. The frequency may be underestimated because nowadays more individuals with mild disease and/or adult-onset forms of the diseases are being identified.<sup>7</sup>

Gaucher disease (GD) is an autosomal recessive, multi-organ disorder caused by mutations in the lysosomal enzyme  $\beta$ -glucocerebrosidase (GCase, OMIM: 606463; EC 3.2.1.45, gene: *GBA1*), which catalyzes the conversion of the glycolipid glucosylceramide to ceramide and glucose.<sup>8</sup> The *GBA1* gene is located on chromosome 1q21, comprises 7.6 kb of genomic DNA, and it is divided into 11 exons.<sup>9</sup> The *GBA1* messenger RNA (mRNA) has approximately 2 kb and produces a mature protein of 497 amino acids with 56 kDa.<sup>10,11</sup> The expression levels of mRNA produced from *GBA1* varies considerably between different cell types and has no direct correlation with GCase enzyme activity.<sup>10</sup> *GBA1* has a pseudogene (*GBAP*) of approximately 5 kb, which is highly homologous (96%) with the functional gene. *GBAP* has an identical genomic organization and is located 16 kb downstream of *GBA1*.<sup>9,10</sup> The high degree of homology between the gene and the pseudogene must be taken into account in the investigation of mutations in patients with GD, since some of the mutations found in patients are also present in the *GBAP* sequence.<sup>10,12</sup>

A dysfunctional or absent  $\beta$ -GCase protein leads to the buildup of glucosylceramide in the lysosome, in particular within macrophages of the reticuloendothelial system, and to a defective production of ceramide, the hydrophobic membrane anchor for all sphingolipids in the cell.<sup>13</sup>

This review covers clinical and molecular aspects of GD, the second most prevalent inborn error of LD, with an emphasis on lysosomal metabolism and the potential occurrence of abnormalities in vitamin B<sub>12</sub> status.

## Gaucher Disease

Gaucher disease has been classified into 3 major types based on the absence (type 1) or presence (types 2 and 3) of neurological impairments.<sup>14</sup> The prevalence of GD in the general population has been estimated to be about 1:60 000<sup>15</sup>; however, as seen in other autosomal recessive disorders, GD exhibits ethnic preference.

At the cellular level, GD is characterized by the presence of macrophages with an altered morphology due to abnormal lipid

storage, also known as “Gaucher cells.” Gaucher cells are typically found in affected organs including spleen, liver, and bone marrow.<sup>16</sup> In addition to exhibiting an abnormal morphology, macrophages from GD have a distinct pattern of expression of pro-inflammatory effectors.<sup>17,18</sup>

At the subcellular level, GD features abnormalities in lysosomal pathways, which is accompanied by mitochondrial dysfunction and accumulation of  $\alpha$ -synuclein in the mitochondrion.<sup>19</sup> Lysosomal lipid storage in GD reduces the efficiency of lysosomes to fuse with autophagosomes, thereby impairing cellular clearance of unnecessary substrates, protein aggregates, and dysfunctional mitochondria.<sup>16</sup> This triggers an inflammatory response that ultimately leads to cellular death.<sup>16</sup> Interestingly, mitochondrial dysfunction and increased deposition of  $\alpha$ -synuclein are 2 features of GD that are shared with other peripheral neuropathies such as Parkinson and Alzheimer diseases.<sup>20</sup>

The molecular mechanism underlying GD pathogenesis remains elusive. A few metabolic hallmarks have been identified in GD, including increased chitotriosidase (EC 3.2.1.14), angiotensin-converting enzyme (EC 3.4.15.1), C-C Motif Chemokine Ligand 18 (CCL18) (P55774), tartrate-resistant acid phosphatase (EC 3.1.3.2), and serum ferritin (P02792 and P02794), and some of these continue to be utilized as diagnostic and prognostic tools in clinical practice.<sup>21</sup> An interesting aspect of GD is the presumptive abnormality in vitamin B<sub>12</sub> status.<sup>22-26</sup> The earliest observations linking GD with vitamin B<sub>12</sub> metabolism were documented about 4 decades ago by Gilbert and Weinreb<sup>26</sup> and by Rachimilewitz and Rachimilewitz.<sup>27</sup> These studies demonstrated elevated levels of circulating holotranscobalamin (holo-TC) in GD patients, which was not associated with decreased serum levels of vitamin B<sub>12</sub> or any other vitamin B<sub>12</sub> binders.<sup>26</sup> The levels of holo-TC were directly proportional to the severity of GD.<sup>26</sup> Very few follow-up studies were conducted thereafter, and to this date, the associations between GD and vitamin B<sub>12</sub> metabolism are open for investigation, as also will be shown below.

## Clinical Manifestations

Gaucher disease is classically divided into 3 clinical types based upon the severity and onset of neurological involvement; however, overlap is often seen among the phenotypes. Gaucher disease type 1 (OMIM 230800), the nonneuropathic type, is the most common form of the disorder in the western hemisphere and the most prevalent type overall (90%-95% of the patients), with an incidence of 1 in 70 000 live newborns worldwide.<sup>28</sup> In Ashkenazi Jews, the incidence is 1 in 400 live newborns.<sup>29</sup> Type 1 is characterized by multi-organ involvement, especially hepatic, splenic, bone, hematologic, and pulmonary systems. The life expectancy depends on the time of diagnosis, severity of visceral involvement, and treatment. Patients with GD type 1 are treated with specific therapies such as enzyme replacement therapy (ERT) or substrate reduction therapy. Most treated patients usually have a

normal life expectancy. The absence of early-onset primary central nervous system (CNS) is essential for the diagnosis of GD type 1.<sup>30</sup> During the last 2 decades, population studies have shown an association between GD and Parkinson disease. Carriers of *GBA1* mutations are also at risk of developing parkinsonism.<sup>31</sup> Also, GD type 1 patients are at an increased risk of developing cholelithiasis<sup>32</sup> and hematological malignancies as multiple myeloma.<sup>33</sup>

Gaucher disease type 2 (OMIM 230900), the acute neuronopathic type, is the less frequent phenotype, with an incidence of 1 in 100 000 live newborns and is characterized by cholestasis, hepatosplenomegaly, and early-onset and rapidly progressive CNS manifestations with bulbar involvement. Hydrops fetalis and colloidion baby may be present in the most severe forms. The life expectancy varies from hours to a few months.<sup>34</sup> There is no specific treatment for patients with GD type 2.

Gaucher disease type 3 (OMIM 231000), the subacute or chronic neuronopathic type, is particularly prevalent in Asian and Arab countries.<sup>14</sup> Gaucher disease type 3 is characterized by an intermediate phenotype with visceral manifestations as GD type 1 and CNS manifestations are less severe than GD type 2. Patients may have severe bone involvement, with kyphoscoliosis, ataxia, myoclonic epilepsy, strabismus, horizontal gaze palsy, and dementia. Some patients may present corneal clouding and cardiac valvular calcifications. Enzyme replacement therapy is indicated to treat the visceral signs and symptoms of GD, but it fails to alleviate CNS manifestations. The life expectancy is 20 to 30 years.<sup>35</sup>

## Diagnosis

Clinical manifestations, such as hepatosplenomegaly, bone lesions, hematologic changes, and/or CNS involvement, are important signs that would suggest the presence of GD.<sup>23,36</sup> However, the diagnosis of GD should not be based exclusively on the clinical evaluation of the patient. There are other LDs that may present with symptoms similar to GD, which may complicate the establishment of a precise diagnosis.

The standard diagnostic method for GD is the evaluation of  $\beta$ -GCCase (acid  $\beta$ -glucosidase) activity in dried blood spots, peripheral blood leukocytes, cultured skin fibroblasts, or other nucleated cells. Molecular analysis of *GBA1*, which encodes GCCase, and the identification of 2 disease-causing mutations may assist the patient's clinical classification into a determined subtype or at least make it possible to distinguish between neuronopathic and nonneuronopathic forms.<sup>37</sup> Genetic testing enables the confirmation and a better characterization of the patient's condition and is considered an essential tool for GD diagnosis.<sup>38</sup> Up to date, more than 400 different disease-causing mutations have been described in the *GBA1* gene (www.hgmd.cf.ac.uk<sup>37,39</sup>). *GBA1* mutations may alter GCCase stability and/or impair its catalytic function.<sup>37,38</sup>

The identification of disease-causing mutations in *GBA1* may be challenging due to the *GBAP*. The most accurate method for mutation analysis in GD is full-gene sequencing of *GBA1*.<sup>39</sup> In order to describe a recombinant allele, a

combination of direct sequencing along with an additional method, such as Southern blot or qPCR, is strongly recommended.<sup>40,41</sup> The occurrence of deletion and/or duplication of any region of *GBA1* can be specifically addressed by multiplex ligation-dependent probe amplification.<sup>40,41</sup>

## Vitamin B<sub>12</sub> Metabolism

Vitamin B<sub>12</sub> is an essential micronutrient synthesized only by a select group of bacteria and archaea. Humans completely rely on a dietary intake of minimally 2 to 3  $\mu$ g of vitamin B<sub>12</sub> per day,<sup>42</sup> which is indispensable to support the activities of cytosolic methionine synthase (MS) and mitochondrial methylmalonyl-CoA mutase (MCM). Dietary vitamin B<sub>12</sub> is absorbed in the lower portions of the ileum after sequential relay by the dedicated transporters haptocorrin, intrinsic factor, and transcobalamin.<sup>43,44</sup> Vitamin B<sub>12</sub> bound to transcobalamin, that is, holo-TC is distributed via systemic circulation to all cells in the body. Cells take up holo-TC via receptor-mediated endocytosis, aided by the transcobalamin receptor (CD320),<sup>45,46</sup> which shuttles vitamin B<sub>12</sub> into lysosomes. The protein binder TC undergoes degradation in the lysosome, liberating vitamin B<sub>12</sub> that is subsequently exported out of this compartment using the transporters LMBR1 Domain Containing 1 (LMBRD1)<sup>47,48</sup> and ATP Binding Cassette Subfamily D Member 4 (ABCD4).<sup>49,50</sup> Once in the cytosol, newly internalized vitamin B<sub>12</sub> undergoes processing and trafficking by proteins, CblC<sup>51-57</sup> and CblD,<sup>58-63</sup> respectively, to finally reach acceptor proteins, MS in the cytosol and MCM in the mitochondrion.

Insufficient intake and certain inborn errors of metabolism impairing the cellular transport, trafficking, and utilization of vitamin B<sub>12</sub> manifest as functional cobalamin deficiency, with either isolated or combined homocystinuria and methylmalonic aciduria. Untreated vitamin B<sub>12</sub> deficiency causes hematological abnormalities, subacute combined degeneration of the spinal cord, and polyneuropathy.<sup>64</sup> However, its precise role in the progression of neurological diseases (measured as the onset of dementia in only 1 large study<sup>65</sup>) has been debated.<sup>65</sup> It is possible that sufficiency of vitamin B<sub>12</sub> is important for preventing nerve deterioration. Vitamin B<sub>12</sub> administration only partially reverses clinically established nerve degeneration and neuropathies.

## Lysosomal Disorders of Vitamin B<sub>12</sub>

The lysosome is an essential compartment in cellular vitamin B<sub>12</sub> metabolism by connecting uptake and downstream utilization of the micronutrient. Two genetic disorders affecting lysosomal proteins LMBRD1 (cblF)<sup>47,48</sup> and ABCD4 (cblJ)<sup>49,50,66</sup> have been described, leading to trapping of vitamin B<sub>12</sub> inside the lysosome and the concomitant onset of functional cobalamin deficiency by inactivation of the B<sub>12</sub> acceptors MS and MCM. LMBRD1 and ABCD4 mediate the export of vitamin B<sub>12</sub> from the lysosome.<sup>47-50,66</sup>

Apart from these canonical defects of lysosomal vitamin B<sub>12</sub> transporters, 2 other reports documented abnormal vitamin B<sub>12</sub>

**Table 1.** Demographics, Treatment, Vitamin B<sub>12</sub> Status, and Clinical Manifestations of Adult GD Type I in a Cohort of European Patients.<sup>a,b,c</sup>

	Polyneuropathy (n = 17)	No Polyneuropathy (n = 86)	P Value
<b>Demographics</b>			
Age in years, median (range)	61 (41-75)	39 (18-67)	<.001
Gender, male/female, n (%)	11 (64.7)/6 (35.3)	38 (44.2)/48 (55.8)	NS
<b>Enzyme replacement therapy</b>			
Receiving ERT, n (%)	15 (88.2)	74 (86.0)	NS
Duration in years, median (range)	3.0 (0.2-10.9)	2.1 (0.0-13.6)	NS
Dosage in IU/kg/m, median (range)	30.0 (11.1-112.2)	58.2 (12.3-156.3)	.013
<b>Vitamin B<sub>12</sub> status</b>			
Vitamin B <sub>12</sub> (pmol/L), median (range)	208 (88-593)	237 (86-886)	NS
Homocysteine (μmol/L), median (range)	11.4 (7.5-30.4)	9.7 (4.6-26.5)	.013
Methylmalonic acid (μmol/L), median (range)	0.18 (0.09-0.98)	0.12 (0.03-0.54)	.001
<b>Systemic GD type I manifestations, n (%)</b>			
Splenomegaly	16 (94.1)	77 (89.5)	NS
Hepatomegaly	16 (94.1)	64 (74.4)	NS
Thrombocytopenia	10 (58.8)	66 (76.7)	NS
Bleeding tendencies	9 (52.9)	38 (44.2)	NS
Anemia	9 (52.9)	34 (39.5)	NS
Bone/joint pain	9 (52.9)	24 (27.9)	NS
Bone crisis	6 (35.3)	25 (29.1)	NS

Abbreviations: ERT, enzyme replacement therapy; GD, Gaucher disease; NS, not statistically significant.

<sup>a</sup>N = 103.

<sup>b</sup>Table Modified from Biegstraaten et al.<sup>82</sup>

<sup>c</sup>Normal ranges: methylmalonic acid, <30 μmol/L; homocysteine, pre-menopausal females, 6 to 15 μmol/L, males, and postmenopausal females, 8 to 18 μmol/L.

metabolism caused by genetic mutations that impair the endocytic and lysosomal pathways independent of vitamin B<sub>12</sub> metabolism. These include the occurrence of abnormal lysosome acidification in a patient with Alzheimer disease<sup>67</sup> and impaired endocytosis in a patient with mutations in the rabenosyn-5 gene.<sup>67,68</sup> In both cases, cellular vitamin B<sub>12</sub> deficiency was documented.<sup>68</sup>

### Vitamin B<sub>12</sub> Status in GD

The overlap of clinical manifestations of GD and vitamin B<sub>12</sub> deficiency concerning neurological impairments suggests shared mechanisms of pathogenesis. One hypothesis is that lysosomal dysfunction in GD leads to functional deficiency of vitamin B<sub>12</sub> by disrupting the uptake, intralysosomal degradation of transcobalamin, or the export of free vitamin B<sub>12</sub> from the organelle into the cytoplasm, thereby compromising the downstream reactions of MS and MCM. Further, it is unknown whether the abnormal accumulation of glycosphingolipids, in particular *N*-acyl-sphingosyl-1-*O*-β-D-glucoside, may affect vitamin B<sub>12</sub> transit in and out of the lysosome.

The earliest assessment of vitamin B<sub>12</sub> status in GD reported abnormally high levels of circulating TC,<sup>26,29</sup> which did not correlate with serum levels of vitamin B<sub>12</sub> or any other B<sub>12</sub>-transport protein levels. It was suggested that increased TC levels in GD resulted from a general status of inflammation. Unfortunately, no other biomarkers of vitamin B<sub>12</sub> status were measured.<sup>69</sup> Indeed, although holo-TC represents the bioactive fraction of vitamin B<sub>12</sub> that is available for cellular uptake,<sup>70-73</sup> this has limitations as a stand-alone marker of vitamin B<sub>12</sub> status in that the majority of circulating vitamin B<sub>12</sub> is bound

to haptocorrin (80%), and thus, fluctuations in the serum level of holo-TC (representing 6%-20% of total serum vitamin B<sub>12</sub><sup>70-73</sup>) may not be accurate marker of vitamin B<sub>12</sub> sufficiency (reviewed by Djaldetti et al<sup>74</sup>). For instance, low levels of holo-TC have been determined in patients with several disorders not featuring vitamin B<sub>12</sub> deficiency.<sup>75-78</sup> At present time, it is unknown whether and how holo-TC levels vary in various disease states, and thus, the diagnostic and prognostic value of holo-TC as a first-line test awaits further investigation.

A study performed within an Ashkenazi Jewish cohort of 85 untreated GD patients and 122 neighbor controls showed a high incidence of low-serum vitamin B<sub>12</sub>, elevated plasma homocysteine (Hcy), and methylmalonic acid (MMA); however, these findings were not statistically significant with respect to controls, due to an overall low vitamin B<sub>12</sub> status among healthy Ashkenazi individuals.<sup>23</sup> The generally low vitamin B<sub>12</sub> status in this Ashkenazi Jewish population has been suggested to arise from frequent blood donation that would exhaust blood and liver storages of vitamin B<sub>12</sub> as well as to ethnical differences.<sup>79,80</sup> A questionnaire-based study identified a high incidence of neurological complaints in patients with nonneuropathic forms of GD, with concomitant vitamin B<sub>12</sub> deficiency and gammopathies.<sup>81</sup> Unfortunately, no laboratory measurements of marker metabolites Hcy and MMA were performed in these studies, which makes it difficult to ascertain the role of vitamin B<sub>12</sub> status in this cohort of GD patients.<sup>81</sup>

A 2-year prospective, longitudinal, observational cohort study involving 8 centers across 7 countries in Europe examined vitamin B<sub>12</sub> status in adult patients with GD type 1 with (n = 17) and without (n = 86) polyneuropathy.<sup>82</sup> The study found statistically significant elevation of serum Hcy and

MMA in patients with polyneuropathy compared to those without neuropathic impairment, with low-normal values of serum vitamin B<sub>12</sub> in both groups.<sup>82</sup> However, both groups of patients displayed metabolite levels still within the normal range (MMA, <0.4 μmol/L; Hcy, premenopausal females, 6-15 μmol/L, males, and postmenopausal females, 8-18 μmol/L).<sup>82</sup> Importantly, both groups of patients had received ERT for at least 2 to 3 years. Table 1 summarizes the data that represent the largest examination of vitamin B<sub>12</sub> status in GD to date. Patients with polyneuropathy had received a lower dose of ERT compared to patients without polyneuropathy.<sup>82</sup> In the absence of vitamin B<sub>12</sub> biomarker (Hcy and MMA) values before ERT, it is difficult to state whether the reported values represent a partially corrected vitamin B<sub>12</sub> metabolism. In sum, a disturbed vitamin B<sub>12</sub> metabolism in GD is plausible, but the available data beg for additional investigation.

## Outlook

Lysosomal storage disorders and GD in particular are complex diseases affecting various facets of metabolism. The occurrence of vitamin B<sub>12</sub> deficiency as a general manifestation of GD awaits further confirmation, but available studies point to disturbances in vitamin B<sub>12</sub> metabolism that may originate from abnormal lysosomal metabolism or a general status of inflammation as it has been reported in 2 other human disorders,<sup>73,74</sup> not intrinsically related to vitamin B<sub>12</sub> metabolism. It has been suggested that aging leads to increased impairments in lysosomal metabolism, and that this could explain the concomitant disturbances of vitamin B<sub>12</sub> pathways often found in association with diseases featuring peripheral neuropathies, such as Alzheimer and Parkinson disorders.<sup>83,84</sup> This further supports the need for vitamin B<sub>12</sub> supplementation in the aging population, beyond the known limitations in gastric absorption of the micronutrient, which also becomes less efficient with aging. Our revision of the available literature points to the importance of assessing vitamin B<sub>12</sub> status prior to the initiation of ERT in GD patients, in order to establish involvement of this micronutrient on the onset of symptoms and possibly in its associated peripheral neuropathies.

## Acknowledgments

L.H. wishes to acknowledge intramural support from the Department of Pediatrics, Medical Center, University of Freiburg, Freiburg, Germany.

## Declaration of Conflicting Interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

## Funding

The author(s) received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.

## References

- O.K. G-T, T. B. Lysosomal Storage Disorders. In: Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6177/>. Published 2013. Accessed February, 2017.
- Hers HG. Inborn lysosomal diseases. *Gastroenterology*. 1965;48:625-633.
- Ciechanover A. Intracellular protein degradation: from a vague idea through the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. *Neurodegener Dis*. 2012;10(1-4):7-22.
- Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*. 2008;132(1):27-42.
- Gieselmann V. Cellular pathophysiology of lysosomal storage diseases. In: Mehta A, Beck M, Sunder-Plassmann G, eds. *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS*. Oxford, United Kingdom: Oxford PharmaGenesis; 2006.
- Samie MA, Xu H. Lysosomal exocytosis and lipid storage disorders. *J Lipid Res*. 2014;55(6):995-1009.
- Wang RY, Bodamer OA, Watson MS, Wilcox WR. Lysosomal storage diseases: diagnostic confirmation and management of presymptomatic individuals. *Genet Med*. 2011;13(5):457-484.
- Beutler E. Gaucher disease: new molecular approaches to diagnosis and treatment. *Science*. 1992;256(5058):794-799.
- Horowitz M, Wilder S, Horowitz Z, Reiner O, Gelbart T, Beutler E. The human glucocerebrosidase gene and pseudogene: structure and evolution. *Genomics*. 1989;4(1):87-96.
- Hruska KS, LaMarca ME, Scott CR, Sidransky E. Gaucher disease: mutation and polymorphism spectrum in the glucocerebrosidase gene (GBA). *Hum Mutat*. 2008;29(5):567-583.
- Grabowski GA, Petsko GA, Kolodny EH. Gaucher disease. In: David Valle M, Arthur L. Beaudet, Bert Vogelstein, Kenneth W. Kinzler, Stylianos E. Antonarakis, Andrea Ballabio, K. Michael Gibson, Grant Mitchell, eds. *OMMBID—The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York, USA: McGraw-Hill; 2013.
- Sidransky E. Gaucher disease: insights from a rare Mendelian disorder. *Discov Med*. 2012;14(77):273-281.
- van Echten-Deckert G, Herget T. Sphingolipid metabolism in neural cells. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1758(12):1978-1994.
- Zimran A. How I treat Gaucher disease. *Blood*. 2011;118(6):1463-1471.
- Dandana A, Ben Khelifa S, Chahed H, Miled A, Ferchichi S. Gaucher disease: clinical, biological and therapeutic aspects. *Pathobiology*. 2016;83(1):13-23.
- Coutinho MF, Alves S. From rare to common and back again: 60 years of lysosomal dysfunction. *Mol Genet Metab*. 2016;117(2):53-65.
- Boven LA, van Meurs M, Boot RG, et al. Gaucher cells demonstrate a distinct macrophage phenotype and resemble alternatively activated macrophages. *Am J Clin Pathol*. 2004;122(3):359-369.
- Pandey MK, Grabowski GA. Immunological cells and functions in Gaucher disease. *Crit Rev Oncog*. 2013;18(3):197-220.
- Gegg ME, Schapira AH. Mitochondrial dysfunction associated with glucocerebrosidase deficiency. *Neurobiol Dis*. 2016;90:43-50.

20. Migdalska-Richards A, Schapira AH. The relationship between glucocerebrosidase mutations and Parkinson disease. *J Neurochem.* 2016;139(suppl 1):177-190.
21. Koppe T, Doneda D, Siebert M, et al. The prognostic value of the serum ferritin in a southern Brazilian cohort of patients with Gaucher disease. *Genet Mol Biol.* 2016;39(1):30-34.
22. D'Amico A, Bertini E. Metabolic neuropathies and myopathies. *Handb Clin Neurol.* 2013;113:1437-1455.
23. Gielchinsky Y, Elstein D, Green R, et al. High prevalence of low serum vitamin B12 in a multi-ethnic Israeli population. *Br J Haematol.* 2001;115(3):707-709.
24. Vital A, Lepreux S, Vital C. Peripheral neuropathy and parkinsonism: a large clinical and pathogenic spectrum. *J Peripher Nerv Syst.* 2014;19(4):333-342.
25. Zeb Jan A, Zahid B, Ahmad S, Gul Z. Pancytopenia in children: a 6-year spectrum of patients admitted to Pediatric Department of Rehman Medical Institute, Peshawar. *Pak J Med Sci.* 2013;29(5):1153-1157.
26. Gilbert HS, Weinreb N. Increased circulating levels of transcobalamin II in Gaucher's disease. *N Engl J Med.* 1976;295(20):1096-1101.
27. Rachimilewitz B, Rachimilewitz M. Serum transcobalamin II concentration. *N Engl J Med.* 1977;296(20):1174.
28. Weinreb NJ, Kaplan P. The history and accomplishments of the ICGG Gaucher registry. *Am J Hematol.* 2015;90(suppl 1):S2-S5.
29. Zimran A, Gelbart T, Westwood B, Grabowski GA, Beutler E. High frequency of the Gaucher disease mutation at nucleotide 1226 among Ashkenazi Jews. *Am J Hum Genet.* 1991;49(4):855-859.
30. Weinreb NJ, Goldblatt J, Villalobos J, et al. Long-term clinical outcomes in type I Gaucher disease following 10 years of imiglucerase treatment. *J Inherit Metab Dis.* 2013;36(3):543-553.
31. Sidransky E, Samadder T, Tayebi N. Mutations in GBA are associated with familial Parkinson disease susceptibility and age at onset. *Neurology.* 2009;73(17):1424-1425, author reply 1425-1426.
32. Taddei TH, Dziura J, Chen S, et al. High incidence of cholesterol gallstone disease in type I Gaucher disease: characterizing the biliary phenotype of type I Gaucher disease. *J Inherit Metab Dis.* 2010;33(3):291-300.
33. Mistry PK, Taddei T, vom Dahl S, Rosenbloom BE. Gaucher disease and malignancy: a model for cancer pathogenesis in an inborn error of metabolism. *Crit Rev Oncog.* 2013;18(3):235-246.
34. Grabowski GA, Zimran A, Ida H. Gaucher disease types I and 3: Phenotypic characterization of large populations from the ICGG Gaucher Registry. *Am J Hematol.* 2015;90(suppl 1):S12-S18.
35. Tytki-Szymanska A, Czartoryska B. Enzyme replacement therapy in type III Gaucher disease. *J Inherit Metab Dis.* 1999;22(2):203-204.
36. Elstein D, Steinberg A, Abrahamov A, Zimran A. Ethical guidelines for enzyme therapy in neuronopathic Gaucher disease. *Am J Hum Genet.* 1997;61(4):A354.
37. Elstein D, Zimran A. IV epoprostenol in Gaucher's disease. *Chest.* 2000;117(6):1821.
38. Goitein O, Elstein D, Abrahamov A, et al. Lung involvement and enzyme replacement therapy in Gaucher's disease. *QJM.* 2001;94(8):407-415.
39. Charrow J, Andersson HC, Kaplan P, et al. The Gaucher registry: demographics and disease characteristics of 1698 patients with Gaucher disease. *Arch Intern Med.* 2000;160(18):2835-2843.
40. Basgalupp SP, Siebert M, Vairo FPe, et al. Use of a multiplex ligation-dependent probe amplification method for the detection of deletions/duplications in the GBA1 gene in Gaucher disease patients [Published online October 20, 2016]. *Blood Cell Mol Dis.* pii: S1079-9796(16)30217-0.
41. Amico G, Grossi S, Vijzelaar R, et al. MLPA-based approach for initial and simultaneous detection of GBA deletions and recombinant alleles in patients affected by Gaucher Disease. *Mol Genet Metab.* 2016;119(4):329-337.
42. Dietary Reference Intakes: Thiamin R, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. Institute of Medicine. Food and Nutrition Board. Washington, DC: National Academy Press; 1998.
43. Zimran A, Elstein D. Management of Gaucher disease: enzyme replacement therapy. *Pediatr Endocrinol Rev.* 2014;12(suppl 1):82-87.
44. Alcalay RN, Dinur T, Quinn T, et al. Comparison of Parkinson risk in Ashkenazi Jewish patients with Gaucher disease and GBA heterozygotes. *JAMA Neurol.* 2014;71(6):752-757.
45. Quadros EV, Nakayama Y, Sequeira JM. The protein and the gene encoding the receptor for the cellular uptake of transcobalamin-bound cobalamin. *Blood.* 2009;113(1):186-192.
46. Alam A, Woo JS, Schmitz J, et al. Structural basis of transcobalamin recognition by human CD320 receptor. *Nat Commun.* 2016;7:12100.
47. Gailus S, Suormala T, Malerczyk-Aktas AG, et al. A novel mutation in LMBRD1 causes the cb1F defect of vitamin B(12) metabolism in a Turkish patient. *J Inherit Metab Dis.* 2010;33(1):17-24.
48. Rutsch F, Gailus S, Suormala T, Fowler B. LMBRD1: the gene for the cb1F defect of vitamin B(12) metabolism. *J Inherit Metab Dis.* 2011;34(1):121-126.
49. Coelho D, Kim JC, Miousse IR, et al. Mutations in ABCD4 cause a new inborn error of vitamin B12 metabolism. *Nat Genet.* 2012;44(10):1152-1155.
50. Takeichi T, Hsu CK, Yang HS, et al. Progressive hyperpigmentation in a Taiwanese child due to an inborn error of vitamin B12 metabolism (cb1J). *Br J Dermatol.* 2015;172(4):1111-1115.
51. Kim J, Gherasim C, Banerjee R. Decyanation of vitamin B12 by a trafficking chaperone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(38):14551-14554.
52. Hannibal L, DiBello PM, Jacobsen DW. Proteomics of vitamin B12 processing. *Clin Chem Lab Med.* 2013;51(3):477-488.
53. Kim J, Hannibal L, Gherasim C, Jacobsen DW, Banerjee R. A human vitamin B12 trafficking protein uses glutathione transferase activity for processing alkylcobalamins. *J Biol Chem.* 2009;284(48):33418-33424.

54. Hannibal L, Kim J, Brasch NE, et al. Processing of alkylcobalamins in mammalian cells: a role for the MMACHC (cblC) gene product. *Mol Genet Metab.* 2009;97(4):260-266.
55. Froese DS, Zhang J, Healy S, Gravel RA. Mechanism of vitamin B12-responsiveness in cblC methylmalonic aciduria with homocystinuria. *Mol Genet Metab.* 2009;98(4):338-343.
56. Morel CF, Lerner-Ellis JP, Rosenblatt DS. Combined methylmalonic aciduria and homocystinuria (cblC): phenotype-genotype correlations and ethnic-specific observations. *Mol Genet Metab.* 2006;88(4):315-321.
57. Lerner-Ellis JP, Tirone JC, Pawelek PD, et al. Identification of the gene responsible for methylmalonic aciduria and homocystinuria, cblC type. *Nat Genet.* 2006;38(1):93-100.
58. Jusufi J, Suormala T, Burda P, Fowler B, Froese DS, Baumgartner MR. Characterization of functional domains of the cblD (MMADHC) gene product. *J Inher Metab Dis.* 2014;37(5):841-849.
59. Mah W, Deme JC, Watkins D, et al. Subcellular location of MMACHC and MMADHC, two human proteins central to intracellular vitamin B(12) metabolism. *Mol Genet Metab.* 2013;108(2):112-118.
60. Gherasim C, Hannibal L, Rajagopalan D, Jacobsen DW, Banerjee R. The C-terminal domain of CblD interacts with CblC and influences intracellular cobalamin partitioning. *Biochimie.* 2013;95(5):1023-1032.
61. Stucki M, Coelho D, Suormala T, Burda P, Fowler B, Baumgartner MR. Molecular mechanisms leading to three different phenotypes in the cblD defect of intracellular cobalamin metabolism. *Hum Mol Genet.* 2012;21(6):1410-1418.
62. Miousse IR, Watkins D, Coelho D, et al. Clinical and molecular heterogeneity in patients with the cblD inborn error of cobalamin metabolism. *J Pediatr.* 2009;154(4):551-556.
63. Coelho D, Suormala T, Stucki M, et al. Gene identification for the cblD defect of vitamin B12 metabolism. *N Engl J Med.* 2008;358(14):1454-1464.
64. Hemmer B, Glocker FX, Schunacher M, Deuschl G, Lucking CH. Subacute combined degeneration: clinical, electrophysiological, and magnetic resonance imaging findings. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1998;65(6):822-827.
65. Health Quality O. Vitamin B12 and cognitive function: an evidence-based analysis. *Ont Health Technol Assess Ser.* 2013;13(23):1-45.
66. Kim JC, Lee NC, Hwu PW, et al. Late onset of symptoms in an atypical patient with the cblJ inborn error of vitamin B12 metabolism: diagnosis and novel mutation revealed by exome sequencing. *Mol Genet Metab.* 2012;107(4):664-668.
67. Zhao H, Li H, Ruberu K, Garner B. Impaired lysosomal cobalamin transport in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2015;43(3):1017-1030.
68. Stockler S, Corvera S, Lambright D, et al. Single point mutation in rabenosyn-5 in a female with intractable seizures and evidence of defective endocytotic trafficking. *Orphanet J Rare Dis.* 2014;9:141.
69. Gillis S, Hyam E, Abrahamov A, Elstein D, Zimran A. Platelet function abnormalities in Gaucher disease patients. *Am J Hematol.* 1999;61(2):103-106.
70. Elstein D, Abrahamov A, Altarescu G, Zimran A. Evolving features in type 3 Gaucher disease on long-term enzyme replacement therapy. *Blood Cell Mol Dis.* 2013;50(2):140.
71. Zimran A, Pastores GM, Tytki-Szymanska A, et al. Safety and efficacy of velaglucosylase alfa in Gaucher disease type 1 patients previously treated with imiglucosylase. *Am J Hematol.* 2013;88(3):172-178.
72. Yetley EA, Pfeiffer CM, Phinney KW, et al. Biomarkers of vitamin B-12 status in NHANES: a roundtable summary. *Am J Clin Nutr.* 2011;94(1):313S-321S.
73. Zimran A, Altarescu G, Elstein D. Nonprecipitous changes upon withdrawal from imiglucosylase for Gaucher disease because of a shortage in supply. *Blood Cell Mol Dis.* 2011;46(1):111-114.
74. Djaldetti M, Straussberg R, Bessler H, Zimran A, Cohen AM. Spontaneous decrease of spleen size in a patient with type 1 Gaucher's disease. *Haematologica.* 1998;83(8):766-767.
75. Pastores GM, Elstein D, Hrebicek M, Zimran A. Effect of miglustat on bone disease in adults with type 1 Gaucher disease: a pooled analysis of three multinational, open-label studies. *Clin Ther.* 2007;29(8):1645-1654.
76. Zimran A, Elstein D. No justification for very high-dose enzyme therapy for patients with type III Gaucher disease. *J Inher Metab Dis.* 2007;30(6):843-844.
77. Zuckerman S, Lahad A, Shmueli A, et al. Carrier screening for Gaucher disease: lessons for low-penetrance, treatable diseases. *JAMA.* 2007;298(11):1281-1290.
78. Elstein D, Dweck A, Attias D, et al. Oral maintenance clinical trial with miglustat for type I Gaucher disease: switch from or combination with intravenous enzyme replacement. *Blood.* 2007;110(7):2296-2301.
79. Elstein D, Klutstein MW, Lahad A, Abrahamov A, Hadas-Halpern I, Zimran A. Echocardiographic assessment of pulmonary hypertension in Gaucher's disease. *Lancet.* 1998;351(9115):1544-1546.
80. Veinot JP, Elstein D, Hanania D, Abrahamov A, Srivatsa S, Zimran A. Gaucher's disease with valve calcification: possible role of Gaucher cells, bone matrix proteins and integrins. *Can J Cardiol.* 1999;15(2):211-216.
81. Elstein D, Abrahamov A, Hadas-Halpern I, Meyer A, Zimran A. Low-dose low-frequency imiglucosylase as a starting regimen of enzyme replacement therapy for patients with type I Gaucher disease. *QJM.* 1998;91(7):483-488.
82. Biegstraaten M, Mengel E, Marodi L, et al. Peripheral neuropathy in adult type I Gaucher disease: a 2-year prospective observational study. *Brain.* 2010;133(10):2909-2919.
83. Zhao H, Brunk UT, Garner B. Age-related lysosomal dysfunction: an unrecognized roadblock for cobalamin trafficking? *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(24):3963-3969.
84. Reynolds E. Vitamin B12, folic acid, and the nervous system. *Lancet Neurol.* 2006;5(11):949-960.

---

**10.7 ANEXO VII**

**Tabela.** Itens essenciais que devem ser descritos em estudos observacionais, segundo a declaração Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE). 2007.

Item	Nº	Recomendação
Título e Resumo	1	Indique o desenho do estudo no título ou no resumo, com termo comumente utilizado  Disponibilize no resumo um sumário informativo e equilibrado do que foi feito e do que foi encontrado
<b>Introdução</b>		
Contexto/Justificativa	2	Detalhe o referencial teórico e as razões para executar a pesquisa.
Objetivos	3	Descreva os objetivos específicos, incluindo quaisquer hipóteses pré-existentes.
<b>Métodos</b>		
Desenho do estudo	4	Apresente, no início do artigo, os elementos-chave relativos ao desenho do estudo.
Contexto ( <i>setting</i> )	5	Descreva o contexto, locais e datas relevantes, incluindo os períodos de recrutamento, exposição, acompanhamento (follow-up) e coleta de dados.
Participantes	6	Estudos de Coorte: Apresente os critérios de elegibilidade, fontes e métodos de seleção dos participantes. Descreva os métodos de acompanhamento. Estudos de Caso-Control: Apresente os critérios de elegibilidade, as fontes e o critério-diagnóstico para identificação dos casos e os métodos de seleção dos controles. Descreva a justificativa para a eleição dos casos e controles Estudo Seccional: Apresente os critérios de elegibilidade, as fontes e os métodos de seleção dos participantes. Estudos de Coorte: Para os estudos pareados, apresente os critérios de pareamento e o número de expostos e não expostos. Estudos de Caso-Control: Para os estudos pareados, apresente os critérios de pareamento e o número de controles para cada caso.
Variáveis	7	Defina claramente todos os desfechos, exposições, preditores, confundidores em potencial e modificadores de efeito. Quando necessário, apresente os critérios diagnósticos.
Fontes de dados/ Mensuração	8 <sup>a</sup>	Para cada variável de interesse, forneça a fonte dos dados e os detalhes dos métodos utilizados na avaliação (mensuração). Quando existir mais de um grupo, descreva a comparabilidade dos métodos de avaliação.
Viés	9	Especifique todas as medidas adotadas para evitar potenciais fontes de vies.
Tamanho do estudo	10	Explique como se determinou o tamanho amostral.
Variáveis quantitativas	11	Explique como foram tratadas as variáveis quantitativas na análise. Se aplicável, descreva as categorizações que foram adotadas e porque.
Métodos estatísticos	12	Descreva todos os métodos estatísticos, incluindo aqueles usados para controle de confundimento. Descreva todos os métodos utilizados para examinar subgrupos e interações. Explique como foram tratados os dados faltantes ("missing data") Estudos de Coorte: Se aplicável, explique como as perdas de acompanhamento foram tratadas. Estudos de Caso-Control: Se aplicável, explique como o pareamento dos casos e controles foi tratado. Estudos Seccionais: Se aplicável, descreva os métodos utilizados para considerar a estratégia de amostragem. Descreva qualquer análise de sensibilidade.
<b>Resultados</b>		
Participantes	13 <sup>a</sup>	Descreva o número de participantes em cada etapa do estudo (ex: número de participantes potencialmente elegíveis, examinados de acordo com critérios de elegibilidade, elegíveis de fato, incluídos no estudo, que terminaram o acompanhamento e efetivamente analisados) Descreva as razões para as perdas em cada etapa. Avalie a pertinência de apresentar um diagrama de fluxo
Dados descritivos	14 <sup>a</sup>	Descreva as características dos participantes (ex: demográficas, clínicas e sociais) e as informações sobre exposições e confundidores em potencial. Indique o número de participantes com dados faltantes para cada variável de interesse. Estudos de Coorte: Apresente o período de acompanhamento (ex: média e tempo total)

Continua

Tabela continuação

Item	Nº	Recomendação
Desfecho	15 <sup>a</sup>	Estudos de Coorte: Descreva o número de eventos-desfecho ou as medidas-resumo ao longo do tempo Estudos de Caso-Controlle: Descreva o número de indivíduos em cada categoria de exposição ou apresente medidas-resumo de exposição. Estudos Seccionais: Descreva o número de eventos-desfecho ou apresente as medidas-resumo.
Resultados principais	16	Descreva as estimativas não ajustadas e, se aplicável, as estimativas ajustadas por variáveis confundidoras, assim como sua precisão (ex: intervalos de confiança). Deixe claro quais foram os confundidores utilizados no ajuste e porque foram incluídos. Quando variáveis contínuas forem categorizadas, informe os pontos de corte utilizados. Se pertinente, considere transformar as estimativas de risco relativo em termos de risco absoluto, para um período de tempo relevante.
Outras análises	17	Descreva outras análises que tenham sido realizadas. Ex: análises de subgrupos, interação, sensibilidade.
Discussão		
Resultados principais	18	Resuma os principais achados relacionando-os aos objetivos do estudo.
Limitações	19	Apresente as limitações do estudo, levando em consideração fontes potenciais de viés ou imprecisão. Discuta a magnitude e direção de vieses em potencial.
Interpretação	20	Apresente uma interpretação cautelosa dos resultados, considerando os objetivos, as limitações, a multiplicidade das análises, os resultados de estudos semelhantes e outras evidências relevantes.
Generalização	21	Discuta a generalização (validade externa) dos resultados.
Outras Informações		
Financiamento	22	Especifique a fonte de financiamento do estudo e o papel dos financiadores. Se aplicável, apresente tais informações para o estudo original no qual o artigo é baseado.

<sup>a</sup> Descreva essas informações separadamente para casos e controles em Estudos de Caso-Controlle e para grupos de expostos e não expostos, em Estudos de Coorte ou Estudos Seccionais.

Nota: Documentos mais detalhados discutem de forma mais aprofundada cada item do *checklist*, além de apresentarem o referencial teórico no qual essa lista se baseia e exemplos de descrições adequadas de cada item (Vandenbroucke et al.<sup>24,25</sup> A *checklist* do STROBE é mais adequadamente utilizada em conjunto com esses artigos (disponíveis gratuitamente no site das revistas PLoS Medicine [www.plosmedicine.org], Annals of Internal Medicine [www.annals.org] e Epidemiology [www.epidem.com]). No website da iniciativa STROBE (www.strobe-statement.org) estão disponíveis versões separadas de *checklist* para Estudos de Coorte, Caso-Controlle ou Seccionais. Reproduzida de von Elm E, Altman DG, Egger M, Pocock SJ, Gøtzsche PC, Vandenbroucke JP. Declaração STROBE: Diretrizes para a comunicação de estudos observacionais [material suplementar na internet]. Malta M, Cardoso LO, tradutores. In: Malta M, Cardoso LO, Bastos FI, Magnanini MMF, Silva CMFP. Iniciativa STROBE: subsídios para a comunicação de estudos observacionais. *Rev Saude Publica*. 2010;44(3):559-65.