



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

RIGOBERTO GADELHA CHAVES

**CONSANGUINIDADE E EFEITO FUNDADOR DA MUTAÇÃO G377S DA DOENÇA
DE GAUCHER EM POPULAÇÃO DE TABULEIRO DO NORTE – CEARÁ –
BRASIL**

**NATAL
2015**

RIGOBERTO GADELHA CHAVES

**CONSANGUINIDADE E EFEITO FUNDADOR DA MUTAÇÃO G377S DA DOENÇA
DE GAUCHER EM POPULAÇÃO DE TABULEIRO DO NORTE – CEARÁ –
BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Barroso Cavalcanti Júnior.

**NATAL
2015**

CATALOGAÇÃO NA FONTE

Chaves, Rigoberto Gadelha.

Consanguinidade e efeito fundador da mutação G377S da Doença de Gaucher em população de Tabuleiro do Norte - Ceará - Brasil / Rigoberto Gadelha Chaves. – Natal, 2015.

108f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Barroso Cavalcanti Júnior.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

1. Doença de Gaucher – Tese. 2. Consanguinidade – Tese. 3. Efeito fundador – Tese. 4. Mutação – Tese. I. Cavalcanti Júnior, Geraldo Barroso. II. Título.

RN-UF/BS-CCS

CDU: 616.411-006.52

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Coordenador: Prof. Dr. Erivaldo Sócrates Tabosa do Egito

**NATAL
2015**

RIGOBERTO GADELHA CHAVES

**CONSANGUINIDADE E EFEITO FUNDADOR DA MUTAÇÃO G377S DA DOENÇA
DE GAUCHER EM POPULAÇÃO DE TABULEIRO DO NORTE – CEARÁ –
BRASIL**

Tese julgada e aprovada para obtenção
do título de Doutor em Ciências da Saúde,
outorgado pela Universidade Federal do
Rio Grande do Norte.

Data de Aprovação: 28/09/2015

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Geraldo Barroso Cavalcanti Júnior
(Orientador-Presidente/UFRN)

Prof. Dr. Carlos Roberto Alves
(Membro externo/FIOCRUZ-RJ)

Profa. Dra. Amália Cinthia Meneses do Rêgo
(Membro externo/UNP)

Prof. Dr. Aldo da Cunha Medeiros
(Membro interno/UFRN)

Profa. Dra. Maria Zélia Fernandes
(Membro interno/UFRN)

Dedico este trabalho ao povo de Tabuleiro do Norte, minha cidade natal, que soube compreender a importância atual desta pesquisa e do seu legado para futuras gerações.

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Deus, por ter concedido saúde e motivação a mim para a conclusão do Curso de Doutorado.

Aos meus pais, Sr. Alcides Monteiro Chaves e Sra. Lucinda Gadelha Chaves (*in memorian*), que me ensinaram os verdadeiros valores da vida.

À minha esposa, Edineide de Freitas, e aos meus filhos, Marília e Mateus, que souberam sublimar a minha ausência durante o tempo dedicado ao projeto e me estimularam a superar as dificuldades advindas desse desafio.

À Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (PPgCSa/UFRN), pelo generoso acolhimento dispensado a mim durante a realização do doutorado.

Ao orientador, Prof. Dr. Geraldo Barroso Cavalcanti Júnior, pelo zelo profissional na minha formação de doutor, valorizando sempre os princípios da ética em pesquisa.

Ao Prof. Dr. Aldo da Cunha Medeiros, por compreender a importância social e científica deste estudo e por acreditar na capacidade de realização plena do projeto.

Ao Dr. Antônio Filgueiras, por trilhar para mim os caminhos da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (PPgCSa/UFRN), pelos importantes ensinamentos transmitidos, fazendo-me ver o mundo das ciências com mais clareza e espírito crítico.

À *Genzyme* do Brasil, por colaborar no suporte financeiro para a realização do estudo.

À Dra. Elisa Sobreira e aos demais membros da *Genzyme* do Brasil e da *Genzyme Corporation*, pela contribuição para meu crescimento intelectual, facilitando o acesso a artigos e a eventos científicos.

Aos gestores e às demais autoridades de Tabuleiro do Norte, em nome de João Márcio da Silva, Secretário de Saúde, pelo apoio às atividades da pesquisa.

Aos colegas de trabalho da Secretaria de Saúde de Tabuleiro do Norte, pela valiosa colaboração nas diversas atividades da pesquisa.

Aos coautores do artigo científico, por dividirem comigo a responsabilidade deste trabalho perante a comunidade científica.

Ao Professor Marcondes Andrade, pela relevante colaboração para a reconstituição da reconstituição da genealogia. Sem a contribuição dele, jamais conseguiríamos chegar tão longe na busca dos ancestrais das famílias envolvidas.

Ao Professor Jesper Sampaio, pelo brilhante trabalho de tradução dos artigos científicos e pelas narrações nos vídeos educativos elaborados para as apresentações internacionais do trabalho.

À Professora Goretti Guerreiro, por sua colaboração na revisão da formação dos trabalhos científicos produzidos a partir dessa pesquisa.

Em especial, à comunidade, aos pacientes e a seus familiares, pela participação na pesquisa e pelos ensinamentos proporcionados.

RESUMO

Chaves RG. *Consanguinidade e efeito fundador da mutação G377S da doença de Gaucher em população de Tabuleiro do Norte – Ceará – Brasil*. [Tese]. Natal. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2015.

INTRODUÇÃO: A doença de Gaucher (DG) é causada pela deficiência da enzima glucosilceramidase (GCase) que leva ao acúmulo de glucocerebrosídeo em células do sistema retículo endotelial. A incidência estimada da DG na população geral é de 1:100.000 habitantes, sendo, entretanto, cerca de 100 vezes mais frequente entre os judeus Ashkenazi. No Brasil, destaca-se a cidade de Tabuleiro do Norte (TN), com 28.500 habitantes, situada no estado do Ceará, na região do Nordeste do Brasil, cuja prevalência da DG é de 1:4.000 habitantes. Um rastreamento populacional fundamentado em análises enzimáticas da GCase e quitotriosidase em sangue seco em papel de filtro (SSPF) selecionou um “grupo de risco” para DG em TN. Para esse “grupo de risco” e pacientes com DG da cidade foi feito o rastreamento das mutações N370S, L44P, G377S e 55-del e a reconstituição da genealogia das famílias envolvidas. O objetivo desse estudo foi conhecer e analisar o perfil genético relacionado à DG de indivíduos do “grupo de risco” selecionados pelo rastreamento enzimático e de pacientes de TN, a fim de buscar explicações para elevada prevalência da enfermidade nessa população. **METODOLOGIA:** Essa pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa, do Hospital Geral Dr. César Cals de Oliveira, Fortaleza, e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), em fevereiro de 2009 e as amostras de DNA foram coletadas durante o período de Março/2009 à Dezembro/2010. Foi realizado o rastreamento molecular das quatro mutações mais prevalentes no Brasil em 131 indivíduos selecionados pelo rastreamento enzimático em SSPF (GCase <2,19nmol/h/mL ou quitotriosidase ≥44,00 nmol/h/mL) e em 5 pacientes da DG descendentes das famílias da cidade. **RESULTADOS:** O rastreamento das mutações no “grupo de risco” e nos pacientes revelou uma única mutação (G377S) e permitiu classificar os indivíduos em 3 grupos: afetados/homozigotos (n=5), 20 portadores (n=20), e não-portadores (n=111). O estudo da genealogia descobriu uma ancestralidade comum entre todos (afetados e portadores da mutação G377S). **CONCLUSÃO:** A identificação de uma única mutação (G377S) entre os indivíduos afetados e portadores de diferentes gerações, a história da cidade e o estudo da genealogia das famílias envolvidas sugerem que a elevada prevalência da DG nesta população pode ser devido a uma combinação de consanguinidade e efeito fundador da mutação G377S.

Descritores: Consanguinidade; Efeito fundador; Doença de Gaucher; Mutação.

ABSTRACT

Chaves RG. *Consanguinity and Founder Effect for Gaucher disease mutation G377S in a population from Tabuleiro do Norte, Northeastern - Brazil*. [Tese]. Natal: "Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte": 2015.

INTRODUCTION: Gaucher's disease (GD) is caused by a β -glucocerebrosidase (GCase) deficiency leading to the accumulation of glucocerebroside in the reticuloendothelial system. The incidence of GD in the general population is estimated to be 1:100,000, but the condition is approximately 100 times more common among Ashkenazi Jews. In Brazil, the highest incidence (1:4,000) is found in Tabuleiro do Norte (TN), a town in the hinterland of Ceará with 28,500 inhabitants. A population enzyme screening for GCase and chitotriosidase activity in dried blood spots on filter paper revealed a risk group for GD in TN. The purpose of the present study was to evaluate the genetic profile of this risk group in order to understand the high GD incidence observed. **METHODS:** The study protocol was approved by local and national research ethics committees (Hospital Geral Dr. César Cals de Oliveira and CONEP) in February 2009. Between March 2009 and December 2010, 131 individuals previously selected by enzyme screening (GCase <2.19 nmol/h/mL or chitotriosidase ≥ 44.00 nmol/h/mL) and 5 GD patients descended from traditional local families were submitted to molecular screening for the GD mutations most prevalent in Brazil (N370S, L444P, G377S and 55-del), followed by a genealogical study of the families involved. **RESULTS:** Only one mutation (G377S) was detected, making it possible to classify the subjects in 3 groups: affected/homozygotes ($n=5$), carriers ($n=20$) and non-carriers ($n=111$). The genealogy study pointed to a common ancestor of all affected subjects and carriers of G377S. **CONCLUSION:** The identification of a single mutation (G377S) in carriers and affected subjects belonging to different generations but descending from common ancestors and the history of the settlement of TN suggest that the high incidence of GD in TN is due to a combination of founder effect for the G377S mutation and consanguinity.

Descriptors: Consanguinity; Founder effect; Gaucher's disease; Mutation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fisiopatologia simplificada dos Erros Inatos do Metabolismo.....	21
Figura 2 – A Célula de Gaucher	24
Figura 3 – Fatos históricos da doença de Gaucher	27
Figura 4 – Distribuição dos pacientes da doença de Gaucher por regiões do Brasil.....	28
Figura 5 – Localização geográfica e principais dados de Tabuleiro do Norte-CE....	29
Figura 6 – Reação catalisada pela β -glucocerebrosidase humana	30
Figura 7 – Comprometimento visceral e ósseo de paciente com a doença de Gaucher.....	38
Figura 8 – Desenho do rastreamento populacional para doença de Gaucher em Tabuleiro do Norte	58
Figura 9 – Resultado da análise molecular em PCR e RFLP.	61
Figura 10 – Heredograma das famílias de pacientes da doença de Gaucher e portadores da mutação G377S em Tabuleiro do Norte-CE	67

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Classificação dos Erros Inatos do Metabolismo	22
Quadro 2 – Classificação das doenças de depósitos lisossômicos	23
Quadro 3 – Características das principais mutações da doença de Gaucher	34
Quadro 4 – Manifestações clínicas dos subtipos da doença de Gaucher	35
Quadro 5 – <i>Primers</i> e enzimas de restrições usadas para detecção das mutações da DG rastreadas em população de Tabuleiro do Norte, CE-Brasil	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Indivíduos afetados, portadores e não-portadores da mutação G377S distribuídos quanto ao sexo, à idade e às atividades de GCase em leucócitos e de quitotriosidase no plasma	65
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE	Enzima Conversora de Angiotensina
ATG	Bases nitrogenadas Adenina, Timina e Guanina
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CE	Ceará
CG	Célula de Gaucher
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CREIM	Centro de Referência dos Erros Inatos do Metabolismo
DDL	Doenças de Depósitos Lisossômicos
DG	Doença de Gaucher
DG1	Doença de Gaucher Tipo I
DG2	Doença de Gaucher Tipo II
DG3	Doença de Gaucher Tipo II
DMO	Densidade Mineral Óssea
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EF	Efeito Fundador
EIM	Erros Inatos do Metabolismo
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
GBA	Gene da Glucocerebrosidase ácida
GBA2	Gene da β -glucocerebrosidase Ácida Biliar
GC	Glucosilcerebrósídeo
GCase	Glucosilceramidase
GELs	Glicoesfingolípídios
GLcCer	Glucosilceramida
ICGG	<i>International Collaborative Gaucher Grupo</i>
IMC	Índice de massa corporal
Kb	Kilobase
LIMP-2	Proteínas de membrana integral dos lisossomos
M6P	Manose 6-fosfato
PAS	<i>Periodic Acid-Schiff</i>

Pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PSGBA	Pseudogene da Glucocerebrosidase ácida
RER	Retículo Endoplasmático Rugoso
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RM	Ressonância Magnética
SAP-C	Saposina C
SAPs	Saposinas
SNC	Sistema Nervoso Central
SSPF	Sangue Seco em Papel de Filtro
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TN	Tabuleiro do Norte
TRAP	Fosfatase Ácida Tartarato Resistente
TRE	Terapia de Reposição Enzimática
TRS	Terapia de Redução do Substrato

SUMÁRIO

	Página
1	INTRODUÇÃO..... 18
2	REVISÃO DA LITERATURA..... 20
2.1	A genética e a doença de Gaucher20
2.2	Os Erros Inatos do Metabolismo.....20
2.3	As Doenças de Depósitos Lisossômicos..... 22
2.4	A doença de Gaucher..... 23
2.5	Fatos históricos da doença de Gaucher..... 25
2.6	A epidemiologia da doença de Gaucher..... 27
2.7	A bioquímica da doença de Gaucher.....29
2.8	Bases moleculares da doença de Gaucher..... 31
2.9	Manifestações clínicas da doença de Gaucher..... 34
2.10	Diagnóstico da doença de Gaucher..... 38
2.11	Diagnóstico de portadores de mutações da doença de Gaucher..... 39
2.12	Avaliação complementar por imagem na doença de Gaucher..... 40
2.13	Biomarcadores da doença de Gaucher..... 41
2.14	Tratamento da doença de Gaucher..... 43
2.14.1	Terapia de Reposição Enzimática (TRE).....44
2.14.2	Terapia de Redução do Substrato (TRS).....46
2.15	Doença de Gaucher e patologias correlatas..... 47
2.16	Avaliação familiar na doença de Gaucher..... 48
2.17	Rastreamento populacional para doença de Gaucher..... 49
2.18	Aconselhamento genético..... 49
2.19	Consanguinidade e efeito fundador..... 50
3	JUSTIFICATIVAS..... 54
4	OBJETIVOS..... 55
4.1	Objetivo geral..... 55
4.2	Objetivos específicos..... 55
5	METODOLOGIA..... 57
5.1	Desenho do estudo..... 57
5.2	Coleta de amostras para estudo molecular..... 59
5.3	Análises moleculares..... 60

5.4	Rastreamento das mutações.....	60
5.5	Sequenciamento de DNA.....	62
5.6	Análise estatística dos dados.....	63
5.7	Estudo da genealogia.....	63
6	RESULTADOS.....	64
6.1	Análises enzimáticas.....	64
6.2	Análises moleculares.....	64
6.3	Estudo da genealogia.....	65
7	DISCUSSÃO.....	68
8	CONCLUSÃO.....	71
	Anexo A – Artigo científico produzido com base no estudo molecular.....	72
	Anexo B – Certificado da apresentação de pôster no evento <i>European Human Genetics Conference</i> – Glasgow, Escócia, junho de 2015.....	77
	Anexo C – Certificado da participação no <i>2nd Latin American Gaucher Disease Round Table</i> , Rio de Janeiro, maio de 2015	78
	Anexo D – Certificado do prêmio pela apresentação do pôster “Consanguinity and Founder Effect for Gaucher disease mutation G3777S in a population from Tabuleiro do Norte, Northeastern - Brazil” – <i>2nd Latin American Gaucher Disease Round Table</i> , Rio de Janeiro, maio de 2015.....	79
	Anexo E – Pôster premiado no <i>2nd Latin American Gaucher Disease Round Table</i> – Rio de Janeiro, maio de 2015.....	80
	Anexo F – Pôster apresentado e premiado no <i>11nd The European Working Group on Gaucher Disease – 11nd EWGGD</i> , Haifa, Israel, junho de 2014.....	81
	Anexo G – Certificado do prêmio recebido pela apresentação do pôster “Gaucher’s disease: evidence of founder effect in a population from Tabuleiro do Norte, Brazil” – <i>11nd EWGGD</i> , Haifa, Israel, junho de 2014..	82
	Apêndice A – Comentários, críticas e sugestões.....	83

Apêndice B – Mapa conceitual do Estudo Populacional da doença de Gaucher em Tabuleiro do Norte-CE: eixos estratégicos e as principais ações utilizadas para desenvolvimento do projeto de pesquisa.....	86
Apêndice C – Atividades da β -glicosidase ácida e quitotriosidase em amostras de sangue seco em papel de filtro em Tabuleiro do Norte-CE....	87
Apêndice D – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	88
REFERÊNCIAS	92

1 INTRODUÇÃO

A doença de Gaucher (DG) é uma enfermidade genética de transmissão autossômica recessiva causada por uma deficiência da enzima Glucosilceramidase (GCase; β -glucocerebrosidase; β -glucosidase ácida; EC 3.2.1.45) que conduz ao acúmulo de um Glucosilcerebrosídeo (GC), denominado Glucosilceramida (GlcCer), nos tecidos, em especial, nas células do sistema retículo-endotelial⁽¹⁾.

A incidência estimada da DG nos Estados Unidos da América (EUA) é de 1:40.000 habitantes, sendo, entretanto, cerca de 100 vezes mais prevalente entre os indivíduos descendentes de judeus Ashkenazi⁽²⁾. Com base nos dados de maio de 2014 do *Gaucher Registry*, o maior cadastro de pacientes da DG no mundo, há 573 pacientes brasileiros cadastrados⁽³⁾, e Tabuleiro do Norte (TN), uma pequena cidade localizada no leste do Ceará, destaca-se por apresentar a maior prevalência dessa enfermidade no Brasil (1:4.000 habitantes)⁽⁴⁾.

As principais hipóteses para explicar a elevada prevalência de DG em TN estão relacionadas à baixa taxa de migração, ao elevado nível de endogamia ao longo de muitas gerações e, ainda, a uma possível influência da origem judaica de algumas famílias fundadoras da cidade que vieram de Portugal na segunda metade do século XVII⁽⁴⁾.

Para estudar a elevada prevalência da DG em TN, foi realizado o rastreamento populacional da DG a partir da medida de atividades enzimáticas em Sangue Seco em Papel de Filtro (SSPF) na cidade durante o período de 2007 a 2009 pelo qual foi identificado um grupo de indivíduos com risco para DG. O estudo enzimático, porém, foi incapaz de identificar com precisão quais indivíduos dentro do referido grupo seriam afetados ou somente portadores de mutações da DG⁽⁴⁾.

A avaliação molecular no “grupo de risco” e o estudo da genealogia das famílias envolvidas foram necessários para esclarecer dúvidas das etapas anteriores e oferecer informações fundamentais para o aconselhamento genético da população de risco.

O principal objetivo desse trabalho é conhecer e analisar o perfil genético relacionado à DG de indivíduos do “grupo de risco” selecionados pelo rastreamento enzimático e de pacientes de TN, a fim de buscar explicações para elevada prevalência da enfermidade nessa população.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A genética e a doença de Gaucher (DG)

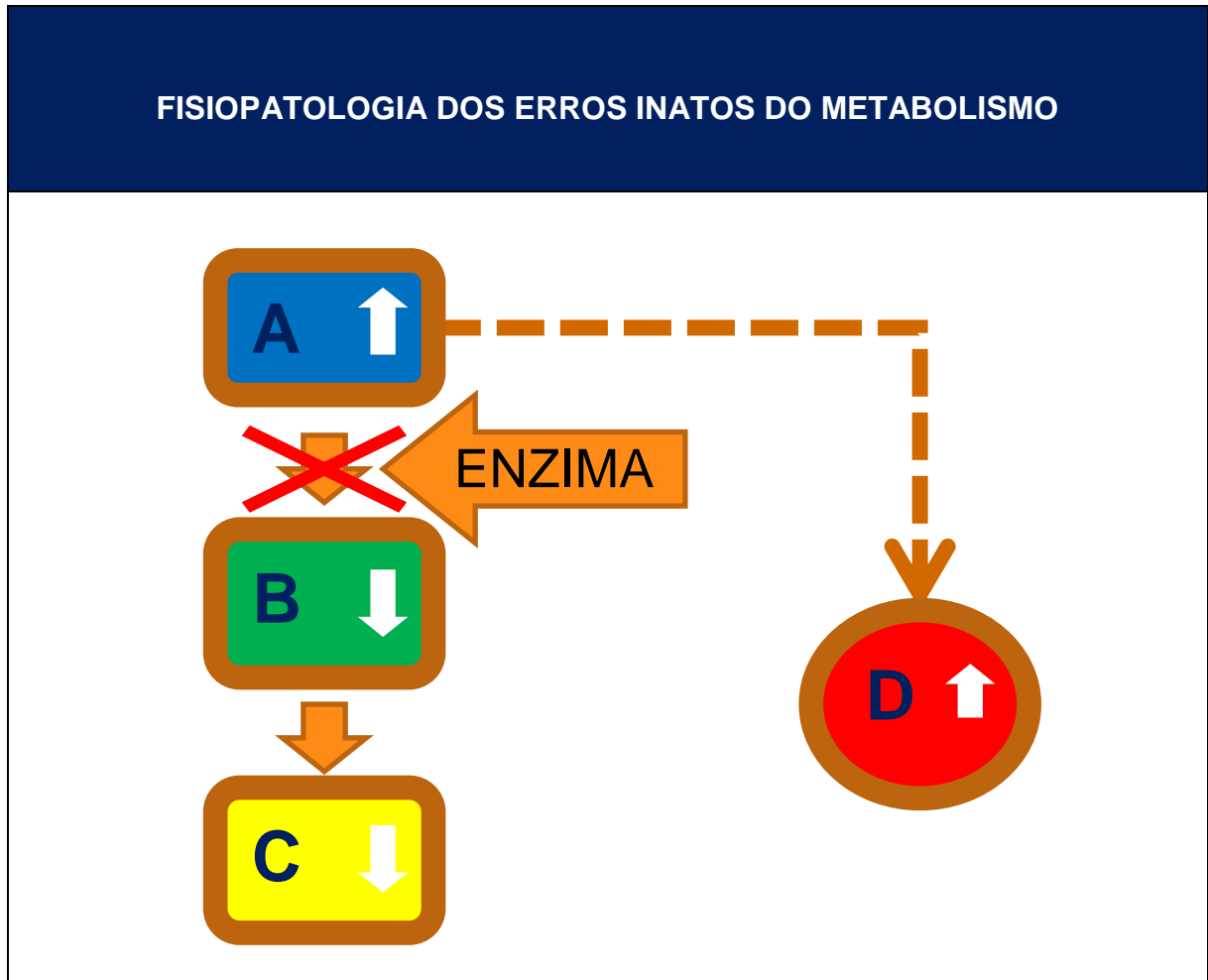
O termo “genética” vem do grego *geno* e significa fazer nascer. A Genética é a ciência dos genes, da hereditariedade e da variação dos organismos. É o ramo da Biologia que estuda a forma de transmissão das características biológicas de geração a geração. Entre os principais ramos da Genética estão a Genética Médica e a Genética de População⁽⁵⁾. O primeiro ramo estuda os fenômenos genéticos, os mecanismos da hereditariedade, o diagnóstico, o tratamento e o controle das doenças genéticas em humanos, enquanto a Genética de População se preocupa em identificar o perfil genético das populações, os efeitos de fatores como seleção genética, tamanho da população, mutação, migração e deriva genética nas frequências de vários genótipos e fenótipos, usando, para isso, uma variedade de técnicas genéticas. Desse modo, a DG, como uma patologia clínica, desperta o interesse da Genética Médica, enquanto sua elevada prevalência em populações, como em Tabuleiro do Norte, chama a atenção dos estudiosos da Genética de Populações.

2.2 Os Erros Inatos do Metabolismo (EIM)

Os EIM são doenças metabólicas hereditárias que resultam da falta de atividade de uma ou mais enzimas específicas ou defeitos no transporte de proteínas. As consequências podem ser o acúmulo de substâncias normalmente presentes em pequena quantidade (A), a deficiência de produtos intermediários críticos (B), a deficiência de produtos finais específicos (C) ou ainda o excesso de produtos nocivos de vias metabólicas acessórias (D), como mostra a figura 1⁽⁶⁾.

Os EIM representam vasta, diversificada e heterogênea coleção de cerca de 700 doenças genéticas provocadas por mutações raras que afetam a função de proteínas específicas, causando importantes morbidades e mortalidade, especialmente na infância. As dificuldades para registrar os casos de EIM e o aumento de diagnósticos de novas enfermidades têm dificultado o acúmulo de dados epidemiológicos mais consistentes em relação aos EIM. No entanto, estudos

recentes citam uma incidência cumulativa de EIM em torno de 1 em 800 nascidos vivos⁽⁷⁾.



FONTE: Adaptado de Martins et al.1999 ⁽⁶⁾

Figura 1 – Fisiopatologia simplificada dos erros inatos do metabolismo

O diagnóstico dos EIM permite o aconselhamento genético para os pais e, até mesmo, o diagnóstico pré-natal de patologias em gestações subsequentes. Contudo, quando não existe uma história familiar, o diagnóstico nem sempre é fácil, nesses casos, a única maneira prática de diagnosticar um EIM é por meio de programas de triagens neonatais⁽⁸⁾.

Para facilitar o estudo dos EIM, foram propostas várias classificações fundamentadas em manifestações clínicas ou laboratoriais. Uma das classificações mais didáticas dos EIM foi descrita por Saudubray e Charpentier (1995), que os agrupou de acordo com o fenótipo clínico, os sinais e os sintomas apresentados pelos pacientes (Quadro 1).

Quadro 1 – Classificação dos Erros Inatos do Metabolismo

CATEGORIA 1 – ENVOLVENDO UM SISTEMA FUNCIONAL
CATEGORIA 2 – AFETANDO VIAS METABÓLICAS COMUNS A UM GRANDE NÚMERO DE CÉLULAS OU ÓRGÃOS
<p>Grupo 1. Defeitos na síntese ou catabolismo de moléculas complexas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Doenças de Depósito Lisossômico • Doenças dos Peroxissomos • Outras
<p>Grupo 2. Defeitos no metabolismo intermediário</p> <ul style="list-style-type: none"> • Acidúrias Orgânicas • Defeitos do Ciclo da Ureia • Intolerância aos açúcares
<p>Grupo 3. Deficiências na produção ou utilização de energia</p> <ul style="list-style-type: none"> • Doenças Mitocondriais • Hiperlactemias Congênitas • Defeitos da beta-oxidação de Ácidos Graxos • Doenças de depósito do Glicogênio

FONTE: Adaptado de Martins, 1999⁽⁶⁾; e de Saudubray e Charpentier (2001)⁽⁹⁾.

2.3 As Doenças de Depósitos Lisossômicos (DDL)

Entre os EIM, está um grupo de cerca de 50 patologias genéticas, denominadas Doenças de Depósitos Lisossômicos (DDL), causadas por mutações em genes codificadores de enzimas ou de cofatores que levam a deficiências de proteínas lisossômicas e não lisossômicas, resultando no acúmulo de diferentes substratos não degradados dentro dos lisossomos^(10, 11).

Em geral, esses substratos são polímeros visíveis à microscopia óptica ou eletrônica, que normalmente não podem ser hidrolisados. Os tecidos afetados são aqueles nos quais a substância é catabolizada em grande quantidade: linfócitos circulantes, fibroblastos, fígado, baço, conjuntiva, medula óssea e mucosa intestinal⁽⁶⁾. Nas DDL, a síntese de moléculas complexas está comprometida e as patologias são agrupadas em grandes categorias de acordo com o substrato acumulado, conforme visto no quadro 2.

A prevalência isolada das DDL varia de 1:50.000 até 1:4.000.000 nascimentos, mas a incidência combinada de todas elas é de aproximadamente 1:7000 nascidos vivos⁽¹²⁾. No Brasil, as doenças lisossômicas correspondem a 59,8% dos EIM diagnosticados^(12, 13).

O quadro clínico de uma DDL depende do tipo e da quantidade de macromoléculas acumuladas nas células dos tecidos envolvidos e nas consequências patológicas dessa alteração⁽¹⁴⁾. Para a maioria das DDL, as alterações metabólicas começam na vida fetal, mas, em alguns casos, os sintomas só se manifestam mais tardiamente, dificultando o diagnóstico⁽¹⁵⁾.

As manifestações clínicas costumam ser progressivas, graves e, até mesmo, incuráveis. Embora o diagnóstico precoce seja importante, em alguns casos, favorece apenas a tomada de medidas preventivas, como a identificação de portadores, o diagnóstico pré-natal e o aconselhamento genético⁽¹¹⁾.

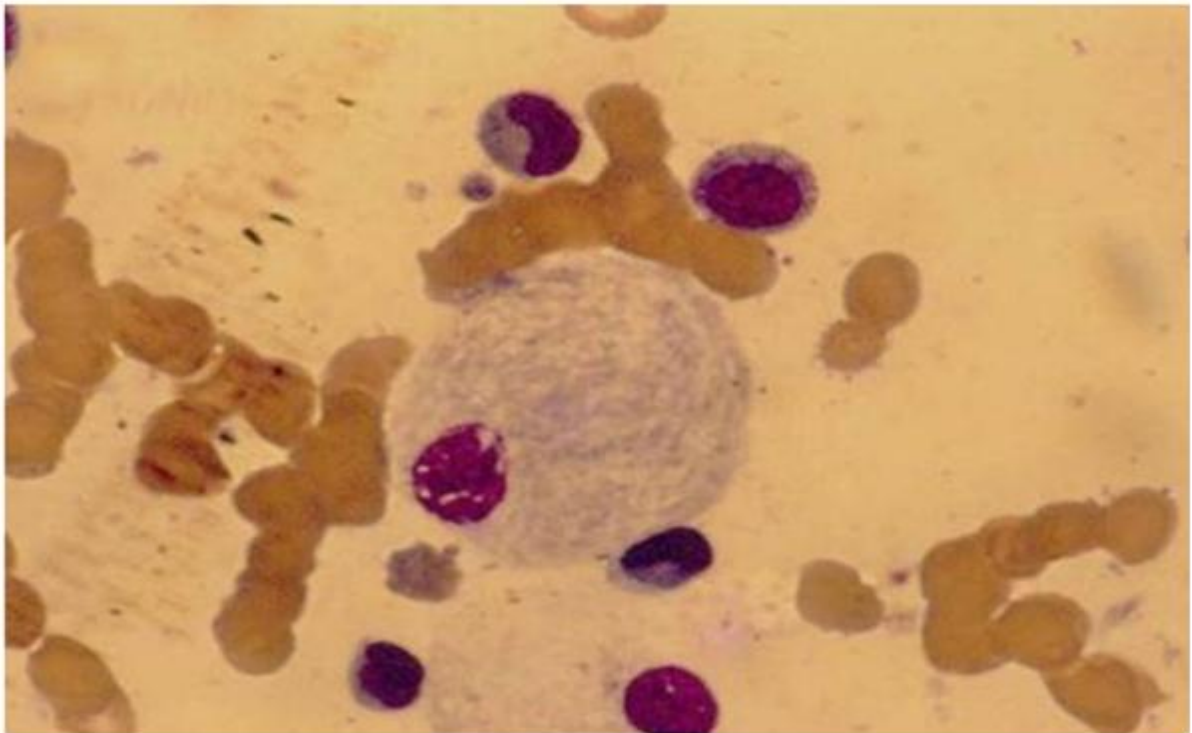
Quadro 2 – Classificação das doenças de depósitos lisossômicos

<p>1. ESFINGOLIPIDOSES: a falha ocorre na degradação de esfingolipídios.</p> <ul style="list-style-type: none"> • DG • Doença de Fabry • Doença de Niemann-Pick • Doença de Farber • Gangliosidoses: GM1; GM 2 • Leucodistrofia Metacromática • Doença de Krabbe
<p>2. MUCOPOLISSACARIDOSES: deficiência de hidrolases ou sulfatase.</p> <ul style="list-style-type: none"> • I-H - Hurler I-HS - Hurler - Scheie I-S - Scheie • II - Hunter • III - Sanfilippo • IV - Morquio • VI - Maroteaux - Lamy VII – Sly • Outras
<p>3. OLIGOSSACARIDOSES E GLICOPROTEINOSES: defeito na clivagem sequencial de resíduos de açúcar dos carboidratos das glicoproteínas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Doença de Pompe • Outras
<p>4. Outras</p>

FONTE: Adaptado de Futerman, Van Meer, 2004⁽¹⁰⁾.

2.4 A doença de Gaucher

A DG, a mais frequente DDL entre os humanos, é uma enfermidade causada pela deficiência da enzima GCCase, envolvida no metabolismo dos glucoesfingolipídios, que ajudam a metabolizar o GLcCer, um glicolipídio que se origina da decomposição da membrana de hemácias e leucócitos. A deficiência da GCCase leva ao acúmulo desse glucocerebrosídeo dentro dos lisossomos de células da linhagem monócito-macrófago, que passam a ter citoplasmas fibrilares, com aparência de “papel amassado”, com núcleos localizados excêntricamente e que reagem positivamente ao *Periodic Acid-Schiff* (PAS), sendo denominados de “Células de Gaucher” (CG), (Figura 2)⁽¹⁾.



FONTE: Foto cedida pelo Prof. Geraldo B. Cavalcanti, 2010.

Figura 2 – A Célula de Gaucher

As pseudo-células de Gaucher são histiócitos com citoplasma com inclusões em forma de agulha que se assemelham muito à CG e podem levar a erros no diagnóstico da doença. As pseudocélulas foram demonstradas em pacientes com leucemia mielóide crônica, talassemia, mieloma múltiplo, leucemia linfoblástica aguda, doença de Hodgkin, linfoma não-Hodgkin e síndrome mielodisplásica⁽¹⁶⁾.

Embora de forma rara, a DG pode ser causada também por mutações genéticas responsáveis pela produção de pró-saposina, um “ativador” da degradação do substrato, levando a graves manifestações clínicas nos pacientes⁽¹⁾. O gene da prosaposina (PSAP; MIM# 176801) codifica uma única proteína que sofre clivagem pós-traducional para originar quatro proteínas denominadas de Saposinas (SAPs) A, B, C e D. A Saposina C (SAP-C) é uma proteína ativadora necessária para a degradação do GlcCer, e sua deficiência resulta em uma forma variante da DG⁽¹⁷⁾.

Em raríssimas situações, a DG também pode resultar de mutações nos genes codificadores de proteínas da membrana integral dos lisossomos (LIMP-2) (SCRAB2; MIM# 602257) (18). LIMP-2 foi descrita como um receptor de Golgi da Gcase⁽¹⁹⁾ e sua deficiência foi documentada em pacientes com síndrome de mioclonia aguda e insuficiência renal que apresentavam sintomas muito semelhantes às manifestações neurológicas da DG3^(18, 20, 21).

2.5 Fatos históricos da doença de Gaucher

Em 1882, um médico francês chamado Philippe Charles Ernest Gaucher (26 de Julho, 1854 – 25 de Janeiro, 1918), nascido em Champlemy, no departamento de Nièvre, descreveu pela primeira vez as manifestações clínicas de uma mulher de 32 anos que apresentava hepatomegalia e esplenomegalia atribuídas por ele a um “tumor” no baço, que se encontrava infiltrado por um tipo incomum de células com núcleos grandes que, posteriormente, receberia o nome de CG⁽²²⁾. Todavia, foi somente 23 anos após descoberta que a enferminade passou a ser conhecida por DG, uma homenagem atribuída a N. E. Brill (Figura 3)⁽²³⁾.

Durante o período de 1895 e 1910, os pesquisadores Klaus, Rusca, Oberling e Woringer reconheceram ligações entre os sintomas viscerais da DG e uma enfermidade neurológica que acometia crianças de forma aguda, progressiva e fatal, que viria ser identificada como forma aguda neuropática da DG⁽¹⁾. Nessa mesma época, o mecanismo de herança genética e a ocorrência familiar da DG foram esclarecidos. O reconhecimento do envolvimento metabólico na enfermidade foi sugerido por Marchand (1907), mas a identificação da natureza lipídica do material

estocado veio somente em 1916⁽¹⁾. Em 1934, H. Aghion, na França, identificou que o lipídio envolvido na DG tratava-se de um glucocerebrosídeo⁽²³⁾.

Durante as décadas de 50 e 60, os avanços na DG ocorreram de forma substancial. Em 1965, Brady e colaboradores demonstraram que o acúmulo do glicocerebrosídeo era causado pela atividade deficiente da enzima Gcase⁽¹⁰⁾. Essa descoberta conduziu a pesquisas para tratamento da DG, fundamentadas nos princípios de reposição enzimática no qual a enzima deficiente poderia ser suplementada por uma enzima artificial ativa. Coube, porém, a Weinreb et al. (1968) a descoberta de que o defeito enzimático estava dentro dos lisossomos, e a DG passou a integrar o grupo das DDL⁽¹⁾.

Em 1985, nos EUA, Beutler e Ginns deram grande passo nos conhecimentos genéticos da DG ao descobrir que as mutações do gene produtor da glicocerebrosidase estão no cromossomo 1⁽²⁴⁾. Contudo, os maiores avanços aconteceram na década de 1990, que ficou marcada pelas pesquisas bem sucedidas de um tratamento para os pacientes com DG.

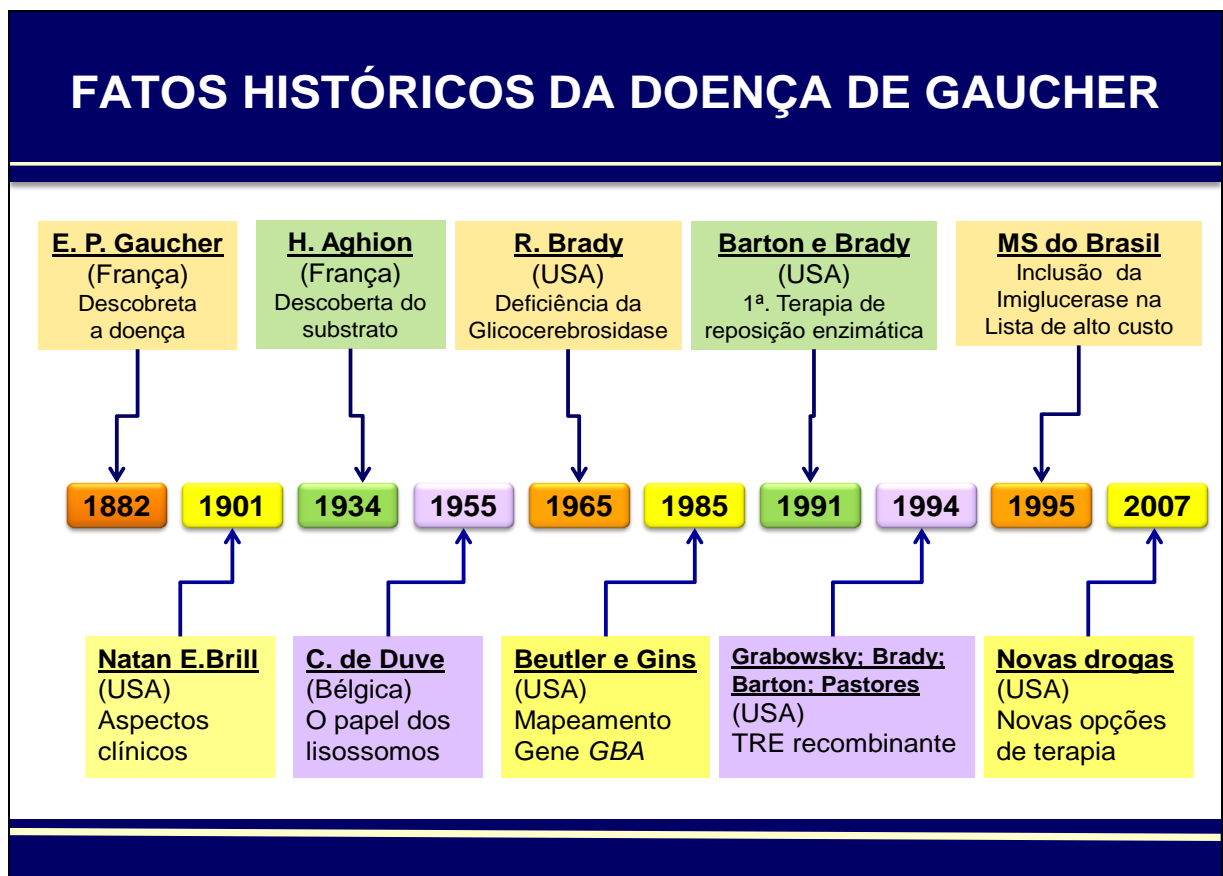
Em 1991, *U.S. Food and Drug Administration* (US-FDA) aprovou a primeira forma de Terapia de Reposição Enzimática (TRE) para DG a partir de enzimas extraídas de tecidos placentários. Posteriormente, a enzima passou a ser fabricada a partir de células de ovários de *hamsters* chineses, sendo modificada por tecnologia recombinante, dando, assim, origem à enzima Imiglucerase, aprovada pelo US-FDA para TRE em 1994. Desse modo, a DG se tornou a primeira enfermidade na qual uma enzima purificada, administrada por via endovenosa, tem mostrado ser efetiva em reverter a maioria dos sintomas⁽²⁵⁾.

Em 2002, surgiu nova estratégia de tratamento da DG fundamentada na redução do substrato que se encontra em excesso nos pacientes com DG, a Terapia de Redução do Substrato (TRS). Miglustat (Zavesca, Actelion Pharmaceutical, Switzerland), a primeira TRS para DG, é um inibidor da síntese de GlcCer autorizada para tratamento dos casos leves e moderados da DG em adultos^(13, 26).

Em 2010, surgiram novas drogas para TRE: Velaglucerase alfa, (Shire Human Genetic Therapies, MA, USA), aprovada como opção de TRE em longo prazo de

pacientes com DG1; e a Taliglucerase alfa (Protalix, Biotherapeutics, Carmiel, Israel) em fase 3 dos ensaios clínicos^(13, 26).

Novas drogas continuaram a surgir e a mais recente deles é o Eliglustat (Genzyme/Sanofi; nome comercial: Cerdelga), um medicamento oral que foi aprovado pelo US-FDA em agosto de 2014 para o tratamento da DG (27), sendo utilizado como sal de tartarato que se propõe a inibir a síntese de GC⁽²⁸⁾.



FONTE: Adaptada pelo autor de Adaptado de Futerman; Meer, 2004⁽¹⁰⁾.

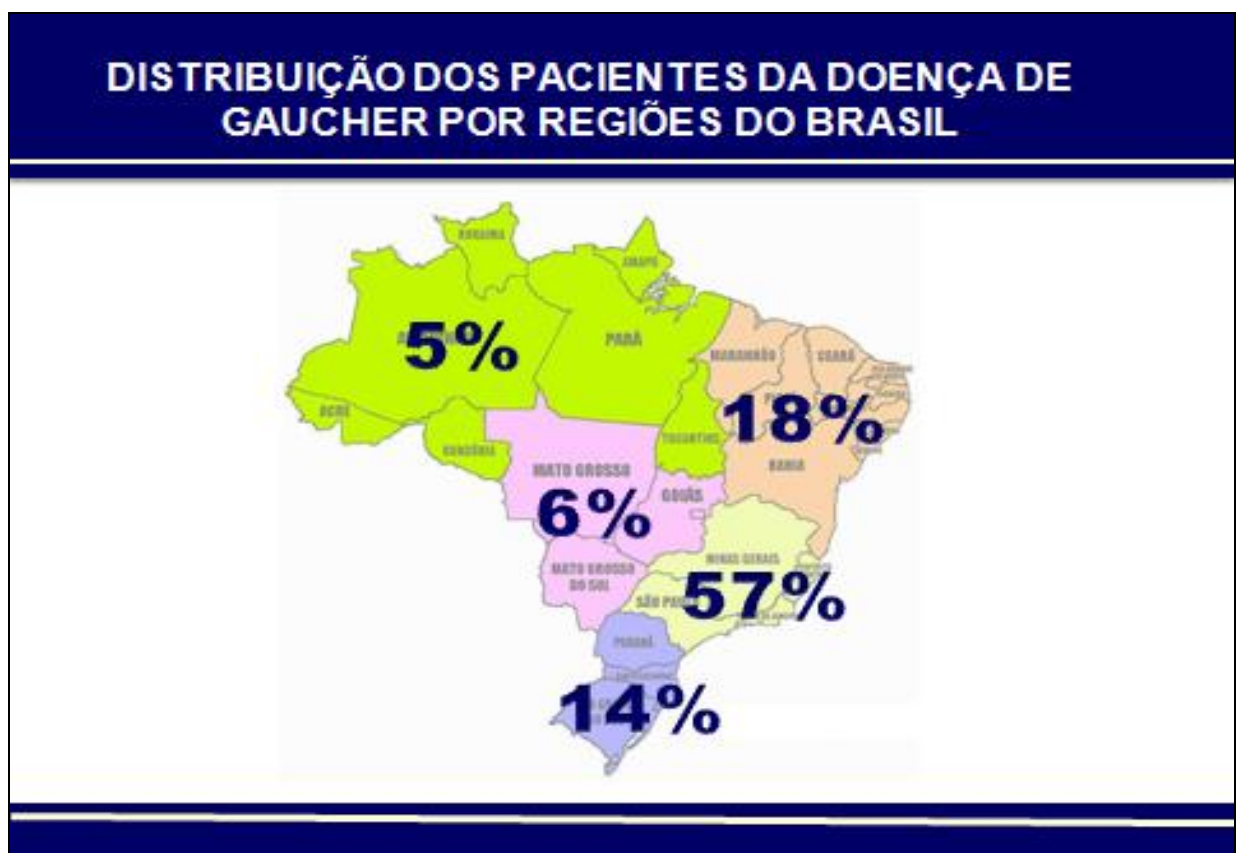
Figura 3 – Fatos históricos da doença de Gaucher

2.6 A epidemiologia da doença de Gaucher

A DG é pan-étnica e tem uma incidência estimada na população geral de 1:100.000 habitantes, sendo registrada sua maior prevalência entre os judeus Ashkenazi (1:400 a 1:800 habitantes)⁽²⁾. Na Austrália, em 1999, Meikle e colaboradores relataram uma frequência da DG de 1:57.000 habitantes⁽¹²⁾, enquanto um estudo similar realizado na Holanda registrou 1,16:100.000 habitantes (29).

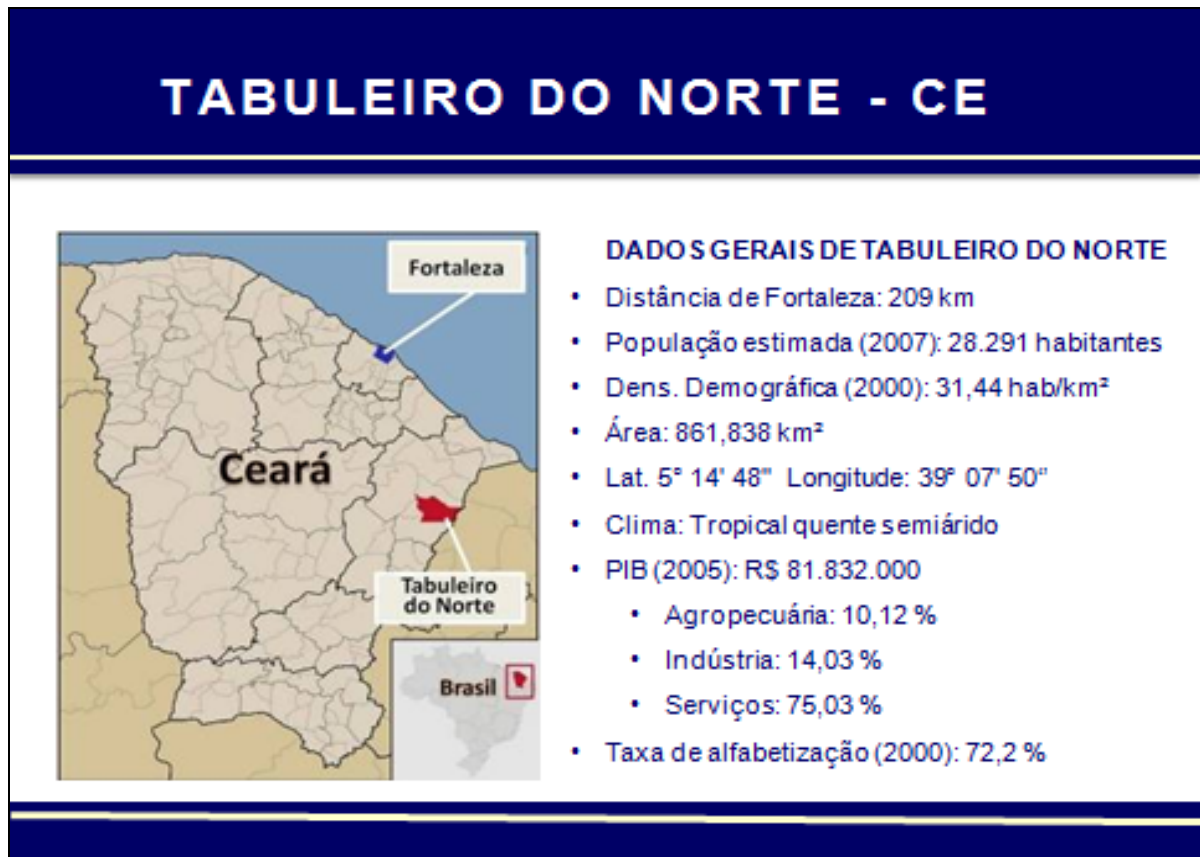
O *International Collaborative Gaucher Grupo* (ICGG) representa um grupo de especialistas provenientes de vários países que fornecem informações para o maior banco de dados de pacientes da DG, o *ICGG-Gaucher Registry*. Com base nos dados do mês de abril de 2014, estão registrados 5.775 pacientes com diagnóstico confirmado no *ICGG-Gaucher Registry*, dos quais 927 (16%) são pacientes da América Latina e 573 (10%) são brasileiros⁽³⁾.

No Brasil, a atualização dos dados de pacientes com DG ainda representa um desafio. Com base nos dados informados por Pedro Stellan, presidente da Associação Brasileira de pacientes com DG, em abril de 2011 havia na Região Sudeste do Brasil 57% dos pacientes brasileiros, com destaque para São Paulo (178 pacientes), Minas Gerais (84 pacientes) e Rio de Janeiro (76 pacientes), conforme mostrado na figura 4. No Ceará, estão 21 pacientes dos quais 1/3 desses são provenientes de Tabuleiro do Norte, uma pequena cidade situada a 209 km de Fortaleza, na microrregião do Vale do Jaguaribe, no leste do estado (Figura 5).



FONTE: Pedro Stellan, presidente da Associação Brasileira de Pacientes de Gaucher (informação verbal, abril de 2011).

Figura 4 – Distribuição dos pacientes da doença de Gaucher por regiões do Brasil



FONTE: Dados do site do Governo do Estado do Ceará, 2011.

Figura 5 – Localização geográfica e principais dados de Tabuleiro do Norte-CE

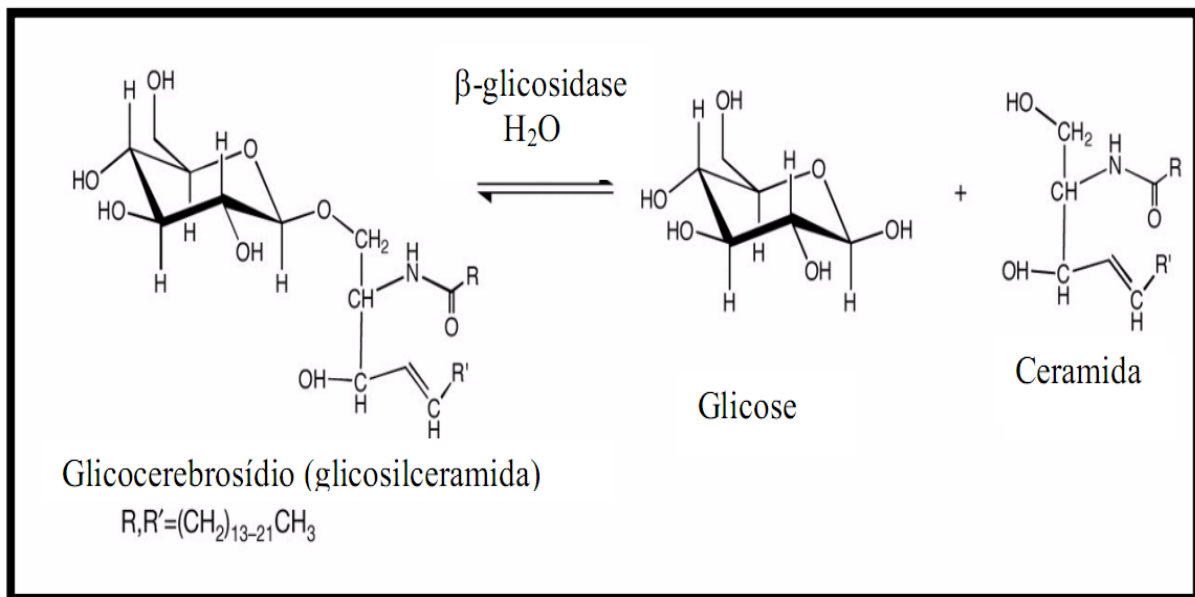
2.7 A bioquímica da doença de Gaucher

As alterações celulares ocorridas na DG estão nos lisossomos, organelas citoplasmáticas ácidas contendo enzimas líticas que são capazes de degradar substâncias localizadas no seu interior. A descoberta das funções dos lisossomos por Christian Duve, em 1955, permitiu avanços consideráveis nos estudos da DG^(10, 30, 31).

As enzimas lisossômicas são sintetizadas em polissomos ligados à membrana do Retículo Endoplasmático Rugoso (RER). No RER, o peptídeo sinalizador é removido e as proteínas são translocadas para o Complexo de Golgi, onde ocorre a fosforilação dos oligossacarídeos, permitindo o reconhecimento do receptor manose-6-fosfatos (M6P). Para a entrada das proteínas dentro dos lisossomos, são necessários receptores de M6P, e os transportadores específicos na membrana lisossômica devolvem os produtos desse catabolismo para o citoplasma^(30, 32).

As macromoléculas (lipídios, glicomaminoglicanos, oligossacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos) são direcionadas para o interior dos lisossomos por mecanismos como endocitose, pinocitose, fagocitose ou autofagocitose para serem metabolizados por cerca de 60 enzimas lisossômicas e uma dezena de proteínas acessórias após a morte celular^(31, 33, 34).

O gene da Gene da Glucocerebrosidase Ácida (GBA) é o responsável por codificar a GCase, uma proteína de 497 aminoácidos⁽³⁵⁾, homodimérica, com uma subunidade glicosilada composta de 7% de carboidratos, 13% de resíduos básicos (lisina, arginina e histidina) e o restante é de aminoácidos apolares, caracterizando uma proteína hidrofóbica que realiza a hidrólise da ligação β -glucosil do GC nos lisossomos (figura 6)^(36, 37). Para isso, a GCase necessita da ação coordenada de um cofator (a saposina C) e de lipídios carregados de íons negativos para que ocorra a atividade máxima da enzima^(38, 39).



FONTE: Adaptada de Dvir; Harel, et al., 2003⁽³⁹⁾

Figura 6 – Reação catalisada pela β -glucocerebrosidase humana

As SAPs são proteínas não enzimáticas que participam da degradação dos Glicoesfingolípídios (GELs) ligados à membrana por exohidrolases solúveis em água. As SAPs (A, B, C e D) são derivadas de uma única proteína precursora chamada de prosaposina por meio de um processamento proteolítico e elas se diferenciam por suas especificidades e modos de ação⁽¹⁴⁾.

A SAP-C, uma proteína de 20 KDa com estrutura homodimérica, codificada por um gene no cromossomo 10q21-q22, foi isolada em baço de pacientes com a DG (40). Indivíduos com deficiência da saposina C ou da prosaposina podem apresentar sintomas neuronopáticos graves da DG (oftalmoplegia horizontal progressiva, sinais piramidais e cerebelares, espasmos mioclônicos e convulsões generalizadas)⁽⁴¹⁾ ou sintomas da doença não-neuropática⁽⁴²⁾. Estes indivíduos acumulam GlcCer em vísceras, causando hepatoesplenomegalia, embora a atividade da enzima GCase medida *in vitro* possa ser normal⁽⁴³⁾.

Apesar da atividade da GCase está diminuída de modo acentuado nos pacientes com DG, estima-se que os níveis residuais das atividades enzimáticas da GCase em pacientes com DG oscilem entre 5% e 25% da atividade enzimática normal, dependendo do substrato utilizado e das condições das reações^(31, 44-47).

Acreditava-se que a gravidade dos sintomas da DG dependia somente do nível de atividade residual da GCase⁽¹⁾, mas as evidências atuais indicam que as alterações fenotípicas da DG dependem também da resposta inflamatória induzida pelas CG, pois a quantidade de lipídios contida nessas células representa menos de 2% da massa de tecido adicional do fígado e do baço, que se encontram muito aumentados na DG⁽³⁸⁾.

As CG estimulam a liberação de citocinas como interleucinas-1 α (IL-1 α), interleucina-6 (IL-6)⁽⁴⁸⁾ e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (49). Essas substâncias também alteram o metabolismo energético, causando diversas anormalidades em proteínas plasmáticas e em outros constituintes do sangue, como imunoglobulinas, fatores de coagulação, lipoproteínas, ferritina, transcobalamina II, Enzima Conversora de Angiotensina (ACE), enzimas lisossômicas e quitotriosidase⁽³⁸⁾.

2.8 Bases moleculares da doença de Gaucher

O gene GBA, codificador da GCase ácida, abrange 7 kb com 11 exons, e o cDNA é de aproximadamente 2,5 kb. Dois diferentes códonos ATG a montante são utilizados como locais de iniciação da tradução. A análise das mutações, entretanto, pode ser comprometida pela presença de um pseudogene da GBA (PSGBA;

GenBank-EMBL J03060), não-funcional, localizado a 16 kb do gene funcional e que abrange apenas 5,7 kb de DNA. O PSGBA é menor 2 kb do gene funcional porque apresenta perdas de algumas bases nucleotídicas causadas por grandes deleções dentro de vários introns⁽³⁵⁾.

Apesar de o PSGBA apresentar acentuada homologia com o gene funcional o qual 96% de identidade entre seus nucleotídeos^(1, 50), não há grande dificuldade para identificá-lo, uma técnica que consiste no uso de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) *de long-template* e *primers* de PCR para gerar simultaneamente fragmentos de 5,6 kb a partir do gene GBA e fragmentos de 3,9 kb provenientes do PSGBA é capaz de distinguir o PSGBA do gene funcional⁽⁵¹⁾.

Um novo gene localizado em 9p13.3, identificado como Gene da β -glucocerebrosidase Ácida Biliar (GBA2), é o codificador da GCase microssomal envolvida na hidrólise de ácido biliar 3-O-glucosídeo endógeno⁽⁵²⁾, assim como na reação reversa, que consiste no transporte de glicose para substratos lipídicos diferentes. Como uma enzima do metabolismo dos esfingolipídios, ela desempenha um papel numa variedade de respostas celulares e em componentes estruturais da membrana plasmática^(53, 54). Mutações no gene GBA2 têm causado uma forma autossômica recessiva de ataxia cerebelar com espasticidade⁽⁵⁵⁾ e uma paraplegia espástica autossômica recessiva⁽⁵⁶⁾.

Já foram descritas mais de 300 mutações causadoras da DG, e a combinação delas em ambos os alelos pode determinar as manifestações fenotípicas: DG1-não-neuropática (MIM 230800), DG2- neuropática aguda (MIM 230900), DG3- subaguda neuropática (MIM 231000) ou DG IIIC⁽⁵⁷⁾. A maioria das mutações conhecidas no gene GBA diminui a atividade catalítica ou reduz a estabilidade da enzima GCase de forma parcial ou total⁽⁵⁸⁾.

A maioria das mutações (75%) é do tipo *missense*. Mutações *non-sense* (6,4%), mutações no sítio de *splice* (0,5%), pequenas inserções e deleções (13,5%), e alelos complexos (0,5%) também foram descritos como causadoras de DG. Alelos complexos que contêm mais de uma mutação resultante, provavelmente, da recombinação homóloga entre um gene ativo e um pseudogene⁽⁵⁹⁾, ocupando o mesmo *locus* no cromossomo 1q21, também podem causar a doença⁽⁶⁰⁾.

Quanto aos danos causados, as mutações podem ser classificadas em brandas, graves e nulas, e a combinação entre elas pode determinar a gravidade da doença. Por exemplo, os pacientes homocigotos para mutação N370S desenvolvem as formas não-neuropáticas, enquanto os homocigotos para a mutação L444P, com frequência, desenvolvem a forma neuropática da doença^(61, 62). Entretanto, após analisar 60 pacientes com DG1 e DG3, Sidransky e colaboradores (2004) constataram que as mutações N370S (606463.0003), L444P, R463C (606463.0008), 84insG (606463.0014) e IVS2+1G-A (606463.0015) foram identificadas em pacientes com ou sem manifestações neurológicas⁽⁶³⁾. Esses achados, mostrados no quadro 3, sugerem que pacientes que compartilham genótipos idênticos podem exibir manifestações clínicas muito heterogêneas.

Desse modo, entende-se que a correlação genótipo-fenótipo é limitada e incompleta, pois há muitas variações entre pacientes com a mesma forma clínica e entre os que apresentam o mesmo genótipo^(63, 64). Genes modificadores, proteínas transportadoras, genes contíguos, proteínas ativadoras, substratos alternativos e fatores ambientais podem contribuir significativamente para o fenótipo dos pacientes com DG⁽⁶⁴⁾. Assim sendo, deve-se ter cautela ao se confiar apenas na genotipagem para prever o prognóstico ou afirmar sobre a necessidade de terapia⁽⁶¹⁾.

Algumas mutações são mais prevalentes em determinadas populações. As mutações N370S (1226a>g), L444P (1448t>c), 84gg e IVS2+1 estão presentes em aproximadamente 95% dos pacientes judeus Ashkenazi. Entre pacientes não-judeus, as mutações N370S e L444P estão presentes em 60 a 75% dos alelos^(51, 65-68). No Brasil, as mutações mais prevalentes são N370S (47%), L444P (27%), e G377S (2,2%), e o genótipo N370S/L444P foi o mais encontrado nos estudos realizados com a análise do DNA de pacientes com DG⁽⁶⁹⁾.

A mutação N370S, por exemplo, é mais prevalente entre portugueses (63%) e espanhóis (46%) do que entre grupos de indivíduos não-judeus do oeste, centro e leste da Europa (70, 71), enquanto a mutação L444P é comum entre não descendentes de judeus^(18, 72).

Embora a relação entre genótipos e fenótipos não seja absoluta, a ocorrência de alelos mutantes do tipo L444P (41%) e F2131 (14%) em pacientes japoneses,

assim como, L444P (54%) e RecNcil (25%) entre pacientes chineses, poderia explicar a elevada incidência de doença neuropática nessas populações⁽⁷³⁾.

Quadro 3 – Características das principais mutações da doença de Gaucher

Mutação	Local	Tipo de mutação	Gravidade	Característica/correlação
N370S	EXON 9	Pontual 226A>G	Leve	- 30% de pacientes da DG - Enzima com atividade catalítica reduzida (10 a 20%) - Previne o envolvimento neurológico
L444P	EXON 10	Pontual 1448T>C	Grave	- 35% de pacientes da DG - Enzima instável com baixa ou nenhuma atividade catalítica - Em homozigose está relacionada com os tipos 2 e 3
G377S	EXON 9	Pontual 1 1246G>A	?	- Alta frequência em pacientes portugueses
55Del	EXON 9	Deleção de 55pb	Alelo nulo	- Destrói o sítio de anelamento dos primers (N370S e L444P)
RecNcil (L444P+A456P+V460V)	EXON 10	Combinação de mutações	Grave	- Produz um fenótipo mais grave
RecTL (D409H+L444P+A456P+V460V)	EXON 10	Combinação de mutações	Grave	- Produz um fenótipo mais grave
E326K	EXON 8	Pontual 1093G>A	Grave	- Quando combinada com uma mutação grave

FONTE: Adaptado de Mistry, 1995⁽⁵¹⁾; Tayebi, Cushner, et al., 1996⁽⁶⁵⁾; Tayebi, Stern, et al., 1996⁽⁶⁶⁾; Le Coutre, Demina, et al., 1997⁽⁶⁷⁾; e Cormand, Harboe, et al., 1998⁽⁶⁸⁾.

2.9 Manifestações clínicas da doença de Gaucher

DG apresenta um espectro contínuo de manifestações clínicas que vai desde uma doença assintomática a uma forma perinatal grave e letal. Muitas vezes, o diagnóstico é feito durante o exame físico ou por exames laboratoriais de rotina. As manifestações clínicas mais comuns da DG incluem: anemia, trombocitopenia, hepatoesplenomegalia e complicações ósseas (dores, lesões e crises ósseas, infartos corticais e medulares, expansão medular, osteopenia, osteonecrose e

fraturas patológicas)^(74, 75). A raridade da doença e a heterogeneidade das manifestações clínicas dificultam o diagnóstico precoce da DG⁽⁷⁶⁾.

Existem três principais fenótipos da DG: não neuropático (DG1; Tipo I, 230800), neuropático agudo (DG2; Tipo II, 230900) e neuropático subagudo (DG3; Tipo III, 231000)⁽²⁾. Ainda é possível acrescentar mais dois outros subtipos: perinatal-letal e cardiovascular. A classificação mostrada no quadro 4 é útil na avaliação de prognóstico e para o acompanhamento dos pacientes⁽⁶⁴⁾.

Quadro 4 – Manifestações clínicas dos subtipos da doença de Gaucher

SUBTIPO	Envolvimento do SNC	Doença óssea	Outros sinais
DG1	Não	Sim	Esplenomegalia, Hepatomegalia Citopenia Doença pulmonar
DG2 Aguda ou infantil	Sinais Bulbares Sinais Piramidais Déficit cognitivo	Não	Esplenomegalia Hepatomegalia Citopenia Doença pulmonar Alterações dermatológicas
DG3 Subaguda ou juvenil	Apraxia oculomotora Convulsões Epilepsia mioclônica progressiva	Sim	Esplenomegalia Hepatomegalia Citopenia Doença pulmonar
DG Perinatal Letal	Sinais Piramidais	Não	Alterações de pele Ictiosiforme Hidropsia fetal não-imune
DG Cardiovascular	Apraxia oculomotora	Sim	Calcificação das valvasmitral e aórtica Opacidade da córnea Esplenomegalia Moderada

FONTE: Adaptado de Pastores, 2015⁽⁴³⁾.

Os pacientes com DG3 podem ser agrupados em 3 subtipos: DG IIIA, com doença neurológica progressiva manifestada como mioclonia e demência; DG IIIB, com doença visceral e óssea agressivas e com manifestações neurológicas limitadas à paralisia horizontal supranuclear do olhar; e DG IIIC, com doença neurológica limitada à paralisia horizontal supranuclear do olhar, opacidade da

córnea e calcificações de valvas cardíacas, mas, em geral, com pouca doença visceral⁽¹⁾.

A hepatoesplenomegalia se deve ao acúmulo de CG que são responsáveis pelas manifestações não neurológicas da doença. A esplenomegalia e a infiltração dessas células na medula culminam com trombocitopenia que, quando associadas à diminuição de fatores de coagulação, podem causar hemorragias (77). Nos pulmões, o acúmulo de CG pode produzir shunts arteriovenosos graves, levando à hipoxemia e/ou doenças pulmonares restritivas⁽¹⁾.

Em pacientes com DG, o baço pode atingir de 1.500 a 3.000cm³ (volume médio do baço em adultos normais: 50-200cm³) com conseqüente hiperesplenismo associado à pancitopenia. Dores abdominais agudas podem ser resultados de infartos esplênicos, entretanto, cirurgias emergenciais motivadas por roturas esplênicas são raras⁽⁷⁸⁾. Hepatomegalia é comum, embora insuficiência hepática e cirrose sejam raras⁽⁴³⁾.

Anemia na DG pode resultar de hiperesplenismo, hemodiluição durante a gravidez, deficiência de ferro ou de vitamina B₁₂, e, em paciente com doença avançada, há diminuição da eritropoese como resultado de infiltração da medula óssea por CG ou infarto medular. A leucopenia raramente é grave o suficiente para exigir intervenção, mas neutrófilos deficientes têm sido relatados em pacientes com DG⁽⁴³⁾.

Deficiência adquirida ou hereditária de fatores de coagulação pode ocorrer, como a deficiência de fator XI entre judeus Ashkenazi. Estudos em pacientes egípcios com DG1 revelaram deficiência de uma ampla variedade de fatores de coagulação (fibrinogênio, fator II, VII, VIII, X e XII), e, mesmo com contagem normal de plaquetas, os pacientes podem apresentar sangramentos motivados por anormalidades na função de agregação das plaquetas⁽⁷⁹⁾.

O envolvimento pulmonar na DG pode ocorrer na forma de doença pulmonar intersticial grave, consolidação alveolar/lobar ou mesmo hipertensão pulmonar, nem sempre relacionado às manifestações hepáticas apresentadas pelos pacientes⁽⁸⁰⁾.

Alterações ósseas como osteopenia, lesões líticas focais, necrose de cabeça de fêmur e, até mesmo, fraturas patológicas podem ocorrer em pacientes com doença avançada⁽¹⁾. Manifestações de dores ósseas agudas, como “crises ósseas” ou episódios de dores ósseas intensas, estão habitualmente limitadas a uma extremidade ou articulação, sendo acompanhadas por febre, leucocitose e hemocultura estéril^(43, 81). A região acometida poderá apresentar edema e dor à palpação, detectadas por exames radiológicos, como elevação do periósteo compatível com edema ou hemorragia (“pseudo-osteomielite”). Pode não haver correlação entre as manifestações ósseas, hematológicas e viscerais⁽⁸²⁾.

Quando ocorrem manifestações neurológicas em pacientes com DG tipo 1, elas estão relacionados a complicações neurológicas secundárias à doença óssea, como compressão de vértebras, ou a coagulopatias, como hematomielia. Elas não acontecem por envolvimento primário do Sistema Nervoso Central (SNC)⁽⁸³⁾. Acredita-se que a incidência de neuropatia periférica na DG possa ser maior do que as diagnosticadas^(84, 85).

DG2 e DG3 são caracterizadas pela presença de manifestações neurológicas primárias. No passado, os pacientes com DG2 e DG3 foram distinguidos pela idade de início dos sintomas neurológicos e pela velocidade de progressão da doença, mas estas diferenças não são tão precisas. Doença com início antes do segundo ano de vida, com desenvolvimento psicomotor limitado, curso rápido e progressivo com óbito entre dois anos e quatro anos deve ser classificada como DG2⁽⁴³⁾.

A distinção entre DG2 e DG3 não é absoluta, pois a DG3, neuropática, apresenta um espectro contínuo⁽⁸⁶⁾. Sinais bulbares incluem estridor, estrabismo e dificuldade de deglutição. Sinais piramidais incluem opistótomo, retroflexão da cabeça, espasticidade e trisma. Apraxia oculomotora e nistágno otocinético são comuns⁽⁸⁷⁾. Crises convulsivas tônico-clônicas generalizadas e epilepsia mioclônica progressiva têm sido observadas em alguns indivíduos (88, 89). Demência e ataxia têm sido observadas em estágios avançados da doença neurológica crônica. A Ressonância Magnética (RM) do cérebro pode mostrar atrofia cerebral, mas exames de eletroencefalograma e RM do cérebro normais não excluem o comprometimento neurológico dos pacientes com DG⁽⁴³⁾.

A DG3 em indivíduos pode ter início antes da idade de dois anos, mas, muitas vezes, têm uma evolução mais lenta e progressiva, com sobrevivência até a terceira ou quarta década de vida. A forma perinatal-letal é associada à ictiose ou doença de pele grave ou com hidropisia fetal não-imune⁽⁴³⁾.

A DG é progressiva ao longo do tempo e, se não tratada, pode levar a mortes prematuras provocadas por complicações hemorrágicas, doença hepática, sepse, doença pulmonar, hipertensão pulmonar e complicações decorrentes da doença óssea avançada⁽⁷⁶⁾. A evolução da DG depende da idade do início dos sintomas e/ou sinais que podem ser agravados por intercorrências, como infecção pelo vírus Epstein-Barr ou gravidez, que podem facilitar o diagnóstico da DG⁽⁹⁰⁾. Lembrando que a gravidez não está contraindicada em pacientes da DG, exceto se houver severa hipertensão pulmonar associada⁽⁴³⁾.

Não raro, a DG é diagnosticada no paciente já em estado grave (Figura 7), demonstrando que atrasos de diagnóstico podem resultar em complicações graves atribuíveis à doença. Desse modo, a educação médica é necessária para aumentar a detecção precoce e, quando necessário, o tratamento dos pacientes com DG⁽⁷⁶⁾.



FONTE: Dados do autor. Publicação da foto autorizada pelo paciente (2009).

Figura 7 – Comprometimento visceral e ósseo de paciente com doença de Gaucher

2.10 Diagnóstico da doença de Gaucher

Durante muitos anos, o diagnóstico da DG foi baseado na identificação da CG em tecidos de indivíduos que apresentavam anemia, hepatoesplenomegalia e dores ósseas⁽⁹¹⁾. As CG são caracterizadas por citoplasma com aparência fibrilar, núcleo excêntrico, semelhante aos macrófagos alternativamente ativados⁽⁹²⁾.

Nos dias atuais, entretanto, o diagnóstico da DG tem sido feito pela avaliação da atividade enzimática da GCase em leucócitos de sangue periférico⁽⁴³⁾ ou por cultura de fibroblastos colhidos por biopsia de pele, ou pela análise molecular das mutações⁽⁹³⁾. Atividade de GCase em leucócitos ou fibroblastos menor do que 10% do valor normal ainda é o padrão de diagnóstico de DG. A avaliação enzimática, entretanto, apresenta algumas dificuldades. As principais limitações dos testes enzimáticos são a labilidade da atividade enzimática, a falta de correlação entre a atividade enzimática *in vitro* com o tipo e a gravidade da doença, e também não permitem a diferenciação entre indivíduos portadores e normais⁽⁹¹⁾.

O diagnóstico de mutações patogênicas no gene da GBA é de grande importância, pois podem, em alguns casos, prever a gravidade do prognóstico, permitindo aconselhamento genético adequado e facilitando a realização dos programas de rastreamento populacional em grupos de risco^(94, 95). As correlações entre o genótipo e fenótipo na DG são úteis, principalmente, para a distinção entre as formas neuropáticas e não-neuropáticas, embora não sejam tão precisas na predição de gravidade dentro de cada tipo da doença, em especial, na DG1, que é a forma mais prevalente e variável da enfermidade⁽⁹¹⁾.

A principal limitação da análise molecular é quanto à sensibilidade. Como a DG é de transmissão autossômica recessiva, os indivíduos afetados deverão ter dois alelos com a mesma mutação ou uma mutação diferente em cada um dos alelos. Assim, a sensibilidade real da análise de DNA depende do conhecimento prévio de quais mutações deverão ser pesquisadas e da frequência combinada dessas mutações em pessoas de um mesmo grupo étnico⁽⁹¹⁾.

2.11 Diagnóstico de portadores de mutações da doença de Gaucher

Muitas vezes, os termos portadores e heterozigotos são usados como sinônimos. Todavia, portadores são pessoas que apresentam apenas um alelo mutante, enquanto heterozigotos podem apresentar alelos com duas mutações diferentes. Apesar de os indivíduos portadores terem atividade da GCase suficiente para uma vida saudável, a determinação da condição de portador é importante por suas implicações reprodutivas⁽⁹¹⁾.

Os testes enzimáticos têm grande utilidade para diagnosticar afetados da DG, mas não podem distinguir com segurança os portadores dos indivíduos não-portadores. Embora se saiba que os indivíduos portadores têm, em média, metade da atividade enzimática da GCase em leucócitos ou fibroblastos apresentada pelos indivíduos não-portadores, a sobreposição de valores entre as duas condições não permite a distinção entre eles. Isso porque, apesar de várias tentativas de refinar o ensaio enzimático, cerca de um terço dos portadores apresenta atividade de GCase definida como normal, levando ao diagnóstico equivocado de não-portador⁽⁴⁾.

Ao contrário dos testes enzimáticos, o exame de DNA é inequívoco para as mutações identificadas previamente. Portanto, em famílias com mutações conhecidas, a análise molecular de DNA identifica portadores e não-portadores com precisão absoluta. Nas famílias em que uma ou ambas as mutações são desconhecidas, a identificação de indivíduos portadores deve estar fundamentada na pesquisa da mutação familiar por sequenciamento completo do gene GBA. Por motivos técnicos e financeiros, a realização em larga escala de exames de sequenciamento do gene GBA é complicada, e, raramente, eles são realizados fora do ambiente de pesquisa⁽⁹¹⁾.

2.12 Avaliação complementar por imagem na doença de Gaucher

Alterações clínicas ou radiológicas relacionadas à doença óssea acometem de 70% a 100% os pacientes com DG1. As lesões ósseas podem variar de osteopenia assintomática a lesões líticas ou escleróticas e, até mesmo, osteonecrose⁽⁹⁶⁾. A doença também pode causar dores ósseas crônicas, fraturas patológicas e colapso

subcondral associado à artrite degenerativa, sendo, muitas vezes, o aspecto mais debilitante da DG1⁽⁹⁷⁾.

Os achados radiográficos dos ossos demonstram o grau de infiltração e substituição da medula óssea pelas CG, que resultam em perda do trabeculado ósseo, e a diminuição da densidade ocorre com mais frequência na epífise e metáfise dos ossos longos^(98, 99). Uma das características mais relevantes é o alargamento ósseo associado ao afinamento da cortical, causando alteração da concavidade, abaulando o contorno da porção distal do fêmur, resultando na clássica imagem em “frasco de Erlenmeyer”. Na superfície endosteal, ocorre esclerose ou erosão do córtex⁽⁹⁹⁾.

A RM revela o grau de infiltração da medula óssea que, em geral, se estende dos esqueletos axial até o apendicular. O envolvimento maior ocorre nas extremidades inferiores e proximais dos ossos afetados. As epífises são geralmente poupadas, exceto em casos avançados. Estudos de densitometria óssea podem avaliar o grau de osteopenia⁽⁴³⁾.

2.13 Biomarcadores da doença de Gaucher

Algumas substâncias químicas apresentam alterações consideráveis durante a evolução da DG e, por isso, podem ser utilizadas como biomarcadores para fins de monitorização da doença. Entretanto, não é possível ainda fazer recomendações formais de tratamento baseadas somente no uso de marcadores específicos da DG⁽¹⁰⁰⁾. Além disso, não se sabe se os níveis dos biomarcadores, por ocasião do diagnóstico da DG, podem prever prognósticos de pacientes e a resposta deles à terapia⁽¹⁰¹⁾.

A quitotriosidase, uma quitinase humana, é produzida acentuadamente pelas células de armazenamento, sendo considerada como o mais importante biomarcador na DG⁽¹⁰²⁾. Uma relação linear entre os níveis de quitotriosidase e de GlcCer, assim como uma diminuição drástica nos valores da quitotriosidase foram relatadas em pacientes submetidos à TRE⁽¹⁰³⁾. Por isso, Hollak e colaboradores (2001) propuseram que a redução da atividade da quitotriosidase de menos que 15% depois de 12 meses de TRE associada a uma resposta insuficiente de pelo menos

um parâmetro clínico poderia ser motivo para considerar um aumento de dose do medicamento. Além disso, a persistência de níveis elevados de quitotriosidase durante o tratamento deveria alertar o médico para a possibilidade de piora clínica e da necessidade de ajuste de dose⁽¹⁰⁴⁾.

Uma limitação para a utilização de quitotriosidase como um marcador da DG ocorre em 3% a 5% dos indivíduos da população geral, nos quais a presença de um alelo nulo no gene da quitotriosidase faz com que eles não produzam nenhuma atividade dessa enzima⁽¹⁰⁵⁾.

Os níveis de Fosfatase Ácida Tartarato Resistente (TRAP), da Enzima Conversora de Angiotensina (ACE) e de ferritina também se alteram durante a evolução clínica da DG (103, 106). Devido à ativação de macrófagos, os níveis séricos desses marcadores aumentam com a progressão da doença e regredem, em geral, com a TRE⁽¹⁰⁷⁾. Essas alterações podem ser úteis para prever complicações ósseas⁽¹⁰⁸⁾.

A origem de TRAP no soro de pacientes de DG é complexa, mas a TRE tem sido importante para promover uma redução parcial da atividade dessa enzima no plasma⁽¹⁰⁹⁾. TRAP e quitotriosidase parecem ser os únicos marcadores que não apresentam sobreposição de valores entre pacientes da DG e indivíduos controles⁽¹⁰²⁾.

ACE e lisozimas, cujos níveis estão aumentados no plasma em resposta à ativação de monócitos e macrófagos, têm também sido usadas como marcadores da DG⁽¹⁰²⁾. A síntese ativa de ACE nas CG pode ser responsável pelos níveis elevados da enzima no soro e no baço de pacientes com DG, enquanto altos níveis elevados de lisozima podem refletir um aumento do número de células retículoendoteliais⁽¹¹⁰⁾. Apesar da falta de diretrizes oficiais a respeito do uso de marcadores na monitorização da DG, na prática, a quitotriosidase, a TRAP e a ACE são usadas com essa finalidade⁽¹¹¹⁾.

Níveis elevados de ferritina em pacientes da DG1 também podem refletir a ativação de macrófagos desencadeada pelo acúmulo de substratos, demonstrada pelo aumento de CCL18 (citoquina), e de proteínas 1 α ou 1 β ⁽¹¹¹⁾. A diminuição

acentuada dos níveis de ferritina no sangue está associada à TRE, especialmente, em pacientes que não realizaram esplenectomia⁽¹¹²⁾.

Alterações nas concentrações séricas de osteocalcitonina, de fosfatase alcalina óssea e de proteínas inibidoras de macrófagos 1α e 1β , assim como nas concentrações urinárias de hidroiprolina, de deoxipiridinolina e de cálcio têm sido registradas em pacientes com DG. Entretanto, a utilidade clínica desses achados ainda é indeterminada^(113, 114).

Alterações hematológicas comuns na DG, como anemia e trombocitopenia, são causadas pela infiltração de CG no baço, levando ao hiperesplenismo, e pela diminuição da produção de hemácias na medula óssea⁽¹¹⁵⁾. Assim sendo, de forma mais simplificada, os níveis de anemia e de trombocitopenia podem ser usados como parâmetros no acompanhamento de tratamento de pacientes com DG⁽⁹⁰⁾.

Recentemente, tem sido proposto o uso da glucosilesfingosina plasmática como um biomarcador para DG, podendo também refletir os níveis intracelulares de GlcCer acumulados em pacientes com doença em atividade⁽⁹⁰⁾.

2.14 Tratamento da doença de Gaucher

O elevado custo do tratamento para doenças genéticas raras (para DG, cerca de \$200,000/paciente/ano) representa um problema de importância crescente para todos os sistemas de saúde do mundo, especialmente dos países pobres, onde os recursos financeiros devem cobrir despesas com outras doenças mais prevalentes^(116, 117).

No Brasil, o tratamento para DG encontra-se custeado pelo Sistema Único de Saúde (SUS), regulamentado pela Portaria Nº 1.266, de 14 de novembro de 2014, publicada no Diário Oficial da União nº 223, de 18 de novembro de 2014, Seção 1, página 53, que aprovou o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da DG no Brasil⁽¹¹⁸⁾.

A complexidade do quadro clínico, a natureza genética da enfermidade, o envolvimento de familiares no aconselhamento genético e a busca pela identificação

de portadores e afetados exigem o trabalho de uma equipe multidisciplinar para abordagem de pacientes da DG.

Até o início da década de 90, o tratamento da DG se limitava a medidas de suporte terapêutico e ao alívio dos sintomas de dores, desconforto respiratório e alterações hematológicas. Para os casos de esplenomegalias volumosas associadas à trombocitopenia, o tratamento sintomático consistia em esplenectomia total ou parcial. Após a cirurgia da retirada do baço, porém, as dores ósseas continuavam a causar grande sofrimento aos pacientes⁽¹¹⁹⁾.

Outros cuidados de suporte ao paciente incluem: transfusão de sangue e derivados para casos de anemia severa e sangramentos; analgésicos para dores ósseas; cirurgias ortopédicas para aliar dores crônicas e restauração de funções articulares; e bifosfonatos e cálcio para combater a osteoporose⁽⁴³⁾.

As duas principais estratégias de tratamentos específicos para DG consistem na TRE e na TRS. A TRE representa a primeira opção para o tratamento da DG visceral⁽¹²⁰⁾ por ser bem tolerada e apresentar raros e leves efeitos colaterais⁽¹²¹⁾. O tratamento deve ser realizado por toda a vida e não ser interrompido sem uma cuidadosa monitoração da evolução da enfermidade⁽¹²²⁾.

2.14.1 Terapia de Reposição Enzimática (TRE)

No mundo inteiro, a maioria dos pacientes com DG1 em tratamento recebe enzimas exógenas na forma de TRE. As terapias enzimáticas disponíveis incluem: a imiglucerase (aprovada pelo US-FDA, 1994; e pela *European Medicines Agency* - EMA, 1997); a velaglucerase alfa (aprovada pelo US-FDA e EMA, 2010); e a taliglucerase alfa (aprovada para adultos pelo US-FDA, 2012). Todas elas são administradas por via endovenosa, a cada duas semanas, em centros especializados de infusão, clínicas médicas ou, até mesmo, em infusão domiciliar supervisionada⁽¹²³⁻¹²⁷⁾.

A imiglucerase, nome comercial CEREZYME[®], é um análogo da enzima GCCase humana produzida por tecnologia de DNA-recombinante com origem em células de ovários de *hamster* chinês, sendo fabricada pelo laboratório farmacêutico

Genzyme/Sanofi-Aventis. Essa é a droga mais usada comercialmente e, pelo maior tempo de uso, é também a mais avaliada em estudos clínicos^(128, 129).

Até os dias atuais, os estudos demonstram que os pacientes em TRE apresentam melhoras de todos os parâmetros e confirmam que os efeitos da TRE se mantêm após cinco anos⁽¹³⁰⁾. Além disso, a maioria dos parâmetros clínicos se torna normal ou próximo da normalidade no período de oito anos de tratamento⁽¹³¹⁾.

Melhoras significantes na contagem de plaquetas e no nível de hemoglobina após o uso da TRE foram relatadas em vários estudos^(128, 131-134). A redução no volume do baço e do fígado até o sétimo e oitavo ano de tratamento é progressiva, permanecendo estável após esse período^(128, 131-133, 135).

Os estudos têm relatado que a esplenectomia está associada ao aumento no número de eritrócitos e de plaquetas^(128, 130-134), todavia tem sido associada ao risco aumentado de complicações ósseas^(136, 137).

Sabe-se que as manifestações ósseas são as maiores causas de incapacidade física dos pacientes⁽⁹⁷⁾ e a melhora desses sintomas é mais lenta que do que as respostas hematológicas e viscerais⁽¹³⁸⁾. Dados mais recentes apontam que a melhora das manifestações esqueléticas estão relacionadas ao aumento da densidade mineral dos ossos^(96, 131) e à melhora das dores ósseas e das crises ósseas^(130, 139, 140).

Por fim, numa revisão sistemática e meta-análise, encontrou-se que a TRE é muito efetiva em melhorar o envolvimento da medula óssea, mas os efeitos da TRE na Densidade Mineral Óssea (DMO) são muito variáveis e necessitam de novos estudos⁽¹⁴¹⁾.

Recentemente, dois novos medicamentos foram aprovados como TRE para uso comercial: velaglucerase alfa e taliglucerase alfa. A velaglucerase alfa, nome comercial VPRIV[®], fabricado pela *Shire HGT*, Dublin, Ireland, é uma enzima lisossômica hidrolítica glucocerebrosídio-específica, uma forma recombinante da GCCase produzida por tecnologia de ativação de genes numa linhagem celular humana, com uma sequência de aminoácidos idêntica à enzima natural, indicada como TRE prolongada para pacientes da DG1⁽¹⁴²⁾.

A taliglucerase alfa, comercialmente conhecida na América Latina por UPLYSO, é um medicamento biofarmacêutico desenvolvido pelos laboratórios Protalix e Pfizer. A taliglucerase alfa é uma forma recombinante da GCCase, fabricada a partir de plantas (cenoura) e aprovada pelo US-FDA para uso em adultos (2012)⁽¹⁴³⁾ e para uso pediátrico em agosto de 2014⁽¹⁴⁴⁾. No Brasil, a taliglucerase alfa foi aprovada pela Agência de Vigilância Sanitária em março de 2013 e, em 2014, torna pública a decisão de incorporar a taliglucerase alfa para o tratamento da DG no âmbito do SUS⁽¹⁴⁵⁾.

As principais desvantagens da TRE incluem infusões intravenosas regulares, poucos efeitos nas manifestações neurológicas do SNC, por sua inabilidade de atravessar a barreira hematoencefálica, e o alto custo do tratamento⁽¹⁴⁶⁾.

2.14.2 Terapia de Redução do Substrato (TRS)

A TRS se baseia na redução do acúmulo do substrato GlcCer pela inibição da enzima glucosilceramida-sintetase, responsável pelo primeiro passo na síntese da maioria dos glicolipídios, inclusive do GlcCer. O exemplo dessa estratégia de tratamento é o Miglustat, cujo nome comercial é ZAVESCA[®]. Esse medicamento foi aprovado em 2002 para ser fabricado por *Almac Pharma Services Limited, Craigavon, Armagh*, Irlanda do Norte, importado e distribuído por *Actelion Pharmaceuticals do Brasil Ltda.*

Miglustat é indicado para o tratamento oral de pacientes adultos com DG de leve a moderada gravidades para os quais a TRE com imiglucerase não está disponível ou não está indicada, como nos casos de pacientes que apresentaram reações adversas graves à imiglucerase⁽¹²⁹⁾. Devido ao pequeno tamanho de sua molécula, o miglustat pode atravessar a barreira hematoencefálica e tem potencial para tratamento da DG com manifestações neurológicas da DG⁽¹⁴⁷⁾.

Apesar das expectativas positivas para as manifestações ósseas de pacientes tratados com TRS, numa revisão sistemática, observou-se que a TRS não melhorou o envolvimento da medula óssea e, em geral, aumentou apenas os Z-scores da DMO. Contudo, os efeitos da TRS na DMO estão baseados em apenas um estudo, portanto novos estudos são necessários para confirmação desses resultados⁽¹⁴¹⁾.

Eliglustat, a mais recente droga oral aprovada para o tratamento da DG1, é farmacologicamente diferente da TRE que é considerada tratamento padrão para pacientes com DG1. Enquanto a TRE supre a deficiência enzimática com GCCase exógena para metabolizar o substrato GlcCer acumulado, o Eliglustat, um análogo da ceramida, inibe a síntese do substrato GlcCer, reduzindo, portanto, a quantidade de substrato, mantendo o equilíbrio entre a produção e a taxa de degradação do GlcCer⁽¹⁴⁸⁾.

O tratamento prolongado com Eliglustat de pacientes com DG1 não tratados previamente melhorou e manteve os parâmetros hematológicos, volumes dos órgãos, diminuição dos biomarcadores, e parâmetros ósseos⁽¹⁴⁸⁾. O Eliglustat também manteve os parâmetros hematológicos e volume dos órgãos de pacientes adultos com DG1 estabilizados com TRE e poderá ser uma opção terapêutica útil para esses pacientes⁽¹⁴⁹⁾.

Foi proposta a associação da TRE e da TRS como uma alternativa de tratamento dos pacientes com DG3, entretanto a associação das duas formas de terapias não parece alterar o prognóstico final dos pacientes com DG3 com doença neurológica progressiva⁽⁴³⁾.

Outras formas de terapias ainda continuam em estudo e representam esperanças para os pacientes com DG. É o caso da terapia gênica que tenta suprir uma cópia (ou cópias) com objetivo de repor a função perdida do gene⁽¹⁵⁰⁻¹⁵³⁾.

2.15 Doença de Gaucher e patologias correlatas

Estudos epidemiológicos têm revelado elevado risco de predisposição de pacientes com DG para patologias malignas, tais como mieloma múltiplo^(154, 155), carcinoma hepatocelular⁽¹⁵⁵⁾, linfoma não-Hodgkin, melanoma e câncer pancreático⁽¹⁵⁶⁾.

Crianças ou adultos com DG podem ter gamopatia policlonal⁽¹⁵⁷⁾, e o aumento de casos de gamopatias monoclonais também foi relatado em pacientes adultos⁽¹⁵⁸⁾. Pacientes com DG podem apresentar baixa circulação de adiponectina e insulina periférica e elevado gasto de energia mesmo em repouso, possivelmente resultado

dos níveis elevados de citocinas. O aumento do metabolismo não tem relação com a resistência alterada aos hormônios tireoidianos^(159, 160).

Alterações metabólicas na DG1 consistem em propensão para cálculos de colesterol na vesícula biliar, diminuição nos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL-colesterol), lipoproteína de baixa densidade (LDL-colesterol) e do índice de massa corporal (IMC) associados com alterações na secreção de lipídios biliares⁽¹⁶¹⁾. Os baixos níveis de HDL-colesterol em pacientes com DG1, contudo, não levam a um risco aumentado de doença cardiovascular⁽¹⁶²⁾.

Embora tenha sido registrado um aumento na formação de cálculos na vesícula biliar em pacientes com DG1⁽¹⁶³⁾, as relações desse achado com a natureza química dos cálculos, com as alterações metabólicas e com a composição da bile ainda não estão completamente esclarecidas⁽¹⁶¹⁾.

Pacientes com DG também podem apresentar alterações psicológicas, como somatização e depressão, semelhantes às complicações de pacientes de outras doenças crônicas⁽¹⁶⁴⁾.

2.16 Avaliação familiar na doença de Gaucher

É recomendável oferecer exames de avaliação diagnóstica aos familiares assintomáticos para que aqueles, com deficiência da enzima GCase ainda não diagnosticada, possam ser beneficiados com diagnóstico precoce e tratamento da DG, quando indicado. O rastreamento de mutações a partir do diagnóstico enzimático de um “paciente índice” poderá ser importante para o aconselhamento genético por identificar mutações causadoras da doença e detectar indivíduos portadores entre os familiares de alto risco⁽⁴³⁾.

Inicialmente, essa avaliação envolve testes moleculares e enzimáticos dos pais e de outras pessoas com riscos de serem portadores (irmãos dos pais) ou afetados (irmãos do primeiro afetado). Como os pacientes com DG1 podem ser assintomáticos ou sintomáticos ainda não diagnosticados, é importante orientar as famílias de que o teste pode revelar outras pessoas afetadas e não apenas portadoras. Isso pode ser vantajoso em pacientes sintomáticos ainda não diagnosticados, pois se beneficiariam com diagnóstico correto e, talvez, o tratamento

(se necessário e disponível), todavia também pode estigmatizar indivíduos assintomáticos, como sendo “doentes”, embora possam permanecer assintomáticos por toda vida, sem necessidade de tratamento⁽⁹¹⁾.

O rastreamento de mutações entre familiares pode ser feito com base na pesquisa de um número limitado de mutações previamente identificadas. Entretanto, o sequenciamento da região codificadora da GBA poderá ser necessário para diagnosticar mutações que não foram identificadas pelo rastreamento de mutações específicas. Todavia, o sequenciamento pode não identificar alguns tipos de mutações. Nesses casos, é conveniente pesquisar deleções ou duplicações que podem não ser diagnosticadas rotineiramente⁽⁴³⁾.

2.17 Rastreamento populacional para doença de Gaucher

Em geral, um programa de rastreamento populacional seguido por testes confirmatórios é uma poderosa ferramenta de saúde pública para populações de risco. Um bom programa de rastreamento de doenças deve ser de relativo baixo-custo, de fácil realização e comprovação, com resultado rápido, e deve ser capaz de determinar quem, dentro de um grupo de baixo risco, é, de fato, de alto risco para determinada patologia⁽¹⁶⁵⁾.

A existência de tratamento eficaz para DG, com impacto positivo na qualidade de vida do paciente, torna relevante a realização de rastreamento em populações de alto risco, visando diagnosticar casos novos e iniciar o tratamento precocemente, quando for indicado⁽¹⁶⁶⁾. A análise das atividades de GCase e da quitotriosidase em amostras de SSPF, seguida da medida da atividade enzimática em leucócitos para os casos suspeitos, pode ser utilizada na triagem para DG em populações reconhecidamente de risco^(4, 166, 167).

2.18 Aconselhamento genético

O aconselhamento genético pode ser entendido como o processo educacional que fornece informações e orientações aos indivíduos ou familiares sobre a condição genética que pode afetá-los⁽⁵⁾. Uma das metas prioritárias do aconselhamento genético é ajudar indivíduos ou famílias que estão, ou supõem estar, sob risco de

ocorrência ou recorrência de defeitos genéticos a tomar decisões racionais a respeito da procriação.

De acordo com o princípio da autonomia em bioética, o aconselhamento genético não deve ser diretivo e deve proporcionar aos consulentes ampla compreensão de todas as implicações dessas doenças ou riscos genéticos e as opções oferecidas pela medicina atual para sua terapia ou profilaxia. Portanto, a finalidade do aconselhamento genético será alcançada tanto se o casal decidir evitar o nascimento dessa criança quanto, ao contrário, se esse casal permitir o nascimento, desde que o faça com consciência⁽¹⁶⁸⁾.

Considerando que a DG é hereditária, com transmissão autossômica recessiva, a análise de mutações pode ser usada para detectar portadores em populações de alto risco. Devido à elevada prevalência de portadores para DG em certas populações (1:18 em judeus Ashkenazi) e ao fenótipo dos homozigotos N370S/N370S ser muito variável, indivíduos submetidos ao rastreamento para portadores podem ser diagnosticados como afetados homozigotos assintomáticos ou com poucos sintomas. Uma avaliação pré-natal para casais em risco pode ser feita pela medida da atividade enzimática da GCase ou pela análise molecular, se ambas as mutações na família são conhecidas⁽⁴³⁾.

2.19 Consanguindade e efeito fundador

Nos pequenos povoados isolados, a existência de um único indivíduo altamente fecundo, ou com descendentes muito fecundos, pode provocar a predominância de um ou mais genes na população originária de tais isolados, ainda que um desses genes conferisse baixo valor adaptativo a seus portadores. Quando se reconhece a existência desse processo, costuma-se falar em “Efeito Fundador” (EF)⁽¹⁶⁸⁾.

Por conseguinte, EF acontece quando um subgrupo pequeno de uma população grande se estabelece como uma entidade separada e isolada. O conjunto de genes do subgrupo transporta somente uma fração da diversidade genética da população parental, resultando em frequência aumentada de certas doenças no subgrupo, especialmente aquelas conhecidas como doenças autossômicas

recessivas⁽¹⁶⁹⁾. Por isso, o EF tem sido utilizado para explicar o aumento da frequência de doenças mendelianas em muitas populações isoladas^(170, 171).

O EF pode resultar de um evento fundador verdadeiro ou de uma redução brusca no tamanho da população, ou seja, o estabelecimento de uma nova população de indivíduos provenientes de uma população muito maior, ou a partir de uma extrema redução no tamanho da população, um “efeito gargalo” de tamanho. Em ambos os casos, os alelos presentes num exemplar imediatamente após o evento fundador ou afunilamento podem ser encontrados com uma frequência muito mais elevada do que eram anteriormente observados. Os alelos mutantes podem chegar a frequências ainda mais altas por causa da forte deriva genética que pode ter ocorrido enquanto a população ainda era pequena⁽¹⁷¹⁾.

A hipótese de EF tem dois componentes: o alelo é neutro, e todas as cópias são descendentes de uma cópia transmitida de um dos indivíduos fundadores, ou surgiu depois por mutação⁽¹⁷¹⁾. Determinar a descendência de um indivíduo é possível porque o parentesco genético entre duas pessoas pode ser medido por intermédio da probabilidade de eles terem genes idênticos, herdados de um ancestral comum a ambos, independentemente de tais genes condicionarem fenótipos dominantes ou recessivos, normais ou anômalos. Essa medida do parentesco, ou da correlação genética entre dois indivíduos, é denominada “coeficiente de consanguinidade” ou “coeficiente de parentesco”⁽¹⁶⁸⁾.

Assim sendo, o termo consanguinidade pode ser usado para descrever uniões entre casais que sabidamente compartilham genes herdados de um ou mais ancestrais comuns. A forma mais comum de casamento consanguíneo ocorre entre primos de primeiro grau, quando se pode afirmar que eles têm 12,5% de seus genes em comum e, assim, em média, seus descendentes serão homocigotos em 6,25% dos locos gênicos, o equivalente a um coeficiente de consanguinidade de 0,0625⁽¹⁷²⁾. Portanto, o aumento da consanguinidade entre os cônjuges favorece a queda da variabilidade genética em pequenas populações⁽¹⁶⁸⁾.

De um modo geral, um casamento é considerado como consanguíneo quando ele aconteceu entre cônjuges que são primos em segundo grau ou mais

aproximados. Nos casamentos entre primos além do segundo grau, os efeitos da consanguinidade são somente um pouco maior do que a população geral⁽¹⁷²⁾.

Em populações onde o coeficiente de consanguinidade é muito elevado, existe uma probabilidade de um indivíduo ser homozigoto em decorrência do encontro de dois alelos idênticos derivados de gene herdado de um único ancestral. Essa probabilidade pode ser expressa pelo “coeficiente de endocruzamento” que indica a probabilidade de um indivíduo ser autozigoto de um gene qualquer presente em um de seus ancestrais. Desse modo, os filhos de casais consanguíneos podem ser homozigotos por serem autozigotos, mas, evidentemente, eles também podem ser homozigotos sem que tenha ocorrido autozigose, isto é, os genes em homozigose nos filhos de consanguíneos podem ser oriundos de dois ancestrais e não de um único⁽¹⁶⁸⁾.

Relatos históricos de uniões consanguíneas são comuns em comunidades bem estabelecidas. Sob esse aspecto, é muito importante estudar várias gerações, pois o nível acumulativo de endogamia pode ser significativamente mais elevado do que os valores calculados com base em uma única geração⁽¹⁷²⁾.

Quando se estuda padrão de herança de mutações recessivas, enfatiza-se que, entre os indivíduos afetados por elas, a percentagem dos que são filhos de casais consanguíneos pode atingir valores muito altos, porque esses casais possuem maior probabilidade de gerar filhos homozigotos do que os casais não consanguíneos⁽¹⁶⁸⁾. Portanto, sabendo que a transmissão hereditária da DG é autossômica recessiva, podemos inferir que a consanguinidade nos matrimônios pode levar a manifestações fenotípicas de genes da enfermidade em grau muito mais elevado em populações onde a endogamia é mais frequente do que na população geral ao longo de muitas gerações.

Apesar de existirem restrições aos casamentos consanguíneos, mesmo em sociedades primitivas, a existência de endogamia em alta proporção em épocas pregressas é o que melhor serve para explicar o fenômeno da perda de ancestrais. Assim, por exemplo, enquanto os filhos de casais não consanguíneos têm oito bisavós, os filhos de primos em primeiro grau têm seis e os filhos de primos duplos em primeiro grau têm somente quatro bisavós. O fenômeno da perda dos ancestrais

nos leva, pois, a concluir que, do ponto de vista evolutivo, a fraternidade na espécie humana não é um mero conceito espiritual, mas uma realidade genética⁽¹⁶⁸⁾.

Há evidências de que os casamentos consanguíneos não ocorrem aleatoriamente na maioria das populações humanas^(173, 174). No Brasil, por exemplo, constatou-se que o casamento de primos em primeiro grau filhos de pais irmãos é mais frequente do que entre primos filhos de mães irmãs. Esse fato demonstra a influência direta ou indireta dos genitores masculinos no casamento de seus filhos⁽¹⁷⁵⁾.

Na maior parte dos países, entretanto, a tendência atual é a diminuição acelerada das taxas de casamentos consanguíneos, em decorrência do processo de urbanização, com a formação de grandes aglomerados humanos, das conquistas femininas, que tornam a mulher cada vez mais independente, e das facilidades de locomoção e comunicação, que propiciam maior contato entre pessoas de origens diversas. Assim, por exemplo, a Arquidiocese de Florianópolis, que registrava 4,5% de casamentos consanguíneos em 1920, passou a assinalar 1% desses matrimônios em 1980⁽¹⁷⁶⁾.

O EF e o efeito de “vantagem do heterozigoto” têm sido invocados para explicar a elevada prevalência de vários alelos associados a quatro doenças de depósitos de esfingolipídios (de Tay-Sachs, de Gaucher, mucopolidose de tipo IV, e de Niemann-Pick) na população de judeus Ashkenazi. Apesar das incertezas sobre a história demográfica dos judeus Ashkenazi e de seus ancestrais, os dados genéticos disponíveis são consistentes com um EF resultante de um gargalo grave no tamanho da população entre 1100 D.C. e 1400 D.C. e outro gargalo anterior no ano 75 D.C., o início da diáspora judaica⁽¹⁷¹⁾.

3 JUSTIFICATIVAS

TN é uma cidade do Ceará de aproximadamente 28.500 habitantes, situada a 214 km da capital do Estado. Atualmente, a cidade conta com 33% dos pacientes da DG do Ceará e uma prevalência de 1:4000 habitantes. Esse fato motivou a realização do estudo populacional da DG em TN, fundamentada em 3 pilares estratégicos: educação em saúde, rastreamento enzimático em papel de filtro e estudo de genealogia das famílias envolvidas⁽⁴⁾.

Os dados preliminares do rastreamento enzimático realizado entre 2007/2008 indicaram um “grupo de risco” para DG em TN. Contudo, as medidas enzimáticas não foram capazes de distinguir com segurança os indivíduos não-portadores dos portadores, e estes dos afetados, por causa das sobreposições de valores entre essas categorias⁽⁴⁾.

Por conseguinte, o estudo molecular com base no rastreamento de quatro mutações no “grupo de risco” se fez necessário para esclarecer as dúvidas das análises enzimáticas, diagnosticar com precisão os indivíduos portadores e afetados e fornecer informações para o aconselhamento genético. A detecção precoce de alguns tipos de mutações pode ser fundamental para se estabelecer prognóstico, tratamento adequado, prevenindo ou mitigando a presença de manifestações clínicas debilitantes e irreversíveis da DG⁽⁶⁹⁾.

O programa de aconselhamento genético após o diagnóstico molecular é importante para que as pessoas envolvidas possam tomar decisões conscientes sobre a constituição de futuras famílias. O conhecimento da condição de portador eventualmente pode afetar escolhas reprodutivas e determinar as decisões a respeito de exames em outros familiares.

Finalmente, o conhecimento do perfil genético dessa população se torna relevante para se tentar buscar explicações para a elevada prevalência da DG na cidade e para avaliar se esse fato estaria relacionado à vinda dos colonizadores portugueses de origem judaica para a cidade na segunda metade do século XVII.

4 OBJETIVOS

A pesquisa das quatro principais mutações brasileiras da DG em indivíduos do “grupo de risco” e em pacientes de TN representa uma importante etapa complementar ao rastreamento enzimático realizado em 2007/2008 que não foi capaz explicar completamente as causas da elevada prevalência da enfermidade nessa população.

4.1 Objetivo geral

Conhecer e analisar o perfil genético relacionado à DG de indivíduos do “grupo de risco” selecionados pelo rastreamento enzimático e de pacientes de TN, a fim de buscar explicações para elevada prevalência da enfermidade nessa população.

4.2 Objetivos específicos

1. Fazer o rastreamento enzimático das mutações N370S, L444P, G377S e 55del em pacientes e nos indivíduos de risco para DG;
2. Buscar evidências sobre a influência da consanguinidade e de um possível EF de uma mutação da DG em TN;
3. Estudar a genealogia das famílias de pacientes e portadores de mutações da DG em TN;
4. Correlacionar genótipos e fenótipos de pacientes da DG de TN, comparando-os com resultados divulgados na literatura;
5. Disponibilizar para pacientes e demais participantes os resultados dos exames moleculares, para que possam ser utilizados no tratamento dos pacientes e no aconselhamento genético;
6. Esclarecer dúvidas diagnósticas referentes aos resultados enzimáticos das etapas anteriores do rastreamento populacional com base nas análises enzimáticas;
7. Identificar e referenciar os participantes com diagnósticos confirmados de DG para aconselhamento genético, acompanhamento e tratamento da DG, se necessário;

8. Divulgar para a comunidade científica os achados do estudo molecular realizado em TN e colaborar com futuros projetos relacionados à DG e a outras doenças correlatas na cidade;

9. Avaliar a correlação entre os achados moleculares e o fato histórico da vinda de portugueses de origem judaica que fundaram TN na segunda metade do século XVII.

5 METODOLOGIA

Este estudo molecular compreende a terceira etapa do rastreamento populacional para DG realizado em TN. A pesquisa das mutações N370S, L444P, G377S e 55del foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa, do Hospital Geral Dr. César Cals de Oliveira, Fortaleza, e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), em fevereiro de 2009. A coleta das amostras de DNA foi realizada durante o período de 01 de março de 2009 a 31 de dezembro de 2010, na Unidade Básica de Saúde da Família Alcides Monteiro Chaves, situada na Avenida Ziltamir Chaves, s/n, onde funciona o Centro de Referência dos Erros Inatos do Metabolismo (CREIM), de TN.

5.1 Desenho do estudo

A pesquisa é caracterizada como um estudo de caso (estudo de um grupo de pessoas selecionadas) com finalidade exploratória.

O estudo populacional da DG foi estruturado em três eixos estratégicos: educação em saúde, rastreamento populacional para DG e estudo da genealogia das principais famílias envolvidas (APÊNDICE B).

O rastreamento populacional foi realizado em três etapas (Figura 8):

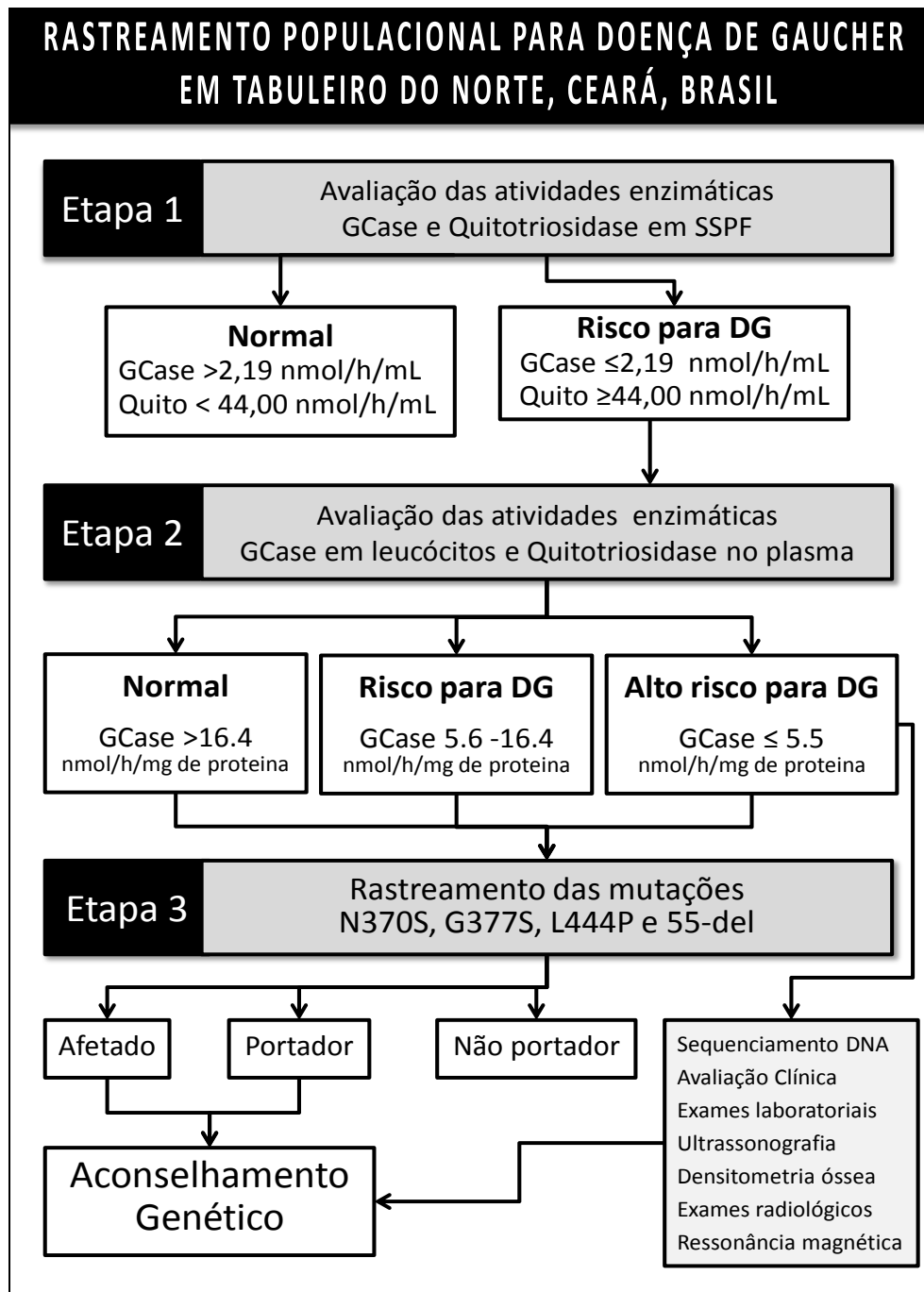
1ª Etapa: Análises das atividades de GCCase e quitotriosidase em SSPF de voluntários da cidade. (APÊNDICE C)⁽⁴⁾.

2ª Etapa: Análises das atividades de GCCase em leucócitos e quitotriosidase do “grupo de risco” selecionado na etapa de papel de filtro⁽⁴⁾.

3ª Etapa: Rastreamento das mutações N370S, L444P, G377S e 55-del em cinco pacientes com DG da cidade e nos indivíduos selecionados com base nas análises enzimáticas.

Os cinco pacientes, filhos de pais descendentes de famílias da cidade, já em tratamento para DG, foram acrescentados para estudo molecular com o objetivo de diagnosticar seus genótipos e compará-los às mutações apresentadas pelos indivíduos selecionados pelo rastreamento enzimático. A identificação dos genótipos

dos pacientes foi necessária, pois, apesar de já estarem em TRE, suas mutações ainda não haviam sido completamente pesquisadas. Sabia-se apenas que um dos pacientes apresentava genótipo G377S/G377S. As informações clínicas dos pacientes foram obtidas por anamnese e exame físico e a pesquisa dos resultados laboratoriais foi também autorizada por eles.



FONTE: Elaborada pelo autor, 2014.

Figura 8 – Desenho do rastreamento populacional para DG em Tabuleiro do Norte

A estratégia de iniciar a pesquisa pelas análises enzimáticas foi adotada por não se conhecer previamente o perfil genético da população, pelo alto custo das análises de DNA em grande escala e por falta de estrutura para pesquisas genéticas na região.

Os critérios de inclusão no estudo molecular são:

- a) ser paciente da DG com descendências materna e paterna em famílias de TN;
- b) ter sido selecionado pelo rastreamento enzimático para DG realizado em na cidade em 2007/2008;
- c) ter assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE D).

Os indivíduos participaram da pesquisa de forma voluntária e sem recompensas financeira ou material. Os parentes em primeiro grau dos atuais pacientes da cidade não participaram do estudo porque já tinham sido avaliados por ocasião do diagnóstico da DG em membros da família.

5.2 Coleta de amostras para estudo molecular

A coleta das amostras para a pesquisa das mutações foi realizada em duas etapas.

1ª Etapa: Rastreamento das mutações G377S, N370S, L444P e 55del cinco pacientes com DG da cidade;

2ª Etapa: Rastreamento das mesmas mutações no grupo formado de 131 indivíduos selecionados pelo rastreamento enzimático em SSPF.

As mutações N370S e L444P foram escolhidas para rastreamento no “grupo de risco” para DG por serem as mais frequentes do Brasil. A mutação G377S foi incluída no estudo por ter sido identificada em homozigose no único paciente da cidade que conhecia seu genótipo. Além disso, a mutação G377S foi encontrada em pacientes de Portugal⁽⁶⁹⁾ de onde vieram os primeiro imigrantes para TN. A mutação 55del foi incluída no rastreamento porque se identificada pode ser motivo de erro no diagnóstico de homozigose para as demais mutações.

Para cada participante foi preenchida uma ficha de identificação com código formado pelas iniciais do nome do paciente seguidas da data de nascimento e sexo. As fichas permanecerão sob a responsabilidade do pesquisador principal até mesmo após término da pesquisa, e cópias delas foram enviadas ao laboratório para análise molecular.

As amostras, acompanhadas de cópias dos Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLEs) e fichas de identificação, foram enviadas pelos Correios para o Laboratório de Genética Molecular do IB-USP. Os resultados das análises moleculares foram enviados diretamente ao pesquisador para serem entregues aos participantes ou aos seus responsáveis legais por ocasião do aconselhamento genético.

O destino das amostras, após a análise molecular, está sob a inteira responsabilidade do Instituto de Biociências-USP, coordenado pela pesquisadora Dra. Lygia da Veiga Pereira.

5.3 Análises moleculares

O estudo molecular, incluindo o rastreamento de quatro mutações e o sequenciamento do DNA, foi incluído no estudo para se conhecer o perfil genético da população, para esclarecer dúvidas diagnósticas das análises enzimáticas e para identificar com precisão os indivíduos portadores e afetados a fim de encaminhá-los ao aconselhamento genético.

5.4 Rastreamento das mutações

A pesquisa das mutações G377S, N370S, L444P e 55-del foi realizada a partir de DNA extraído de material coletado por escovação da mucosa bucal, utilizando-se a técnica descrita por Richards e colaboradores (1993)⁽¹⁷⁷⁾. Foram analisadas amostras de 136 participantes (131 indivíduos selecionados pelo rastreamento enzimático e 5 pacientes da cidade). As mutações foram detectadas através do método de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), que consiste na amplificação do DNA por PCR e digestão dos produtos amplificados com enzimas de restrição⁽⁶⁹⁾.

As regiões do gene que contém as mutações foram amplificadas por PCR, utilizando-se de um termociclador MJ ptc-150 Minicycler ou MJ ptc-200 Peltier Thermal Cyclor (MJ Research). A programação do PCR foi modificada dos trabalhos originais para aumentar a eficiência das reações e dos *primers* utilizados para cada uma das análises realizadas.

Os fragmentos amplificados foram degradados por enzimas de restrição, respectivas para cada mutação que, na presença de mutações, clivarão o DNA, indicando a presença de mutações (Quadro 5). A visualização dos resultados foi realizada a partir da eletroforese em gel de acrilamida 12% com Tampão TBE1x, digestão do produto de PCR com PvuII (10U/amostra – 37°C 16 horas) para as mutações N370S e G377S ou gel de agarose 2% para a mutação L444P, 55del, conforme figura 9.

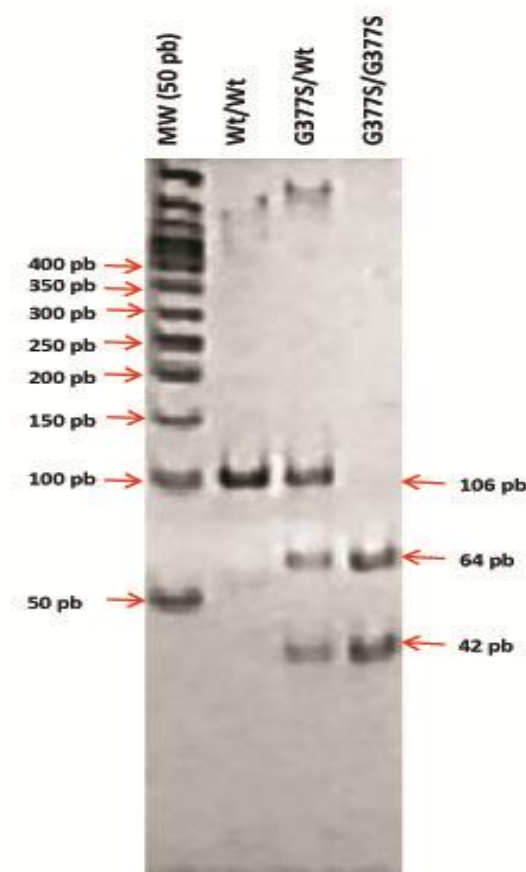


Figura 9 – FONTE: Foto cedida pelo pesquisador Fabiano Tófoli de Araújo, 2015. Resultado de uma análise molecular em PCR e RFLP.

Quando foram detectados homozigotos para a mutação G377S, foi feita a pesquisa da mutação 55del para confirmar sua ausência. Esta deleção de 55pb está localizada numa região que abrange os sítios de anelamento dos *primers* nas estratégias de detecção das mutações N370S, L444P e G377S. A presença de 55del leva a um resultado falso-positivo de homozigose (N370S/N370S, L444P/L444P ou G377S/G377S) para indivíduos heterozigotos (55del/N370S, 55del/G377S ou 55del/L444P) porque o alelo normal não é amplificado no PCR e a banda correspondente não aparece no gel^(66, 69).

Quadro 5 – *Primers* e enzimas de restrições usadas para detecção das mutações da doença de Gaucher rastreadas em população de Tabuleiro do Norte, CE-Brasil

Mutação (sequência do cDNA)	Efeito Fenotípico	Primers F e R	Enzima de restrição
N370S (c.1226A>G)	Leve	F: 5'gccttgccttaccctcg3' R: 5'acgaaagttacgcaccaatt3'	<i>XhoI</i>
G377S (c.1246G>A)	Leve/grave	F: 5'gccttgccttaccctcg3' R: 5'acgaaagttacgcaccaatt3'	<i>AluI</i> ou <i>PvuII</i>
L444P (c.1448T>C)	Grave	F: 5'ctgaaccccgaaggaggac3' R: 5'tgaatggagtagccagggtga3'	<i>NciI</i>
55 del (c.1263_1317del)	Alelo nulo	F: 5'aacctgattccctatcttc3' R: 5'gctcccctcgtggtgtagagt3'	Visualizada diretamente após PCR

FONTE: Adaptado Rozenberg, et al., 2006⁽⁶⁹⁾.

5.5 Sequenciamento de DNA

Para excluir a presença de mutações diferentes das quatro rastreadas, amostras de sangue de quatro indivíduos considerados de “alto risco” para DG, cujas atividades enzimáticas de GCCase em leucócitos eram compatíveis as apresentadas por pacientes com DG (GCCase em leucócitos $\leq 4,0$ nmol/h/mg de proteína), foram encaminhadas para sequenciamento do gene codificador da GCCase. Para isso, foram usadas amostras de sangue em papel de filtro *FTA Classic Card*, fabricado pela Whatman - Whatman, por permitir uma análise eficaz das mutações e pela facilidade de envio de amostras para centros especializados a longas distâncias, conforme descrito por Devost e Choy⁽¹⁷⁸⁾.

5.6 Análise estatística dos dados

Os resultados foram analisados pelo programa IBM SPSS Statistics, Versão 20 (2011), considerando as medidas de distribuição de frequências, medidas de tendência central, de dispersão, valores mínimos e máximos. Para comparar resultados entre duas ou três categoriais, foram utilizados os testes estatísticos não paramétricos de Dwass-Steel-Critchlow-Fligner e Kruskal-Wallis, respectivamente. O nível de significância estatística foi definido para 5% ($p < 0,05$).

5.7 Estudo da genealogia

A reconstituição da genealogia das famílias envolvidas foi realizada a partir de entrevistas realizadas com os participantes da pesquisa e seus familiares. O professor Marcondes Andrade, profundo conhecedor da história da cidade, colaborou com relatos detalhados sobre as famílias do município e sobre a vinda dos primeiros imigrantes para TN. As informações obtidas das entrevistas também foram confirmadas e comparadas com relatos das famílias envolvidas disponíveis em estudos genealógicos de outros autores⁽⁷⁹⁾. Os dados coletados foram inseridos no programa GenoPro®2011, versão 2.5.4.1, Copyright© 1998-2012 para a construção do heredograma.

6 RESULTADOS

A pesquisa das mutações N370S, L444P, G377S e 55del representa a terceira etapa do rastreamento populacional. Os resultados das duas primeiras etapas realizadas com base nas análises enzimáticas serão descritos abaixo para melhor conhecimento do perfil enzimático dos indivíduos selecionados para o estudo molecular.

6.1 Análises enzimáticas

O rastreamento com base nas atividades enzimáticas da GCCase e da quitotriosidase em SSPF foi feito com amostras de 740 indivíduos voluntários (496/67% mulheres), com média de idade de $31,4 \pm 19,2$ anos (variação 2-81 anos). Foram selecionados 135(18,2%) indivíduos com atividade em SSPF de GCCase $\leq 2,19$ nmol/h/mL ou quitotriosidase ≥ 44 nmol/h/mL, considerados “grupo de risco” para DG⁽⁴⁾.

Quatro indivíduos (3%) optaram por não continuar no estudo do rastreamento enzimático. Amostras de sangue dos 131 participantes restantes (86 mulheres; idade média de $34,17 \pm 19,62$ anos; variação 2-77 anos) foram coletadas para análise das atividades enzimáticas da GCCase em leucócitos e da quitotriosidase no plasma, que consistiu na segunda etapa do rastreamento.

As análises das atividades da GCCase em leucócitos e da quitotriosidase no plasma identificaram os indivíduos de maiores riscos para DG em TN, mas não foram capazes de distinguir com segurança os indivíduos afetados dos portadores, e estes dos não-portadores⁽⁴⁾. Por isso, amostras de DNA de todos os 131 participantes foram encaminhadas para estudo molecular (FIGURA 8).

6.2 Análises moleculares

Amostras de DNA dos 131 selecionados pelo rastreamento enzimático e de cinco pacientes da DG foram submetidas ao rastreamento das mutações N370S, L444P, G377S e 55-del.

O rastreamento molecular para as quatro mutações nesse grupo revelou uma única mutação (G377S), permitindo classificar os participantes em três genótipos distintos: não-portadores, portadores e afetados (TABELA 1).

Quatro indivíduos classificados como de “alto risco” para DG (GCase em leucócitos $\leq 4,0$ nmol/h/mg de proteína) foram submetidos ao sequenciamento completo do gene da GBA. O resultado do sequenciamento confirmou que as amostras eram de dois indivíduos portadores (G377S/wt) e de dois não-portadores (wt/wt)⁽⁴⁾.

Tabela 1 – Indivíduos afetados, portadores e não-portadores da mutação G377S distribuídos quanto ao sexo, à idade e às atividades de GCase em leucócitos e de quitotriosidase no plasma - 2014

Variáveis	Tipos de indivíduos por mutações			Total	Valor de p
	Não-portadores	Portadores (G377S/wt)	Afetados (G377S/G377S)		
n (%)	111 (81,6)	20 (14,7)	5 (3,7)	136	
Sexo					
Feminino n(%)	69 (62,2)	14 (70,0)	3 (60,0)	86(63)	0,791
Masculino n(%)	42 (37,8)	6 (30,0)	2 (40,0)	50(37)	
Idade em anos					
Média	35,51	26,70	33,40	34,14	0,242
Desvio padrão	(20,20)	(14,25)	(10,35)	(19,34)	
Mínimo-Máximo	[2-76]	[6 – 48]	[22 – 45]	[2 – 76]	
Intervalo de Confiança 95%	(31,71 – 39,31)	(20,03-33,37)	(20,54-46,26)	(30,86-37,42)	
GCase (nmol/h/mg proteína)					
Média	10,47	6,70	1,92	9,48	<0,001
Desvio padrão	(3,01)	(2,03)	(1,78)	(3,48)	
Mínimo-Máximo	[4,00 - 20,00]	[2,60-10,00]	[0,13-4,80]	[0,13-20,00]	
Intervalo de Confiança 95%	(9,90-11,40)	(5,74-7,65)	(0,00-4,14)	(9,0110,20)	
Quitotriosidase (nmol/h/mL)					
Média	51,46	51,54	18.129,40	716,10	<0,001
Desvio padrão	(57,42)	(32,64)	(8.714,61)	3.729,00	
Mínimo-Máximo	[0,80381,00]	[0,80144,00]	[9.110-31.543]	[0,8-31.543]	
Intervalo de Confiança 95%	(40,6662,26)	(36,2666,81)	(7.30828.950)	(83,561349)	
Tipo de mutação	wt/wt	G377S/wt	G377S/G377S	-	-

FONTE: Elaborada pelo autor (2014).

NOTA:

⁽¹⁾ comparações envolvendo as três categorias simultaneamente foram realizadas pelo teste estatístico de Kruskal Wallis.

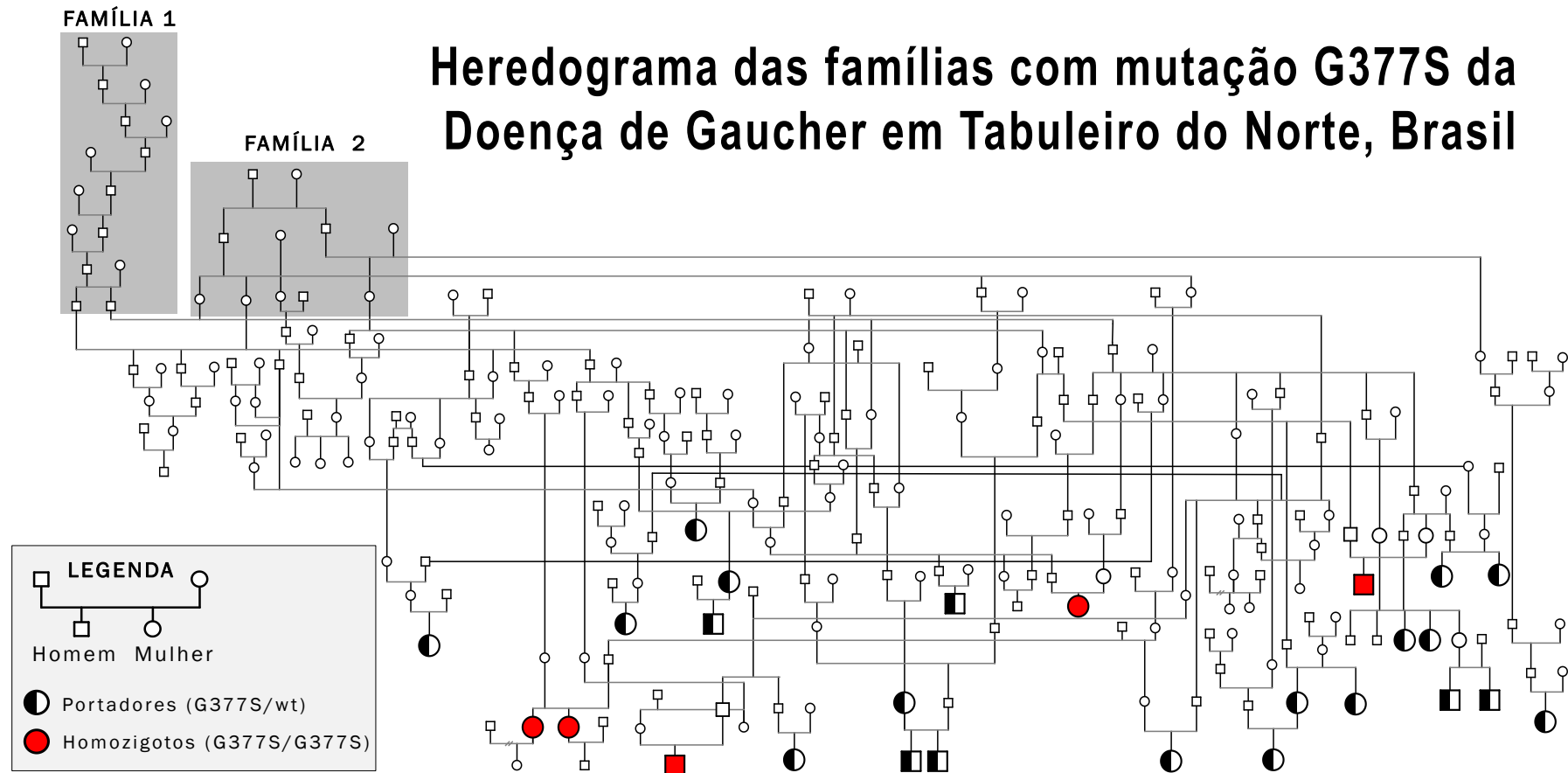
⁽²⁾ comparações de duas categorias entre si foram realizadas pelo teste estatístico não paramétrico de Dwass-Steel-Chritclow-Fligner.

6.3 Estudo da genealogia

O estudo da genealogia incluiu 12 gerações de famílias, 583 indivíduos (52,6% mulheres) e 181 famílias de TN que estabeleceram 778 laços familiares, durante aproximadamente 300 anos. A figura 10 apresenta o heredograma das famílias envolvidas criado a partir das entrevistas com participantes, familiares e com o professor Marcondes Andrade, um historiador local.

Entre os 136 indivíduos pesquisados, há 66 pessoas com sobrenomes diferentes, sendo 50% deles pertencentes a apenas oito famílias diferentes. Os vinte indivíduos portadores identificados pelo estudo molecular apresentam apenas 21 sobrenomes diferentes. Quase metade dos participantes (47%) têm pelo menos um sobrenome em comum, e 40% deles relataram que seus pais são primos em primeiro grau.

Os cinco indivíduos afetados pertencem a quatro famílias que descendem de ancestrais comuns. Duas pacientes são irmãs e todos eles são primos entre si, sugerindo uma forte relação de consanguinidade entre eles.



FONTE: Elaborada pelo autor, 2014.

Figura 10 – Heredograma das famílias de pacientes da DG e portadores da mutação G377S em Tabuleiro do Norte-CE

7 DISCUSSÃO

A mutação G377S é a quarta mutação mais prevalente da DG na Espanha (n=25; 3,0%), a terceira mais frequente em Portugal (n=4; 7,4%) e no Brasil (n=11; 2,2%)^(57, 69, 180). Em TN, a mutação G377S foi a única mutação identificada entre os indivíduos portadores e os afetados.

No início, a mutação G377S foi considerada neuroprotetora, com base no efeito leve da mutação, na elevada atividade enzimática residual e no fato de que todos os pacientes portugueses homocigotos para G377S apresentarem DG1⁽¹⁸¹⁾. Entretanto, a mutação G377S foi encontrada em pacientes com DG3, no Brasil e na Península Ibérica^(57, 69). Nesse estudo, todos os pacientes apresentam DG1 e nenhum deles apresentam manifestações neurológicas.

Embora tenham sido identificados pacientes de DG1 homocigotos (G377S/G377S) com estenose severa e fibrose de válvula aórtica na Croácia⁽⁵⁷⁾, nenhum dos pacientes desse estudo apresenta sintomas cardiovasculares. Esse fato sugere que os pacientes com o mesmo genótipo podem ter diferentes fenótipos e enfatiza a influência de outros fatores genéticos e/ou ambientais nas manifestações clínicas da DG^(57, 182).

Com base na identificação da mutação G377S nas amostras analisadas, os indivíduos foram classificados em três categoriais de genótipos: afetados (G377S/G377S), portadores (G377S/wt) e não-portadores. Não houve diferença significativa de média de idade ($p=0,242$) e nem de gênero entre as três categorias ($p=0,791$), (Tabela 1).

Com relação às atividade enzimáticas, nesse estudo, os portadores (G377S/wt) produziram, em média, 56,72% da atividade de GCase em leucócitos dos indivíduos não-portadores, enquanto os indivíduos afetados (G377S/G377S) produziram, em média, 18,3% da atividade de GCase em leucócitos dos sujeitos não-portadores. Embora tenham sido encontradas diferenças significativas nas médias de atividades enzimáticas de GCase em leucócitos entre as três categorias ($p<0,001$), os testes enzimáticos não foram capazes de distinguir com segurança os portadores dos indivíduos não-portadores⁽⁴⁾.

A medida da atividade enzimática da quitotriosidase está aumentada na maioria dos pacientes com DG, sendo, portanto, ótima ferramenta para o diagnóstico e monitorização do tratamento dos pacientes com DG⁽¹⁰³⁾. No presente estudo, os afetados apresentaram atividade média de quitotriosidase maior do que os portadores ($p=0,002$) e cerca de 350 vezes maior do que a atividade média de quitotriosidase dos sujeitos não-portadores ($p<0,001$). Entretanto, não houve diferença significativa de atividade enzimática de quitotriosidase no plasma entre os indivíduos não-portadores e os portadores ($p=0,34$).

Em relação à consanguinidade matrimonial, observa-se que em populações muito pequenas, os casamentos consanguíneos podem ocorrer não porque sejam preferenciais, mas porque o tamanho reduzido da população aumenta a probabilidade de parentesco consanguíneo próximo entre os cônjuges⁽¹⁶⁸⁾. É provável que esse fato tenha contribuído para o elevado grau de consanguinidade matrimonial em TN, pois entre os 136 indivíduos pesquisados, há somente 66 sobrenomes diferentes e a metade dos participantes pertence a apenas oito famílias distintas.

A constatação da consanguinidade nessa população é ainda maior quando analisamos os vinte indivíduos portadores e os cinco afetados. Cerca de 40% dos indivíduos portadores relataram que seus pais são primos em primeiro grau. Entre os portadores há apenas 21 sobrenomes diferentes, e quase a metade deles (47%) tem pelo menos um sobrenome em comum. Entre os afetados, os laços de consanguinidade também são muito intensos. Duas pacientes são irmãs e todos eles são primos entre si.

O estudo da genealogia revelou ainda que a endogamia se tornou muito comum ao longo do tempo nessa isolada comunidade rural, o que pode ter favorecido o surgimento de homozigotos e portadores da mutação G377S ao longo de várias gerações (FIGURA 10). Segundo os relatos do professor Marcondes Andrade, o mais antigo ancestral identificado por nome nesse estudo nasceu em Cartaxo, Portugal, em 1646 (Família 1). Ele teria vindo para o Brasil em 1690, juntamente com quatro filhos. Dois deles se estabeleceram na região onde surgiu TN e, posteriormente, casaram-se com duas filhas de outro casal de descendentes portugueses (Família 2). Desses dois casamentos entre primos surgiram vários filhos

que, a partir daí, constituíram novas famílias, sendo a consanguinidade nos matrimônios um fato comum nessa população.

Os fatos de os indivíduos afetados e os portadores identificados nesse estudo serem descendentes de imigrantes portugueses provenientes de Cartaxo⁽⁷⁹⁾, e a mutação G377S ter sido observada em homozigose em um paciente português descendente de judeus Sefarditas sugerem que essa mutação poderá ser de origem Sefardita⁽¹⁸⁰⁾, embora a frequência gênica da mutação G377S entre os judeus não seja significativa^(61, 64).

Perfis genéticos incomuns relacionados à DG também foram identificados em outras populações. Dentre eles, destacam-se três grupos étnicos nos quais há uma elevada prevalência de pequeno número de mutações: os judeus Ashkenazi (maior prevalência da DG1 no mundo), os suecos de Norrbotten (com destaque para DG3) e os árabes de Jenin (elevada prevalência da DG3)⁽⁹¹⁾. A identificação de uma única mutação entre os indivíduos portadores e os afetados coloca TN entre as populações com perfis diferenciados da DG.

8 CONCLUSÃO

A identificação de um só tipo de mutação em 20 indivíduos portadores e em cinco afetados descendentes de ancestrais comuns, pertencentes a diferentes gerações, sugere que a elevada prevalência de DG em TN seja resultado da combinação de EF para a mutação G377S e da consanguinidade matrimonial entre as famílias envolvidas.

Os resultados deste estudo reúnem evidências preliminares de que o EF para mutação G377S observado na população de TN pode ser atribuído à descendência portuguesa de algumas famílias do povoado, tendo em vista o contexto histórico da estruturação deste povoado e a ocorrência desse gene recessivo nas famílias atuais.

Novos estudos, entretanto, serão necessários para afirmar se a mutação G377S encontrada nessa população estaria relacionada à origem Serfadita de judeus que migraram de Portugal para TN na segunda metade do século XVII.

Anexo A – Artigo científico produzido com base no estudo molecular.

Fator de Impacto: 3.931. *ISI Journal Citation Reports* © *Ranking*: 2014: 42/167
(*Genetics & Heredity*). Online ISSN: 1399-0004. Qualis B1.

CLINICAL GENETICS An International Journal of Genetics, Molecular and Personalized Medicine

Clin Genet 2014
Printed in Singapore. All rights reserved

© 2014 John Wiley & Sons A/S.
Published by John Wiley & Sons Ltd

CLINICAL GENETICS
doi: 10.1111/cge.12515

Short Report

Consanguinity and founder effect for Gaucher disease mutation G377S in a population from Tabuleiro do Norte, Northeastern Brazil

Chaves R.G., Pereira L.V., Araújo F.T., Rozenberg R., Carvalho M.D.F., Coelho J.C., Michelin-Tirelli K., Chaves M.F., Cavalcanti Jr G.B.
Consanguinity and founder effect for Gaucher disease mutation G377S in a population from Tabuleiro do Norte, Northeastern Brazil.
Clin Genet 2014. © John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd, 2014

Gaucher's disease (GD) is caused by a β -glucocerebrosidase deficiency, leading to the accumulation of glucocerebroside in the reticuloendothelial system. The prevalence of GD in Tabuleiro do Norte (TN) (1:4000) is the highest in Brazil. The purpose of this study was to present evidence of consanguinity and founder effect for the G377S mutation (c.1246G>A) among GD patients in TN based on enzyme, molecular and genealogical studies. Between March 2009 and December 2010, 131 subjects at risk for GD (GC in dried blood ≤ 2.19 nmol/h/ml) and 5 confirmed GD patients from the same community were submitted for molecular analysis to characterize the genetic profile of the population. Based on the enzymatic and molecular analysis, the subjects were classified into three categories: affected ($n = 5$), carrier ($n = 20$) and non-carrier ($n = 111$). All carriers were (G377S/wt). Affected subjects were homozygous (G377S/G377S). The identification of a single mutation in carriers and homozygotes from different generations, the history of the community and the genealogy study suggest that the high prevalence of GD in this population may be due to a combination of consanguinity and founder effect for the G377S mutation.

Conflict of interest

R. G. C. received financial support for the study from Genzyme do Brasil and works as a physician at the Municipal Department of Health. L. V. P. received payment from Genzyme do Brasil to perform molecular analyses. F. T. A. received payment from Genzyme do Brasil to perform molecular analyses. R. R. received payment from Genzyme do Brasil to perform molecular analyses. J. C. C. received payment from Genzyme do Brasil to perform enzyme tests. K. M.-T. received payment from Genzyme do Brasil to perform enzyme tests. G. B. C. J., M. D. F. C. and M. F. C. declare that they have no conflicts of interest.

R.G. Chaves^{a,b}, L. da Veiga Pereira^c, F.T. de Araújo^c, R. Rozenberg^c, M.D.F. Carvalho^d, J.C. Coelho^e, K. Michelin-Tirelli^f, M. de Freitas Chaves^g and G.B. Cavalcanti Jr^h

^aUFRN Postgraduate Program, Natal, Brazil, ^bMunicipal Department of Health, Tabuleiro do Norte, Brazil, ^cDepartment of Genetics and Evolutionary Biology, USP Institute of Biosciences, São Paulo, Brazil, ^dUECE Ceará State University, Fortaleza, Brazil, ^eUFRGS/CBS Department of Biochemistry, Porto Alegre, Brazil, ^fUFRGS/HCPA Medical Genetics Service, Porto Alegre, Brazil, ^gUnichristus School of Medicine, Fortaleza, Brazil, and ^hUFRN/CSS Department of Clinical and Toxicological Analysis, Rio Grande do Sul, Brazil

Key words: consanguinity – founder effect – Gaucher disease – genetic testing – mutation

Corresponding author: Rigoberto Gadelha Chaves, Rua Capitão José Rodrigues 4774, Centro, Tabuleiro do Norte, CEP 62960-000, Ceará, Brazil.
Tel.: +55 88 8809 9197
fax: +55 88 3424 1519
e-mail: rigobertogadelha@hotmail.com

Received 20 August 2014, revised and accepted for publication 29 September 2014

Founder effect is observed when a small subgroup of a larger population establishes itself as a separate and isolated entity (<http://decs.bvsalud.org>).

Gaucher's Disease (GD) is caused by a deficiency of the enzyme β -glucocerebrosidase (GCCase, EC 3.2.1.45), leading to the accumulation of glucocerebroside in tissues, especially in the cells of the reticuloendothelial

system (1). Because the transmission of GD is autosomal recessive, marital consanguinity favors the emergence of phenotypic manifestations of recessive genes over several generations.

Over 300 GD-related mutations have been described. These may be classified into three types (null, severe and mild) according to their phenotypic effect (2).

Chaves et al.

The presence of mutations in both alleles may lead to one of three phenotypical manifestations: type 1 non-neuropathic (MIM 230800), type 2 neuropathic (MIM 230900) and type 3 subacute neuropathic (MIM 231000). The genotype/phenotype correlation is limited owing to many variations in the clinical manifestations of patients with the same genotype (3), although some genotypes are associated with milder symptomatology.

The diagnosis may be established by the detection of Gaucher cells in tissues, by GCCase activity in leukocytes or cultured skin fibroblasts, or by molecular analysis (1, 4, 5). Populations at risk may be screened for GCCase and chitotriosidase activity using dried blood spots on filter paper (DBS-FP) (6, 7).

GD is panethnic but is particularly prevalent among Ashkenazi Jews. In the United States, the estimated incidence is 1:40,000 (8). In Brazil, 566 GD patients had been diagnosed by March 2014 (9).

In Tabuleiro do Norte (TN), a town in Northeastern Brazil with approximately 28,500 inhabitants, the prevalence of GD is 1:4000 (10). The town was founded in the second half of the 17th century by Portuguese settlers of Sephardic Jewish extraction (11). A combination of inbreeding, a common local practice until a few decades ago, and founder effect for the G377S mutation, may explain the high prevalence of GD in this population.

The objective of the study was to present evidence of founder effect for the G377S mutation in a population of GD patients and carriers from TN.

Methods

The molecular study protocol was approved by the National Research Ethics Commission (CONEP) in February 2009. The sampling was done in TN between 1 March 2009 and 31 December 2010.

The population study was based on three strategic pillars: health education, screening for GD and genealogy study of the families involved. Screening was done in three steps (Fig. 1).

- Step 1: Evaluation of GCCase and chitotriosidase activity in DBS-FP collected from residents of TN volunteering for the study (10).
- Step 2: Evaluation of GCCase activity in leukocytes and of chitotriosidase in plasma collected from participants selected in Step 1 (10).
- Step 3: Molecular analysis of participants selected in Step 2 and of five residents with confirmed GD.

The study started with population screening for GCCase activity for three reasons: (i) the genetic profile of the population was unknown prior to the study, (ii) the cost of large-scale DNA analysis was prohibitive and (iii) genetic research facilities were unavailable in the region.

The participants were volunteers residing in TN descended from local traditional families. All participants were required to attend at least one GD-related health education session and to sign an informed consent form. No financial or material compensation was

provided. Having been evaluated previously, relatives in the first degree of patients with confirmed diagnosis of GD were not invited to participate in the screening.

The evaluation of enzyme activity in DBS-FP was performed with the technique developed by Civallero (7). The cutoff values were ≤ 2.19 nmol/h/ml for GCCase activity in leukocytes and ≥ 44.00 nmol/h/ml for chitotriosidase activity in plasma.

Participants below the GCCase cutoff value or above the chitotriosidase cutoff value in the first step of the screening process were referred for evaluation of GCCase activity in leukocytes and chitotriosidase activity in plasma according to standard methods described in the literature (12, 13) and to DNA screening for four common Brazilian mutations.

Screening for G377S, N370S, L444P and 55-del, the most relevant mutations in Brazil (14), was performed on exfoliated buccal mucosa cell DNA, as described in the literature (15).

Patients found to be homozygous for G377S were referred for screening for 55-del in the pseudogene contiguous to the *GBA* gene (*psGBA*). When present, this deletion occurs at the annealing sites of the primers used for detecting N370S, L444P and G377S. If the presence of 55-del is due to a recombination event, a false positive result of homozygosity may occur.

To rule out the presence of mutations other than the four mutations screened for, blood samples of participants with GCCase activity in leukocytes ≤ 4.0 nmol/h/mg protein were submitted for DNA sequencing of the gene region encoding for GCCase.

The statistical analysis was performed with the software IBM SPSS version 20 (2011). The results were expressed as distribution of frequencies, central tendency, dispersion, minimum values and maximum values. Categories were compared pairwise with the Steel–Dwass–Critchlow–Fligner test for non-parametric data. The Kruskal–Wallis test was used to compare three categories simultaneously. The level of statistical significance was set at 5% ($p < 0.05$).

The reconstruction of the genealogy of the involved families was based on interviews with the participants, their relatives and information provided by Prof Marcondes Andrade, a local historian. Using the software GenoPro® 2011 version 2.5.4.1, genograms were built from the collected data.

Results

During Step 1 of the population screening, 740 DBS-FP samples were evaluated for GCCase and chitotriosidase activity. The participants were aged 31.4 ± 19.2 years (range: 2–81) and most were women ($n = 496$; 67%). As participation in this study was voluntary, we found that women were more prone to collaborate. Nearly one fifth ($n = 135$; 18.2%) were found to be at risk for GD (GCCase in DBS-FP ≤ 2.19 nmol/h/ml) (10).

In Step 2, four of the 135 participants at risk declined participation. Thus, 131 participants (86 women) aged 34.17 ± 19.62 years (range: 2–77) were submitted for

Consanguinity and founder effect

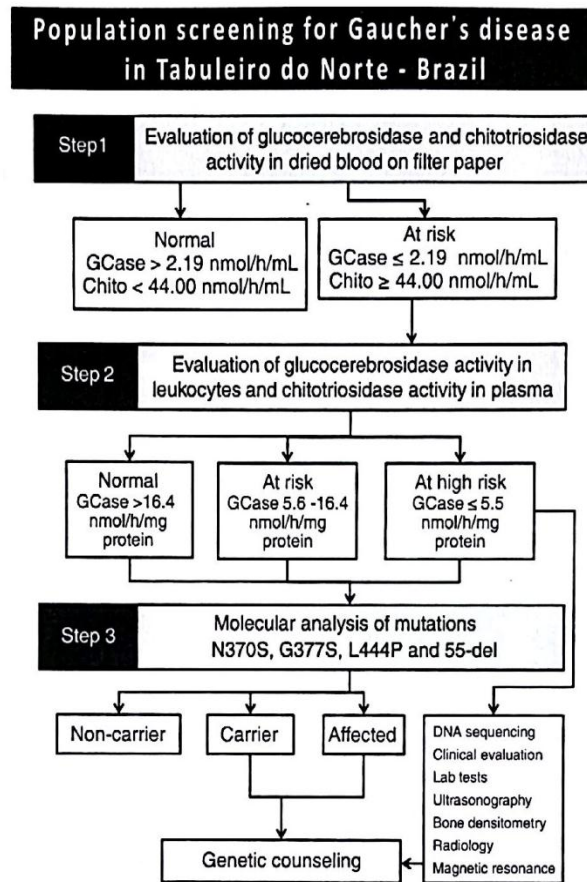


Fig. 1. Design of population screening for Gaucher's disease in Tabuleiro do Norte, Ceará, Brazil, 2009–2010. Source: the authors.

evaluation of GCCase activity in leukocytes, chitotriosidase activity in plasma and screening for the mutations N370S, L444P, G377S and 55-del (10).

A group of five patients with confirmed diagnosis of GD and both parents descended from early settlers of TN was added to the group of 131 participants selected for screening for the mutations N370S, L444P, G377S and 55-del in order to compare their genotypes to the mutations identified in the 131 selected participants in Step 1. The five patients were diagnosed between 1977 and 2007 based on GCCase levels in leukocytes and clinical symptoms only.

Screening for the four most common mutations in Brazil resulted in the identification of G377S only, making it possible to classify the participants in three categories according to genotype: non-carriers ($n = 111$; 81.6%), carriers ($n = 20$; 14.7%) and affected ($n = 5$; 3.7%) (Table 1).

The DNA sequencing based on DBS-FP of the four participants with GCCase in leukocytes ≤ 4.0 nmol/h/mg protein confirmed the diagnosis of two carrier subjects (G377S/wt) and two non-carriers (wt/wt) (10).

Our genealogy study included 12 family generations and 583 subjects (52.6% women) from 181 nuclear families in TN who established 778 pedigree links

during a period of over 300 years. The earliest ancestor identified by name was born in Cartaxo, Portugal, in 1646 (Family 1) and migrated to Brazil in 1690 along with four children. Two of these settled in what was to become TN and married the two daughters of a couple of Portuguese descendants (Family 2). Inbreeding became commonplace over time in the isolated rural community of TN, favoring the emergence of homozygotes and carriers of the mutation G377S (Fig. 2).

Our data provide evidence of significant levels of inbreeding. Thus, although 66 different surnames were registered among the 136 individuals in the final sample, 50% belong to only 8 families. The 20 carriers have 21 different surnames, but 47% have at least one surname in common. Forty percent of the carriers reported that their parents were cousins in the first degree.

The five affected subjects belong to four families descended from common ancestors. Two are sisters, and all are cousins of the second or third degree, suggesting a strong pattern of consanguinity.

Discussion

The G377S mutation is the fourth most prevalent GD-related mutation in Spain ($n = 25$; 3.0%) (2) and

Chaves et al.

Table 1. Affected subjects, carriers and non-carriers of mutations for Gaucher's disease according to gender, age and enzyme activity (GCCase activity in leukocytes and chitotriosidase activity in plasma)^a

Variables	Subjects according to genetic status			Total	p-value
	Non-carrier	Carrier G377S/wt	Affected G377S/G377S		
<i>n</i> (%)	111 (81.6)	20 (14.7)	5 (3.7)	136 (100)	
Gender					
Female <i>n</i> (%)	69 (62.2)	14 (70.0)	3 (60.0)	86 (63)	0.791
Male <i>n</i> (%)	42 (37.8)	6 (30.0)	2 (40.0)	50 (37)	
Age (years)					
Average	35.51	26.70	33.40	34.14	0.242
Standard deviation	20.20	14.25	10.35	19.34	
Minimum–maximum	2–76	6–48	22–45	2–76	
Confidence interval (95%)	31.71–39.31	20.03–33.37	20.54–46.26	30.86–37.42	
GCCase (nmol/h/mg protein)					
Average	10.47	6.70	1.92	9.48	<0.001
Standard deviation	3.01	2.03	1.78	3.48	
Minimum–maximum	4.00–20.00	2.60–10.00	0.13–4.80	0.13–20.00	
Confidence interval (95%)	9.90–11.40	5.74–7.65	0.00–4.14	9.01–10.20	
Chitotriosidase (nmol/h/ml)					
Average	51.46	51.54	18,129.40	716.10	<0.001
Standard deviation	57.42	32.64	8714.61	3729.00	
Minimum–maximum	0.80–381.00	0.80–144.00	9110–31,543	0.8–31,543	
Confidence interval (95%)	40.66–62.26	36.26–66.81	7308–28,950	83.56–1349	
Type of mutation	wt/wt	G377S/wt	G377S/ G377S	-	-

GCCase, β -glucocerebrosidase.

^aComparisons involving three categories simultaneously were done with the Kruskal–Wallis test. Pairwise comparisons of categories were done with the Dwass–Steel–Critchlow–Fligner test for non-parametric data.

Source: The authors, 2010.

the third most prevalent in both Portugal ($n=4$; 7.4%) (16) and Brazil ($n=11$; 2.2%) (14). Initially, it was believed to be neuroprotective owing to its mild effect, high residual enzyme activity and the fact that all known Portuguese homozygotes for G377S have type 1 GD (17). However, the G377S mutation has been observed in patients with type 3 GD in both Brazil and the Iberian Peninsula (2, 14).

Although cardiac valvulopathies have been observed in a homozygous patient from Croatia, all our subjects had type 1 GD and no cardiovascular symptoms. This suggests that individuals with the same genotype may have different phenotypes and highlights the influence of other genetic and/or environmental factors on the clinical manifestations of GD (2, 18).

The fact that the carriers and affected subjects identified in this study are descendants of Jewish immigrants from Cartaxo, Portugal (11), and that the mutation G377S has been observed in homozygosis in one Portuguese Sephardic Jewish patient suggests that the G377S mutation may be Sephardic in origin (16), although the gene frequency of this mutation is not significant among Jewish subjects (3, 19).

Genotype/biochemical phenotype correlations

The participants were classified into three genotype categories: affected, carriers and non-carriers. The

categories did not differ significantly with regard to average age ($p=0.242$) or gender ($p=0.791$) (Table 1).

In our sample, carriers and affected subjects displayed 56.72% ($p<0.001$) and 18.3%, respectively, of the average GCCase activity in leukocytes of non-carriers. However, despite the significant differences in average GCCase activity in leukocytes between the three categories ($p<0.001$), the enzyme tests were unable to distinguish carriers reliably from non-carriers.

Chitotriosidase activity in plasma is usually above normal in GD. This makes the chitotriosidase test a useful tool in the diagnosis and follow-up of GD patients (12). In this study, average chitotriosidase activity levels were significantly higher in affected subjects than in carriers ($p=0.002$) and approximately 350 times higher in affected subjects than in non-carriers ($p<0.001$). However, carriers and non-carriers did not differ significantly ($p=0.34$).

We believe that the observed founder effect for the G377S mutation may be attributed to the Portuguese ancestors of the early settlers of TN. However, it remains to be determined whether the presence of G377S in this population is related to the Sephardic Jewish origin of these ancestors.

In conclusion, the identification of a single mutation (G377S) in 20 carriers and five affected subjects, belonging to different generations but descending from common ancestors, suggests that the high prevalence of GD

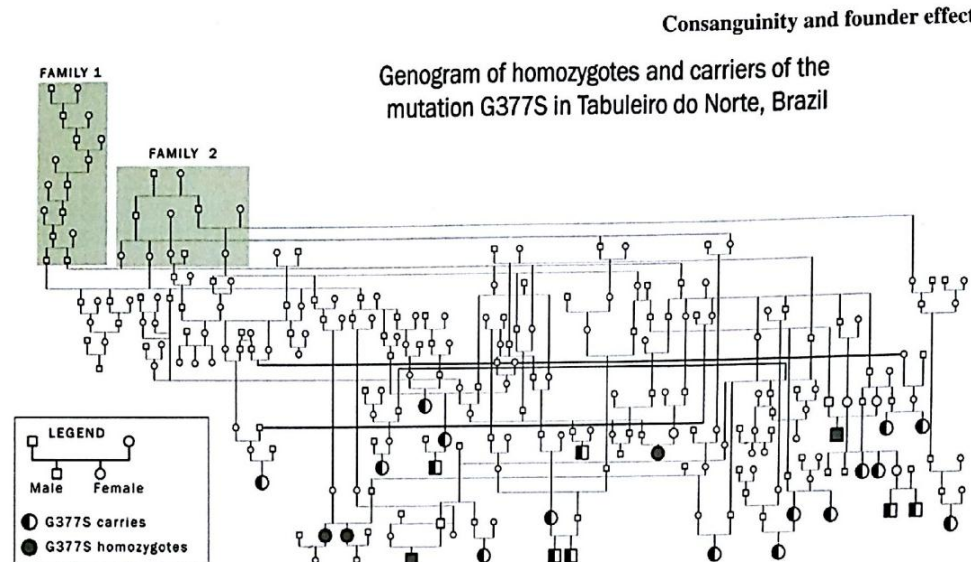


Fig. 2. Genogram of homozygotes and carriers of the mutation G377S in Tabuleiro do Norte. Source: the authors.

in TN is due to a combination of founder effect for the G377S mutation and consanguinity.

Acknowledgements

The authors would like to thank Genzyme do Brasil for financial support. Also thanks to Dr Elisa Sobreira for academic support and to Mr João Márcio da Silva (head of the Municipal Health Department) and the health care workers of the local facility for their valuable cooperation. We are grateful to Dr Rômulo Maurício for preparing blood samples for enzyme analyses and to Tibelle Freitas Maurício (nurse) for her contribution to the health education sessions. Finally, our thanks to Edineide Chaves (social worker) and to Prof Marcondes Andrade for helping draw the family trees of the involved families.

References

- Beutler E, Grabowski GA. Gaucher disease. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited diseases*, 8th edn. New York, NY: McGraw-Hill, 2001: 3635–3668.
- Giraldo P, Alfonso P, Irun P et al. Mapping the genetic and clinical characteristics of Gaucher disease in the Iberian Peninsula. *Orphanet J Rare Dis* 2012; 7: 17.
- 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.
- Beutler E, Saven A. Misuse of marrow examination in the diagnosis of Gaucher disease. *Blood* 1990; 76 (3): 646–648.
- Charrow J, Esplin JA, Gribble TJ et al. Gaucher disease: recommendations on diagnosis, evaluation, and monitoring. *Arch Intern Med* 1998; 158 (16): 1754–1760.
- Chamoles NA, Blanco M, Gaggioli D, Casentini C. Gaucher and Niemann-Pick diseases—enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper: retrospective diagnoses in newborn-screening cards. *Clin Chim Acta* 2002; 317 (1-2): 191–197.
- Civallero G, Michelin-Tirelli K, de Mari J et al. Twelve different enzyme assays on dried-blood filter paper samples for detection of patients with selected inherited lysosomal storage diseases. *Clin Chim Acta* 2006; 372 (1-2): 98–102.
- Grabowski GA. Gaucher disease: lessons from a decade of therapy. *J Pediatr* 2004; 144 (Suppl. 5): S15–S19.
- International Collaborative Gaucher Group Gaucher Registry (2014). Population Report: Latin America compared to Rest of World. International Collaborative Gaucher Group: 35.
- Chaves RG, Coelho JC, Michelin-Tirelli K et al. Successful screening for Gaucher disease in a high-prevalence population in Tabuleiro do Norte (Northeastern Brazil): a cross-sectional study. *JIMD Rep* 2011; 1: 73–78. DOI: 10.1007/8904_2011_19.
- Vieira VMG (2000). Os Gadelhas no Mundo. Retrieved July 13, 2009, from <http://www.gentree.org.br/artigos/gadetha.htm>
- Hollak CE, van Weely S, van Oers MH, Aerts JM. Marked elevation of plasma chitrosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease. *J Clin Invest* 1994; 93 (3): 1288–1292.
- Peters SP, Coyle P, Glew RH. Differentiation of beta-glucocerebrosidase from beta-glucosidase in human tissues using sodium taurocholate. *Arch Biochem Biophys* 1976; 175 (2): 569–582.
- Rozenberg R, Araujo FT, Fox DC et al. High frequency of mutation G377S in Brazilian type 3 Gaucher disease patients. *Braz J Med Biol Res* 2006; 39 (9): 1171–1179.
- Richards B, Skoletsky J, Shuber AP et al. Multiplex PCR amplification from the CFTR gene using DNA prepared from buccal brushes/swabs. *Hum Mol Genet* 1993; 2 (2): 159–163.
- Amaral O, Marcao A, Sa Miranda M, Desnick RJ, Grace ME. Gaucher disease: expression and characterization of mild and severe acid beta-glucosidase mutations in Portuguese type 1 patients. *Eur J Hum Genet* 2000; 8 (2): 95–102.
- Amaral O, Lacerda L, Marcao A, Pinto E, Tamagnini G, Sa Miranda MC. Homozygosity for two mild glucocerebrosidase mutations of probable Iberian origin. *Clin Genet* 1999; 56 (1): 100–102.
- Peric Z, Kardum-Skelin I, Puskaric BJ, Letilovic T, Vrhovac R, Jaksic B. An unusual presentation of Gaucher's disease: aortic valve fibrosis in a patient homozygous for a rare G377S mutation. *Coll Antropol* 2010; 34 (1): 275–278.
- Koprivica V, Stone DL, Park JK et al. Analysis and classification of 304 mutant alleles in patients with type 1 and type 3 Gaucher disease. *Am J Hum Genet* 2000; 66 (6): 1777–1786.

Anexo B – Certificado da apresentação de pôster no evento “European Human Genetics Conference” – Glasgow, Escócia, junho de 2015.



CONFIRMATION OF POSTER PRESENTATION

This is to certify that the following poster was presented at the

European Human Genetics Conference 2015

Glasgow, Scotland, UK, June 6 – 9

„Consanguinity and founder effect for Gaucher disease mutation G377S in a population from Tabuleiro do Norte, Northeastern Brazil“

(Presentation number: PM18.34)

R. G. Chaves^{1,2}, L. V. Peireira³, F. T. Araújo³, R. Rozenberg³, J. C. Coelho⁴, K. Michelin-Tirelli⁵, M. D. F. Carvalho⁶, M. F. Chaves⁷, G. B. Cavalcanti Jr.⁸;
 1UFRN Postgraduate Program, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil, Natal, Brazil, 2Municipal Department of Health., Tabuleiro do Norte, Brazil, 3USP Institute of Biosciences, Department of Genetics and Evolutionary Biology, São Paulo, Brazil, São Paulo, Brazil, 4UFRGS/ICBS Department of Biochemistry, Porto Alegre, Brazil, 5UFRGS/HCPA Medical Genetics Service., Porto Alegre, Brazil, 6UECE Ceará State University., Fortaleza, Brazil, 7Unichristus School of Medicine, Fortaleza, Brazil, 8UFRN/CCS Department of Clinical and Toxicological Analysis, Natal, Brazil.

For the congress office:

ESHG 2015 c/o, Vienna Medical Academy
 Alser Strasse 4, A - 1090 Vienna

Anexo C – Certificado da participação no 2nd Latin American Gaucher Disease Round Table, Rio de Janeiro, maio de 2015.




Anexo D – Certificado do prêmio pela apresentação do pôster “Consanguinity and Founder Effect for Gaucher disease mutation G3777S in a population from Tabuleiro do Norte, Northeastern - Brazil” – 2nd Latin American Gaucher Disease Round Table, Rio de Janeiro, maio de 2015.



Anexo E – Pôster premiado no 2nd Latin American Gaucher Disease Round

Table – Rio de Janeiro, maio de 2015.



CONSANGUINITY AND FOUNDER EFFECT FOR GAUCHER DISEASE MUTATION G377S IN A POPULATION FROM TABULEIRO DO NORTE, NORTHEASTERN BRAZIL

AUTHORS: Rigoberto Gadelha Chaves^{1,2}, Lygia Veiga Pereira³, Fabiano Tófoli³, Roberto Rosenberg³, Maria Denise Fernandes Carvalho^{4,7}, Janice Carneiro Coelho⁵, Kristiane Michellin-Tirelli⁶, Marília de Freitas Chaves⁶ and Geraldo Barroso Cavalcante Junior⁶

INSTITUTIONS: (1) Programa de Pós-graduação da UFRN – Natal – RN; (2) Secretaria Municipal de Saúde – Tabuleiro do Norte – CE; (3) Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo – São Paulo – SP; (4) Universidade Estadual do Ceará – Fortaleza – CE (5) Departamento de Bioquímica da ICBs – UFRGS – Porto Alegre – RS; (6) Serviço de Genética Médica do HCPA – UFRGS – Porto Alegre – RS; (7) Faculdade de Medicina da Unichristus – Fortaleza – CE; (8) Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas – CCS – UFRN

EPIDEMIOLOGY: TABULEIRO DO NORTE


The highest prevalence of Gaucher's disease in Brazil (1: 4,000)



THE HIGHEST PREVALENCE OF GAUCHER DISEASE IN BRAZIL

The high prevalence of GD in Tabuleiro do Norte is believed to be the result of:


- low migration rates
- multi-generational endogamy
- possibly the influence of Jewish settlers arriving in Northeastern Brazil from Portugal in the second half of the seventeenth century.



POPULATION SCREENING

The three steps:

1. Analysis of enzyme activity on dried blood spots on filter paper
2. Analysis of enzyme activity in leukocytes
3. Molecular analysis



POPULATION STUDY FOR GAUCHER DISEASE IN TABULEIRO DO NORTE, BRAZIL

STRATEGIES

Health education paved the way for the community screening.

Community screening paved the way for the epidemiologic study.

ACTIONS

Health education for officials and community leaders

Health education for health professionals

Health education sessions at schools and at CHC

Treatment and follow-up

Clinical evaluation and additional

INTRODUCTION: Gaucher's Disease (GD) is caused by a β -glucocerebrosidase (GCase) deficiency leading to the accumulation of glucocerebroside in the reticuloendothelial system. The prevalence of GD in Tabuleiro do Norte (TN) (1:4,000) is the highest in Brazil.

OBJECTIVE: The purpose of this study was to present evidence of consanguinity and founder effect for the G377S mutation (c.1246G>A) among GD patients in TN based on enzyme, molecular and genealogical studies.

METHOD: Between March 2009 and December 2010, 131 subjects at risk for GD (GC in dried blood ≤ 2.19 nmol/h/mL) and 5 confirmed GD patients from the same community were submitted to molecular analysis to characterize the genetic profile of the population.

RESULTS: Based on the enzymatic and molecular analysis, the subjects were classified into 3 categories: affected (n=5), carrier (n=20), and non-carrier (n=111). All carriers were (G377S/wt). Affected subjects were homozygous (G377S/G377S).


CONCLUSIONS: The identification of a single type of mutation in carriers and homozygotes from different generations, the history of the community and the genealogy study suggest that the high prevalence of GD in this population may be due to a combination of consanguinity and founder effect for the G377S mutation.

We believe the observed founder effect may be attributed to the Portuguese ancestors of the early settlers of Tabuleiro do Norte. However, it remains to be determined whether the presence of G377S in this population is related to the Jewish origin of these ancestors.

Finally, it is hoped the unusual genetic profile of the population of Tabuleiro do Norte will draw the attention of researchers interested in the study of disorders related to G377S or associated with high levels of consanguinity.


SCREENING FOR 4 MUTATIONS

- Screening was done for the most prevalent mutations in Brazil: G377S, N376S, L444P and S39W (Rosenberg, Anelli et al, 2008)
- We used the restriction fragment length polymorphism (RFLP) technique
- The gene regions containing mutations were amplified by PCR



INCLUSION CRITERIA

- Being a resident of TN and descending from original families in TN
- Identified risk for GD (G377S in dried blood ≤ 2.19 nmol/h/mL)
- GD patients residing in Tabuleiro do Norte
- Attendance of health education sessions
- Signing of informed consent form



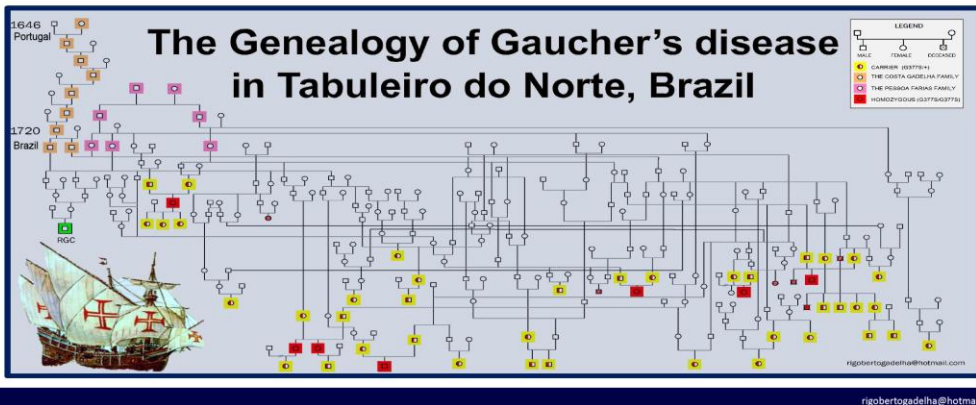
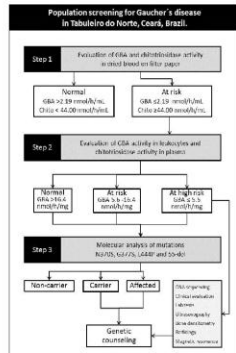
GENEALOGICAL EVIDENCE OF FOUNDER EFFECT

- 12 family generations
- 583 subjects from 181 families
- 778 family links
- During over 300 years
- The earliest ancestor is from Castelo (Portugal)
- Migrated to Brazil in 1600




RESULTS OF SCREENING FOR 4 MUTATIONS

Variables	Subjects according to genetic status			Total	p-value
	Non-carrier	Carrier G377S+	Affected G377S/G377S		
n (%)	111 (81.6)	20 (14.7)	5 (3.7)	136 (100)	
Gender					
Female n (%)	69 (62.2)	14 (70.0)	3 (60.0)	86 (63)	
Male n (%)	42 (37.8)	6 (30.0)	2 (40.0)	50 (37)	0.791
Age (years)					
Average (Standard deviation)	35.51 (20.20)	26.70 (14.25)	33.40 (19.35)	34.14 (19.34)	
[Minimum-Maximum]	[2-76]	[4-81]	[12-85]	[2-76]	
C3 95%	(37.71-39.31)	(20.03-33.37)	(28.54-46.26)	(30.66-37.62)	0.242



Anexo F – Pôster apresentado e premiado no 11nd The European Working Group on Gaucher Disease – 11nd EWGGD, Haifa, Israel, junho de 2014.




GAUCHER'S DISEASE: EVIDENCE OF FOUNDER EFFECT IN A POPULATION FROM TABULEIRO DO NORTE, BRAZIL

AUTHORS: **Rigoberto Gadelha Chaves**^{1,2}, Lygia Veiga Pereira³, Fabiano Tófoli³, Roberto Rosemberg³, Maria Denise Fernandes Carvalho⁴, Janice Carneiro Coelho⁵, Kristiane Michellin-Tirelli⁶, Marília de Freitas Chaves⁷ and Geraldo Barroso Cavalcante Junior⁸

INSTITUTIONS: (1) Programa de Pós-graduação da UFRN – Natal – RN; (2) Secretaria Municipal de Saúde – Tabuleiro do Norte – CE (3) Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo – São Paulo – SP; (4) Universidade Estadual do Ceará – Fortaleza – CE (5) Departamento de Bioquímica da ICBS – UFRGS – Porto Alegre – RS; (6) Serviço de Genética Médica do HCPA – UFRGS – Porto Alegre – RS; (7) Faculdade de Medicina da Unidetrás – Fortaleza – CE; (8) Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas – CCS – UFRN

EPIDEMIOLOGY: TABULEIRO DO NORTE

The highest prevalence of Gaucher's disease in Brazil (1: 4,000)



THE HIGHEST PREVALENCE OF GAUCHER DISEASE IN BRAZIL


The high prevalence of GD in Tabuleiro do Norte is believed to be the result of:

- low migration rates
- multi-generational endogamy
- possibly the influence of Jewish settlers arriving in Northeast Brazil from Portugal in the second half of the seventeenth century.

POPULATION SCREENING

The three steps:

1. Analysis of enzyme activity on dried blood spots on filter paper
2. Analysis of enzyme activity in leukocytes
3. Molecular analysis



INTRODUCTION: High incidences of Mendelian diseases in isolated populations have been explained by the concept of "founder effect". Gaucher's Disease (GD) is caused by a β -glucocerebrosidase (GBA) deficiency leading to the accumulation of glucocerebroside in the reticuloendothelial system. Molecular analysis can predict the GD phenotype and is essential in genetic counseling. The prevalence of GD in Tabuleiro do Norte (1:4.000) is the highest in Brazil. The purpose of this study was to present evidence of a founder effect for GD in Tabuleiro do Norte based on enzyme and molecular analysis, and a genealogical survey.

METHODS: Between March 2009 and December 2010, 131 subjects at risk for GD (GBA in dried blood ≤ 2.19 nmol/h/mL) were submitted to analysis of GBA in leukocytes and molecular analysis. In addition, 5 confirmed GD patients from the same community were submitted to molecular analysis to characterize the genetic profile of the population.

RESULTS: Based on the enzymatic and molecular analysis, the subjects were classified into 3 categories: affected (n=5), carrier (n=20), and non-carrier (n=111). All carriers were G377S/+ and affected subjects were homozygous (G377S/G377S). The groups differed significantly with regard to enzyme activity: affected subjects displayed the lowest levels of GBA activity and the highest levels of chitotriosidase activity.

CONCLUSION: The identification of a single type of mutation (G377S) in the entire sample (carriers and homozygotes from different families and generations), the history of the settlement and the results of the genealogical survey suggest a founder effect for GD in this population.


FINAL CONSIDERATIONS: Molecular analysis made it possible to identify the genetic profile of the population of Tabuleiro do Norte, clarify diagnostic doubts, provide adequate genetic counseling, subsidize genealogical studies, produce evidence of founder effect for G377S and acquire diagnostic experience to the benefit of future patients.

We believe the observed founder effect may be attributed to the Portuguese ancestors of the early settlers of Tabuleiro do Norte. However, it remains to be determined whether the presence of G377S in this population is related to the Jewish origin of these ancestors.

Finally, it is hoped the unusual genetic profile of the population of Tabuleiro do Norte will draw the attention of researchers interested in the study of disorders related to G377S or associated with high levels of consanguinity.


SCREENING FOR 4 MUTATIONS

- Screening was done for the most prevalent mutations in Brazil: G377S, N370S, L444P and S582L (Rosemberg, Amato, et al., 2009)
- We used the restriction fragment length polymorphism (RFLP) technique
- The gene regions containing mutations were amplified by PCR




INCLUSION CRITERIA

- Being a resident of TN and descending from original families in TN
- Identified risk for GD (GBA in dried blood ≤ 2 in newborn)
- GD patients residing in Tabuleiro do Norte
- Attendance of health education sessions
- Signing of informed consent form



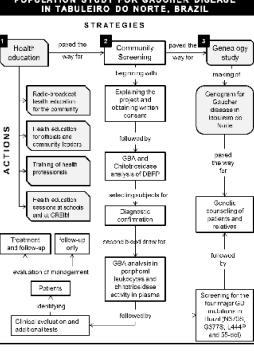
GENEALOGICAL EVIDENCE OF FOUNDER EFFECT

- 12 family generations
- 563 subjects from 181 families
- 778 Family links
- Daring over 300 years
- The earliest ancestor is from Ceará (Portugal)
- Migrated to Brazil in 1690

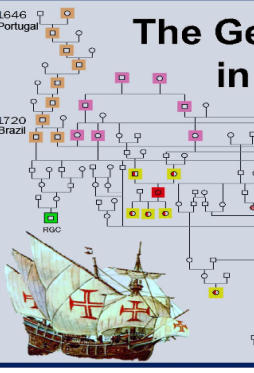


POPULATION STUDY FOR GAUCHER DISEASE IN TABULEIRO DO NORTE, BRAZIL

STRATEGIES



ACTIONS

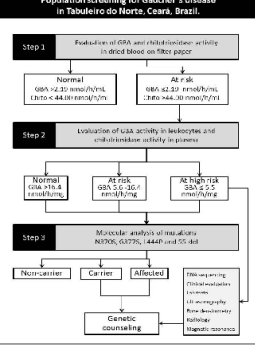


RESULTS OF SCREENING FOR 4 MUTATIONS

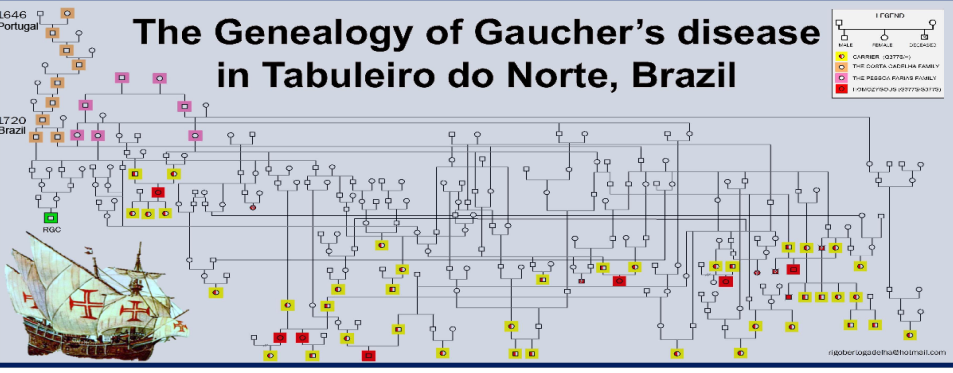
Table 2. Affected subjects, carriers and non-carriers of mutations for Gaucher's disease according to gender, age and enzyme activity (GBA activity in leukocytes and chitotriosidase activity in plasma).

Variables	Subjects according to genetic status				p value
	Non-carrier	Carrier (G377S/+)	Affected (G377S/G377S)	Total	
Gender					
Males (%)	111 (83.6)	20 (14.7)	5 (3.7)	136 (100)	
Females (%)	49 (22.3)	14 (7.6)	1 (0.9)	63 (63)	0.791
Age (years)					
Average	34.51	36.70	33.96	34.11	
Standard deviation	(20.30)	(14.23)	(18.85)	(18.34)	
Minimum-Maximum	(2-96)	(2-96)	(22-42)	(2-96)	
Chi-square	0.99%	(0.17-0.82)	(20.54-46.26)	(38.86-57.42)	0.242

Population screening for Gaucher's disease in Tabuleiro do Norte, Ceará, Brazil.



The Genealogy of Gaucher's disease in Tabuleiro do Norte, Brazil



Legend:
■ FOUNDER
■ NON-CARRIER
■ CARRIER (G377S/+)
■ THE GAUCHER PATIENTS FAMILY
■ THE RESEARCHER'S FAMILY
■ HOMOZYGOUS (G377S/G377S)

rigobertogadella@hotmail.com

**Anexo G – Certificado do prêmio recebido pela apresentação do pôster
“Gaucher’s disease: evidence of founder effect in a population from
Tabuleiro do Norte, Brazil” – 11nd EWGGD, Haifa, Israel, junho de 2014.**

11th EWGGD HAIFA
The European Working Group on Gaucher Disease

JUNE 25-28
2014

EWGGD 2014 - Poster Prize

The Scientific Committee is honoured to award the
EWGGD 2014 Poster Prize of €1,000 to:

Chaves, R.G., Veiga Pereira, L., Tófoli, F., Rozenberg, R.,
Fernandes Carvalho, M.D., Carneiro Coelho, J.,
Michellin-Tirelli, K., de Freitas Chaves, M., Cavalcanti
Junior, G.B.; Brasil

for their work:

GAUCHER'S DISEASE: EVIDENCE OF FOUNDER
EFFECT IN A POPULATION FROM TABULEIRO DO
NORTE, NORTHEASTERN BRAZIL

Congratulations,



Stephan vom Dahl, for the EWGGD
Chairman

Apêndice A – Comentários, críticas e sugestões

O projeto de rastreamento populacional consistia nas dosagens das enzimas GCase e quitotriosidase em SSPF, seguida da avaliação das enzimas GCase em leucócitos e quitotriosidase no plasma. Esse rastreamento foi capaz de selecionar um “grupo de risco” de indivíduos que apresentou baixa atividade da enzima GCase. Entretanto, não foi possível identificar com precisão os indivíduos portadores e os afetados desse grupo.

Desse modo, foi necessário realizar o estudo molecular dos indivíduos selecionados com bases nas medidas das atividades enzimáticas para identificar com segurança os indivíduos portadores e os afetados, permitindo, desse modo, a realização do aconselhamento genético.

Após o rastreamento molecular inicial das quatro mutações, algumas dúvidas ainda persistiram e foi necessário realizar sequenciamento do DNA em amostras colhidas da mucosa bucal de quatro indivíduos assintomáticos e com baixas dosagens de GCase. Percebe-se, portanto, que alterações foram sendo realizadas ao projeto inicial, sobretudo, para esclarecimentos de dúvidas surgidas a partir dos dados coletados.

As principais dificuldades encontradas durante o projeto foram: evitar a formação de estigmas em relação aos indivíduos afetados e os portadores; coletar informações relacionadas aos diagnósticos dos pacientes que já faziam tratamento em Fortaleza e que foram incluídos no estudo molecular.

A cidade é muito pequena e as pessoas se conhecem muito. Para que indivíduos afetados e os portadores não sofressem danos causados pela formação de estigmas, as atividades de educação em saúde nas escolas, unidades de saúde e nos meios de comunicação locais e regionais foram intensificadas para que a população entendesse o significado dos resultados da pesquisa.

Quatro dos cinco pacientes que participaram desse estudo realizam tratamento para DG em Fortaleza. Inicialmente, planejava-se obter as informações desses pacientes a partir da revisão dos prontuários na unidade de saúde onde eles realizam o tratamento. Grandes dificuldades, entretanto, foram impostas ao autor para acesso aos prontuários. Esse problema foi, sem dúvidas, o mais difícil de ser contornado, pois as informações sobre o genótipo dos pacientes são fundamentais

para a conclusão do estudo. A solução veio do apoio e adesão dos pacientes à pesquisa, assinando TCLE, fornecendo as informações e permitindo a avaliação clínica e coleta de amostras de DNA para o estudo molecular.

Esse projeto tornou TN conhecido na comunidade científica nacional e internacional interessada no estudo da DG e tem despertado grande interesse de pesquisadores brasileiros e até de outros países.

Estudos complementares para identificar a origem étnica da mutação G377S encontrada nessa população já estão sendo elaborados e deverão ser realizados em parceria com universidades portuguesas e de Israel.

Projeto de pesquisa envolvendo DG e doença de Parkinson nessa comunidade está sendo preparado em parceria com instituições nacionais e internacionais.

Dentre os méritos desse trabalho, o destaque vai para as sessões de educação em saúde realizadas nas escolas, nas unidades de saúde locais e regionais. Entrevistas nas emissoras de rádio e de televisão, assim como em jornais impressos durante anos divulgaram a DG em TN e por todo Brasil.

No Vale do Jaguaribe, região onde se situa TN, as atividades educativas também contribuíram para o diagnóstico de novos pacientes provenientes de cidades vizinhas a TN que nem participaram da pesquisa, mas procuraram o CREIM de TN para realizar diagnóstico e tratamento da DG. A procura dessa unidade de saúde para avaliação de pacientes com sintomas da DG tem tornado o CREIM de TN um centro de referência nos erros inatos do metabolismo para toda região.

A descoberta do possível EF da mutação G377S em TN é também de grande importância porque facilitará o diagnóstico molecular de novos pacientes e poderá orientar futuros projetos de rastreamento da DG na cidade.

Não menos relevante foi a reconstituição da genealogia das famílias envolvidas e a confecção do heredograma das famílias envolvidas, uma importante ferramenta que poderá ser útil em futuros estudos sobre DG ou outras doenças correlatas nessa comunidade, além de clarear estreitos laços familiares, até então, desconhecidos.

Os estudos moleculares foram publicados no artigo *Consanguinity and founder effect for Gaucher disease mutation G377S in a population from Tabuleiro do Norte, Northeastern Brazil* (Anexo A) e apresentado em eventos científicos

internacionais, como European Human Genetics Conference, 2015 – Glasgow, Escócia, em junho de 2015 (S B, C, E e F).

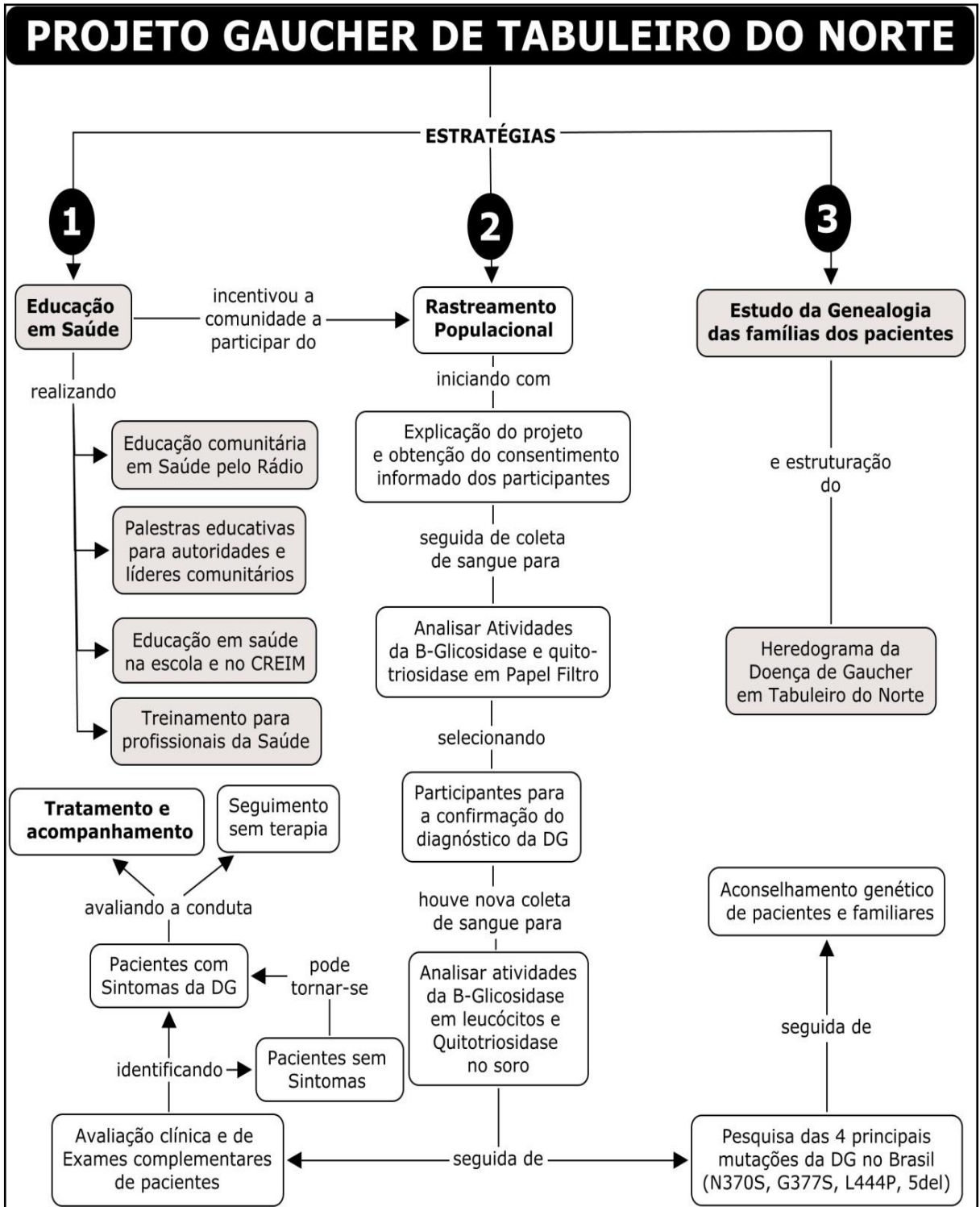
O pôster com o mesmo título foi apresentado e premiado no 11nd The European Working Group on Gaucher Disease - 11nd EWGGD – Haifa, Israel, em junho de 2014 (G). Nova apresentação e premiação do estudo molecular para DG ocorreram durante 2nd Latin American Gaucher Disease Round Table – Rio de Janeiro em maio de 2015 (D), confirmando o reconhecimento da comunidade científica internacional ao trabalho realizado em TN.

Enfim, espera-se que o perfil genético incomum da população de TN desperte interesse de outros pesquisadores que desejarem estudar populações com doenças relacionadas à mutação G377S ou que possam ser influenciadas pelo elevado grau de consanguinidade.

Finalmente, para pesquisadores interessados em realizar estudos de rastreamento populacional envolvendo pequenas comunidade e doenças rars recomendamos:

- a) Dar prioridade às atividades de educação em saúde como estratégias de mobilização social;
- b) Envolver-se culturalmente na comunidade para compreender melhor os fenômenos sociais;
- c) Estabelecer parcerias com autoridades e lideranças locais para facilitar o acesso à população e o apoio da comunidade;
- d) Seguir rigorosamente os princípios de ética em pesquisa, mantendo vigilante a possíveis estigmas que possam surgir durante o desenvolvimento do estudo.
- e) Observar atentamente os problemas que poderão surgir quando os resultados de análises genéticas não sejam compatíveis com o estudo da genealogia das famílias.

Apêndice B – Mapa conceitual do Estudo Populacional da doença de Gaucher em Tabuleiro do Norte-CE: eixos estratégicos e as principais ações utilizadas para desenvolvimento do projeto de pesquisa.



Fonte: Próprio autor (2007).

Apêndice C – Atividades da β -glicosidase ácida e quitotriosidase em amostras de sangue seco em papel de filtro em Tabuleiro do Norte-CE.

Categorias	Atividade da β -Glicosidase Ácida (nmol/h/mL)			Atividade da Quitotriosidase (nmol/h/mL)		
	n (%)	Média \pm DP	Mediana /Variação	n (%)	Média \pm DP	Mediana /Variação
Sexo						
Masculino	244 (33)	3.29 \pm 1.56	3.00 (0.40-12.00)	232 (33)	24.14 \pm 20.99	19.00 (0-101.00)
Feminino	496 (67)	3.46 \pm 1.50	3.10 (0.50-10.40)	470 (67)	34.13 \pm 27.23	27.00 (0-242.00)
Total	740 (100)	3.40 \pm 1.52	3.10 (0.50-12.00)	702 (100)	30.83 \pm 25.76	24.00 (0-242.00)
Faixa Etária (anos)						
(I) 1 – 20	255 (34.5)	3.53 \pm 1.63	3.30 (0.40-11.00)	244 (34.8)	27.41 \pm 25.27	20.00 (0-170.00)
(II) 21– 40	246 (33.2)	3.32 \pm 1.46	3.00 (1.00-12.00)	229 (32.6)	32.64 \pm 27.62	27.00 (0-242.00)
(III) 41 – 60	177 (23.9)	3.41 \pm 1.50	3.00 (0.80-10.40)	174 (24.8)	33.39 \pm 24.84	28.00 (0-158.00)
(IV) 61 – 85	62 (8.4)	3.13 \pm 1.37	2.95 (0.55-9.00)	55 (7.8)	30.33 \pm 21.28	26.00 (20-83.00)
<i>Níveis de atividades da GBA (nmol/h/mL)</i>						
(A) 0.12 – 1.37	18 (2.4)	1.00 \pm 0.28	1.10 (0.40-1.30)	17 (2.4)	22.29 \pm 17.95	20.00 (0-67.00)
(B) 1.38 – 1.60	24 (3.2)	1.53 \pm 0.08	1.57 (1.40-1.60)	23 (3.3)	30.94 \pm 24.11	20.00 (2.8-86.00)
(C) 1.61 – 2.18	93 (12.6)	1.94 \pm 0.13	2.00 (1.70-2.13)	87 (12.4)	24.55 \pm 21.93	18.00 (0-90.00)
(D) 2.19 – 16.8	605 (81.8)	3.77 \pm 1,43	3.40 (2.20-12.00)	575 (81.9)	32.03 \pm 26,41	25.00 (0-242.00)
<i>Níveis de Atividades da Quitotriosidase (nmol/h/mL)</i>						
(E) 0 – 44	549 (78.2)	3.34 \pm 1.44	3.10 (0.40-12.00)	549 (78.2)	20.07 \pm 11.40	19.00 (0-44.00)
(F) 45 – 242	153 (21.8)	3.69 \pm 1.79	3.30 (1.30-10.40)	153 (21.8)	69.42 \pm 25.99	63.00 (45-242.00)

FONTE: dados coletados pelo autor, 2008

Apêndice D – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Nome do Estudo: ANÁLISE MOLECULAR PARA DOENÇA DE GAUCHER (DG) EM PACIENTES E FAMILIARES DE TABULEIRO DO NORTE – CE.

Médico Responsável pelo Estudo: Dr. RIGOBERTO GADELHA CHAVES

Você está sendo convidado a participar de um estudo de pesquisa. Este Termo de Consentimento contém informações importantes que vão ajudar a você decidir se quer ou não participar deste estudo. Leia este termo bem devagar ou peça alguém que seja responsável por você para ler (se você não tiver condições de ler), e se tiver alguma dúvida peça explicações ao médico do estudo ou a alguém de sua equipe.

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DO ESTUDO

A doença de Gaucher é uma doença genética rara, hereditária, que acontece porque há uma deficiência na produção de uma substância muito importante produzida pelo organismo, chamada enzima. Quando há deficiência dessa enzima, o paciente pode ficar com uma doença séria, que pode atingir vários órgãos como o baço, fígado, sangue, ossos, pulmões e o cérebro. Assim essa doença pode causar anemia, sangramento, alterações nos ossos e aumento do fígado e do baço e até levar à morte, quando não tratada. O diagnóstico é baseado nas manifestações clínicas (sinais e sintomas) do paciente e na dosagem da enzima deficiente (que é chamada “ β -glicosidase ácida”). Existe um exame chamado “análise molecular”, realizado a partir da coleta de material da mucosa bucal (a parte internada da bochecha), por meio de uma escovação do local (raspado bucal) que permite identificar alterações genéticas relacionadas à doença de Gaucher. Esse exame é muito importante para o aconselhamento de pessoas quanto à possibilidade de apresentar a doença de Gaucher ou transmitir as alterações genéticas para seus descendentes e também para acompanhamento do tratamento dos pacientes que dele necessitarem. Esse aconselhamento genético será oferecido para todos os casos, e nessa oportunidade serão esclarecidas sobre o resultado do exame com total privacidade.

QUEM PODE PARTICIPAR DESTE ESTUDO?

As pessoas convidadas a participar da pesquisa serão aquelas que JÁ TENHAM realizado a dosagem da enzima descrita acima, chamada “ β -glicosidase ácida”, com valores abaixo do normal. Essa dosagem é feita a partir de pequena quantidade de sangue coletada, colocada em “Papel de Filtro” e analisada em laboratório especializado na doença de Gaucher. Portanto, se esse exame do papel de filtro for anormal, essas pessoas serão submetidas à coleta de material da mucosa bucal (parte interna da bochecha) para análise da genética molecular (saber quais os genes daquela pessoa que podem estar relacionadas com a doença) com o objetivo de identificar a provável alteração responsável pela deficiência da enzima relacionada à doença de Gaucher. Antes do estudo,

essas pessoas participarão de sessão educativa para esclarecimento sobre os procedimentos a serem submetidos, sobre a doença de Gaucher e suas implicações para a saúde.

O QUE O PACIENTE PRECISA FAZER PARA PARTICIPAR DESTA ESTUDO?

Se você quiser participar do estudo, terá de fazer o seguinte:

- Visitar o médico do estudo no ambulatório do Centro de Referência de Erros Inatos do Metabolismo que funciona na Unidade do Programa Saúde da Família, situada na Avenida Ziltamir Chaves, S/N, Vila Macena, Tabuleiro do Norte – CE, conduzindo Carteira de Identidade (RG) e resultado do exame da dosagem da enzima β -Glicosidase ácida, realizado em Papel de filtro durante o Estudo Populacional sobre a doença de Gaucher do qual participou anteriormente. Serão preenchidas as fichas de identificação e planilhas de coleta de amostras. Será realizada sessão educativa relacionada à pesquisa sobre a doença de Gaucher e, somente após você ou seu representante legal assinar esse documento, é que você será encaminhado para a coleta da amostra da mucosa bucal, realizada pelo pesquisador, individualmente, na Sala do Projeto Gaucher. O material será colocado em frasco especialmente feito para esse tipo de exame e enviado por meio dos Correios, em forma de SEDEX, para o Laboratório do Instituto de Biociências da USP (IB-USP) coordenado por Lygia V Pereira, Ph.D. e sob a responsabilidade de Roberto Rozenberg, Ph.D. Os resultados serão enviados somente ao pesquisador que entregará ao participante, individualmente, com toda privacidade, para que possam ser esclarecidas as eventuais dúvidas apresentadas pelo participante. Esse resultado poderá demorar, dependendo do tipo de exame e da quantidade de exames coletados, em média de 3 a 6 meses a partir do dia da coleta, salvo imprevistos durante a realização da pesquisa.

QUAIS OS EFEITOS INDESEJÁVEIS (RUINS) QUE OS EXAMES PODEM PROVOCAR?

A coleta da amostra da mucosa bucal é realizada com uma escova especialmente desenvolvida para essa finalidade e o paciente sentirá a sensação de uma escovação um pouco mais firme da parte interna da bochecha.

ARMAZENAMENTO DE DADOS E AMOSTRAS

O armazenamento das amostras coletadas pelo pesquisador, devidamente identificadas, enviadas para análise no Laboratório de Genética Molecular do IB-USP, ficará sob responsabilidade de Instituto de Biociências, USP coordenado por Lygia da Veiga Pereira e do Roberto Rozenberg, PhD, e serão utilizadas unicamente para as finalidades dessa pesquisa. Os resultados enviados somente ao pesquisador serão armazenados sigilosamente por ele para garantia de privacidade do paciente e entregues diretamente ao participante ou ao seu responsável legal, devidamente identificado

QUE BENEFÍCIOS POSSO TER COM A PARTICIPAÇÃO NESSE ESTUDO?

Com o diagnóstico molecular da alteração relacionada à doença de Gaucher, o participante poderá se beneficiar com a detecção de condição de portadores da alteração genética ou de indivíduos

afetados, ou seja, com a possibilidade de ter ou vir a desenvolver a doença de Gaucher. Com esses resultados, o médico pode fazer o Aconselhamento Genético. Esse aconselhamento significa orientar os participantes sobre quais as possibilidades de duas pessoas apresentarem filhos afetados ou portadores da alteração genética relacionada à doença de Gaucher, a partir do conhecimento da sua condição genética revelada pela pesquisa. Em se tratando de um doente ou possível doente no futuro, os resultados da pesquisa ajudarão no melhor direcionamento do tratamento médico, de forma mais precoce (mais cedo) e até o diagnóstico pré-natal, se necessário.

A QUEM DEVO PROCURAR SE TIVER ALGUMA DÚVIDA sobre...?

O estudo ou um dano relacionado ao estudo: Dr. Rigoberto Gadelha Chaves.

Telefones: (88)3424-1190 ou (88)8809-91-97

Meus direitos como pessoa no estudo: Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Geral César Cals de Oliveira, na Avenida do Imperador 445, Centro, Fortaleza-CE ou pelo telefone 85-3101-5354

Assinando abaixo, estou reconhecendo que:

- A natureza e o objetivo do projeto de pesquisa foram explicados a mim/a meu filho e compreendo que eu (ou meu filho) poderei não ter benefício direto no estudo.
- Eu entendo e concordo com os procedimentos necessários para coleta do material da mucosa bucal, seu acondicionamento e seu destino.
- Eu compreendo e concordo que, apesar das informações obtidas no estudo poderem ser publicadas, elas serão confidenciais e eu (ou meu filho) não serei identificado a partir delas.
- Eu compreendo que posso me retirar (ou retirar meu filho) do estudo em qualquer etapa e que isto não irá afetar os cuidados médicos ou quaisquer outros aspectos da relação minha (ou do meu filho) com esta Instituição.
- Eu compreendo que não haverá pagamento para mim (ou meu filho) por participar da pesquisa. O pagamento pela participação em estudo de pesquisa não é permitido por lei. Mas não terei despesas com relação ao estudo (exames do estudo, transporte e alimentação)
- Eu tive a oportunidade de discutir a minha participação (ou de meu filho) neste projeto de pesquisa com um membro da família ou amigo e/ou tive a oportunidade de ter um membro da família ou amigo presente enquanto o projeto de pesquisa estava sendo explicado pelo pesquisador.
- Eu estou ciente que os resultados desta análise genética molecular da mucosa bucal poderão demorar a ficar prontos.
- Se o estudo for interrompido, o motivo deverá ser aceito pelo Comitê de Ética que o aprovou,

antes da interrupção. Exceto, em caso urgente para proteger o participante da pesquisa, devendo então ser comunicado ao Comitê de Ética, na primeira oportunidade.

Receberei uma cópia assinada deste termo de consentimento.

Tabuleiro do Norte: ____ de _____ de _____

Nome do Participante Voluntário: _____

RG: _____

Assinatura: _____

Órgão Expedidor: _____

Data de Nasc: ____/____/____

Nome do Representante Legal: _____

RG: _____

Órgão Expedidor: _____

Assinatura: _____

Data de Nasc: ____/____/____

Nome do Apresentador do TCLE ¹ _____

RG: _____

Órgão Expedidor: _____

Assinatura: _____

Data de Nasc: ____/____/____

Nome do Pesquisador: RIGOBERTO GADELHA CHAVES

RG: _____

Órgão Expedidor: _____

Assinatura: _____

Data de Nasc: ____/____/____

Nota: ¹ Colaborador que apresentou o TCLE para o Participante.

REFERÊNCIAS

1. Beutler E, Grabowski GA. Gaucher disease. In: Scriver C, Sly WS, Valle D. (Eds.). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8th ed. New York: McGraw-Hill, 2001. p. 3635-3668.
2. Grabowski, GA. Gaucher disease: lessons from a decade of therapy. *Journal of Pediatrics*, v. 144, 5 Suppl 5, p. 15-19, May 2004.
3. Gaucher Registry, I. C. Population Report: Latin America compared to Rest of World. *International Collaborative Gaucher Group*, 35, 2014.
4. Chaves RG, Coelho JC, Michelin-Tirelli K., Maurício, TF, Chaves EFM, Almeida PC, Maurício CR, Cavalcanti Jr GB. Successful screening for Gaucher disease in a high-prevalence population in Tabuleiro do Norte (northeastern Brazil): a cross-sectional study. *Journal of Inherited Metabolic Disease Reports.*, v. 1, p. 73-78, 2011. doi: 10.1007/8904_2011_19. Epub 2011 Jun 22.
5. Biblioteca Virtual em Saúde. DeCS – Descritores em Ciências da Saúde. Disponível em: <<http://www.decs.bvs.br>>. Acesso em: 5 abr. 2015.
6. Martins AM. Inborn errors of metabolism: a clinical overview. *São Paulo Medical Journal*. São Paulo, v. 117, n. 6, p. 251-265. nov.1999.
7. Pampols T. Inherited metabolic rare disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 686, p. 397-431, 2010.
8. Meikle PJ, Ranieri E, Simonsen H, Rozaklis T, Ramsay SL, Whitfield PD, Fuller, M, Christensen E, Skovby F, Hopwood JJ. Newborn screening for lysosomal storage disorders: clinical evaluation of a two-tier strategy. *Pediatrics*, v. 114, n. 4, p. 909-916, Oct. 2004.
9. Saudubray JM, Charpentier C. Clinical phenotypes: Diagnosis/algorithms. In: Scriver C.; Beaudet A.; Sly W.; Valle D. (Eds.). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York, NY: McGraw-Hill, 2001, p. 1327-1403.
10. Futerman AH, Van Meer G. The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 5, n. 7, p. 554-565, Jul. 2004.
11. Ballabio A. Disease pathogenesis explained by basic science: lysosomal storage diseases as autophagocytic disorders. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, v. 47, Suppl 1:S34-8, 2009.
12. Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. Prevalence of lysosomal storage disorders. *Journal of the American Medical Association*, v. 281, 3, p. 249-254, Jan. 1999.

13. De Souza MV, Krug BC, Picon PD, Schwartz IV. High cost drugs for rare diseases in Brazil: the case of lysosomal storage disorders. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 15, Suppl 3, p. 3443-354, Nov. 2010.
14. Tirelli KM. *Estudo das características bioquímicas da β -glicosidase humana em indivíduos homocigotos e heterocigotos para a Doença de Gaucher com mutações pré-determinadas: comparação com indivíduos normais*. 2015. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005. Disponível em: <<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/5895/000521752.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 25 jul. 2015.
15. Staretz-Chacham O, Lang TC, Lamarca ME, Krasnewich D, Sidransky E. Lysosomal storage disorders in the newborn. *Pediatrics*, v. 123, n. 4, p. 1191-207, Apr. 2009. doi: 10.1542/peds.2008-0635.
16. Dunn P, Kuo MC, Sun CF. Pseudo-Gaucher cells in mycobacterial infection: a report of two cases. *Journal of Clinical Pathology*, v. 58, n. 10, 1113-1114, Oct. 2005.
17. Tylki-Szymańska A, Groener JE, Kamiński ML, Ługowska A, Jurkiewicz E, Czartoryska B. Gaucher disease due to saposin C deficiency.; previously described as non-neuronopathic form--no positive effects after 2-years of miglustat therapy. *Molecular Genetics and Metabolism*, v. 104, n. 4, p. 627-630, Dec. 2011.
18. Bendikov-Bar I, Horowitz M. Gaucher disease paradigm: from ERAD to comorbidity. *Human Mutation*, v. 33, n. 10, p. 1398-1407, Oct. 2012.
19. Reczek D, Schwake M, Schröder J, Hughes H, Blanz J, Jin X, Brondyk W, Van Patten S, Edmunds, T, Saftig P. LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase. *Journal Cell*, v. 131, n. 4, p. 770-783, Nov. 2007.
20. Balreira A, Gaspar P, Caiola D, Chaves J, Beirão I, Lima JL, Azevedo, JE, Miranda MC. A nonsense mutation in the LIMP-2 gene associated with progressive myoclonic epilepsy and nephrotic syndrome. *Humam Molecular Genetics*, v. 17, n. 14, p. 2238-43, Jul. 2008. doi: 10.1093/hmg/ddn124.
21. Blanz J, Groth J, Zachos C, Wehling C, Saftig P, Schwake M. 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*, v. 19, n. 4, p. 563-572, 2010.
22. Historia de La Medicina. Disponível em: <www.historiadelamedicina.org/gaucher.html> Acesso em: 15 abr. 2015.
23. Aerts JM, Van Breemen MJ, Bussink AP, Brinkman J, Hollak CEM, Langeveld M, Linthorst GE, Vedder AC, De Fost M. The blood–brain barrier and treatment

- of lysosomal storage diseases. *International Congress Series*, 1277, 2005, p. 19-31.
24. Ginns EI, Choudary PV, Tsuji S, Martin B, Stubblefield B, Sawyer J, Hozier J, Barranger JA. Gene mapping and leader polypeptide sequence of human glucocerebrosidase: implications for Gaucher disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences – USA*, v. 82, n. 20, p. 7101-7105, Oct. 1985.
 25. Brady RO. Enzyme replacement for lysosomal diseases. *Annual Review of Medicine*, v. 57, 283-296, 2006.
 26. Van Dussen L, Biegstraaten M, Hollak CE.; Dijkgraaf MG. Cost-effectiveness of enzyme replacement therapy for type 1 Gaucher disease. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, v. 14, p. 9-51, Apr. 2014.
 27. US. Food and Drug Administration. *FDA approves new drug to treat a form of Gaucher disease 2015*. Disponível em: <<http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm410585.html>>. Acesso em: 15 maio 2015.
 28. Shayman JA. Eliglustat Tartrate: Glucosylceramide Synthase Inhibitor Treatment of Type 1 Gaucher Disease. *Drugs Future*, v. 35, n. 8, p. 613-620, Aug. 2010.
 29. Poorthuis BJ, Wevers RA, Kleijer WJ, Groener JE, De Jong JG, Van Weely S, Niezen-Koning KE, Van Diggelen OP. The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. *Human Genetics*, v. 105, n. 1-2, p. 151-156, Jul./Aug. 1999.
 30. Kornfeld S. Trafficking of lysosomal enzymes in normal and disease states. *Journal of Clinical Investigation*, v. 77, n. 1, p. 1-6, Jan. 1986.
 31. Amaral O, Pinto E, Fortuna M, Lacerda L, Sá Miranda MC. Type 1 Gaucher disease: identification of N396T and prevalence of glucocerebrosidase mutations in the Portuguese. *Human Mutation*, v. 8, n. 3, p. 280-281, 1996.
 32. Aerts JM, Hollak C, Boot R, Groener A. Biochemistry of glycosphingolipid storage disorders: implications for therapeutic intervention. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, v. 358, n. 1433, p. 905-914, May 2003.
 33. Sandhoff K, Kolter T. Biosynthesis and degradation of mammalian glycosphingolipids. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, v. 358, n. 1433, p. 847-861, May 2003.
 34. Sillence DJ, Platt FM. Glycosphingolipids in endocytic membrane transport. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 15, n. 4, p. 409-416, Aug. 2004.

35. Horowitz M, Wilder S, Horowitz Z, Reiner O, Gelbart T, Beutler E. The human glucocerebrosidase gene and pseudogene: structure and evolution. *Genomics*, v. 4, n. 1, p. 87-96, Jan. 1989.
36. Grabowski GA, Horowitz M. Gaucher's disease: molecular.; genetic and enzymological aspects. *Baillière's Clinical Haematology*, v. 10, n. 4, p. 635-656, Dec. 1997.
37. Sawkar AR, D'haeze W, Kelly JW. Therapeutic strategies to ameliorate lysosomal storage disorders--a focus on Gaucher disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 63, n. 10, p. 1179-1192, May 2006.
38. Cox TM. Gaucher disease: understanding the molecular pathogenesis of sphingolipidoses. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, v. 24, Suppl 2, p. 106-121, 2001.
39. D Dvir H, Harel M, Mccarthy AA, Toker L, Silman I, Futerman AH, Sussman JL. X-ray structure of human acid-beta-glucosidase.; the defective enzyme in Gaucher disease. *EMBO Reports.*, v. 4, n. 7, p. 704-709, Jul. 2003.
40. Ho MW, O'brien JS. Gaucher's disease: deficiency of 'acid' -glucosidase and reconstitution of enzyme activity in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences - USA*, v. 68, n. 11, p. 2810-2813, Nov. 1971.
41. Pàmpols T, Pineda M, Girós ML, Ferrer I, Cusi V, Chabás A, Sanmarti FX, Vanier MT, Christomanou, H. Neuronopathic juvenile glucosylceramidosis due to sap-C deficiency: clinical course, neuropathology and brain lipid composition in this Gaucher disease variant. *Acta Neuropathologica*, v. 97, n. 1, p. 91-79, Jan. 1999.
42. Tylki-Szymańska A, Czartoryska B, Vanier MT, Poorthuis BJ, Groener JA, Ługowska A, Millat G, Vaccaro AM, Jurkiewicz E. Non-neuronopathic Gaucher disease due to saposin C deficiency. *Clinical Genetics*, v. 72, n. 6, p. 538-542, Dec. 2007.
43. Pastores GM, Hughes DA. Gaucher Disease. 2000 Jul 27 [Updated 2015 Feb 26]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH (Eds.). *GeneReviews® [Internet]*. Seattle (WA): University of Washington, 1993-2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1269/>>. Acesso em: 15 abr. 2015.
44. Sa Miranda MC, Aerts JM, Pinto R, Fontes A, De Lacerda LW; Van Weely S, Barranger J, Tager, JM. Activity of glucocerebrosidase in extracts of different cell types from type 1 Gaucher disease patients. *Clinical Genetics*, v. 38, n. 3, p. 218-227, Sep. 1990.
45. Meivar-Levy I, Horowitz M, Futerman AH. Analysis of glucocerebrosidase activity using N-(1-[14C]hexanoyl)-D-erythroglucosylsphingosine demonstrates a correlation between levels of residual enzyme activity and the type of Gaucher disease. *Biochemical Journal*. 1994 Oct 15;303 (Pt 2):377-82.

46. Stewart AJ, Jones RD. Pseudo-Gaucher cells in myelodysplasia. *J Journal of Clinical Pathology*, v. 52, n. 12, 917-918, Dec. 1999.
47. Rudensky B, Paz E, Altarescu G, Raveh D, Elstein D, Zimran A. Fluorescent flow cytometric assay: a new diagnostic tool for measuring beta-glucocerebrosidase activity in Gaucher disease. *Blood Cells, Molecules and Diseases, Molecules & Diseases*, v. 30, n. 1, p. 97-99, Jan./Feb. 2003.
48. Allen MJ, Myer BJ, Khokher AM, Rushton N, Cox TM. Pro-inflammatory cytokines and the pathogenesis of Gaucher's disease: increased release of interleukin-6 and interleukin-10. *QJM*, v. 90, n. 1, p. 19-25, Jan. 1997.
49. Michelakakis H, Spanou C, Kondyli A, Dimitriou E, Van Weely S, Hollak CE, Van Oers MH, Aerts JM. Plasma tumor necrosis factor- α (TNF- α) levels in Gaucher disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1317, n. 3, p. 219-222, Dec. 1996.
50. Depaolo J, Goker-Alpan O, Samaddar T, Lopez G, Sidransky E. The association between mutations in the lysosomal protein glucocerebrosidase and parkinsonism. *Movement Disorders*, v. 24, n. 11, p. 1571-1578, Aug. 2009.
51. Tayebi N, Cushner S, Sidransky E. Differentiation of the glucocerebrosidase gene from pseudogene by long-template PCR: implications for Gaucher disease. *American Journal of Human Genetics*, v. 59, n. 3, p. 740-741, Sep. 1996.
52. Matern H, Boermans H, Lottspeich F, Matern S. Molecular cloning and expression of human bile acid beta-glucosidase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 41, p. 37929-33, Oct. 2001.
53. Yildiz Y, Matern H, Thompson B, Allegood JC, Warren RL, Ramirez DM, Hammer RE, Hamra FK, Matern S.; Russell DW. Mutation of beta-glucosidase 2 causes glycolipid storage disease and impaired male fertility. *Journal of Clinical Investigation*, v. 116, n. 11, p. 2985-2994, Nov. 2006.
54. Boot RG, Verhoek M, Donker-Koopman W, Strijland A, Van Marle J, Overkleeft HS, Wennekes T, Aerts JM. Identification of the non-lysosomal glucosylceramidase as beta-glucosidase 2. *Journal of Biological Chemistry*, v. 282, n. 2, p. 1305-1312, Jan. 2007.
55. Hammer MB, Eleuch-Fayache G, Schottlaender LV, Nehdi H, Gibbs JR, Arepalli SK, Chong SB, Hernandez DG, Sailer A, Liu G, Mistry PK, Cai H, Shrader G, Sassi C, Bouhlal Y, Houlden H, Hentati F, Amouri R, Singleton AB. Mutations in GBA2 cause autosomal-recessive cerebellar ataxia with spasticity. *American Journal of Human Genetics*, v. 92, n. 2, p. 245-251, Feb. 2013.
56. Martin E, Schüle R, Smets K, Rastetter A, Boukhris A, Loureiro JL, Gonzalez M A, Mundwiller E, Deconinck T, Wessner M, Jornea L, Oteyza AC, Durr A, Martin JJ, Schöls L, Mhiri C, Lamari F, Züchner S, De Jonghe P, Kabashi E, Brice A, Stevanin G. Loss of function of glucocerebrosidase GBA2 is responsible for

- motor neuron defects in hereditary spastic paraplegia. *American Journal of Human Genetics*, v. 92, n. 2, p. 238-244, Feb. 2013.
57. Giraldo P, Alfonso P, Irún P, Gort L Chabás A, Vilageliu L, Grinberg D, Sá Miranda CM, Pocovi M. Mapping the genetic and clinical characteristics of Gaucher disease in the Iberian Peninsula. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, v. 19, p. 7:17, Mar. 2012.
 58. Grace ME, Newman KM, Scheinker V, Berg-Fussman A, Grabowski GA. Analysis of human acid beta-glucosidase by site-directed mutagenesis and heterologous expression. *Journal of Biological Chemistry*, v. 269, n. 3, p. 2283-2291, Jan. 1994.
 59. Reiner O, Wigderson M, Horowitz M. *Structural analysis of the human glucocerebrosidase genes*. *DNA*, v. 7, n. 2, p. 107-116, Mar. 1988.
 60. Barneveld RA, Keijzer W, Tegelaers FP, Ginns EI, Geurts Van Kessel A, Brady RO, Barranger JA, Tager JM, Galjaard H, Westerveld A, Reuser AJ. Assignment of the gene coding for human beta-glucocerebrosidase to the region q21-q31 of chromosome 1 using monoclonal antibodies. *Human Genetics*, v. 64, n. 3, p. 227-231, 1983.
 61. Koprivica V, Stone DL, Park JK, Callahan M, Frisch A, Cohen IJ, Tayebi N, Sidransky E. Analysis and classification of 304 mutant alleles in patients with type 1 and type 3 Gaucher disease. *American Journal of Human Genetics*, v. 66, n. 6, p. 1777-1786, Jun. 2000.
 62. Grabowski GA. Phenotype.; diagnosis.; and treatment of Gaucher's disease. *Lancet*, v. 372, n. 9645, p. 1263-1271, Oct. 2008.
 63. Sidransky E. Gaucher disease: complexity in a "simple" disorder. *Molecular Genetics and Metabolism*, v. 83, 1-2, p. 6-15, Sep./Oct. 2004.
 64. Hruska KS, Lamarca ME, Scott CR, Sidransky E. Gaucher disease: mutation and polymorphism spectrum in the glucocerebrosidase gene (GBA). *Human Mutation*, v. 29, n. 5, p. 567-583, May 2008.
 65. Mistry PK. Genotype/phenotype correlations in Gaucher's disease. *Lancet*, v. 346, n. 8981, p. 982-983, Oct. 1995.
 66. Tayebi N, Stern H, Dymarskaia I, Herman J, Sidransky E. 55-base pair deletion in certain patients with Gaucher disease complicates screening for common Gaucher alleles. *American Journal of Medical Genetics*, v. 66, n. 3, p. 316-319, Dec. 1996.
 67. Le Coutre P, Demina A, Beutler E, Beck M, Petrides PE. Molecular analysis of Gaucher disease: distribution of eight mutations and the complete gene deletion in 27 patients from Germany. *Human Genetics*, v. 99, n. 6, p. 816-821, Jun. 1997.

68. Cormand B, Harboe TL, Gort L, Campoy C, Blanco M, Chamoles N, Chabás A, Vilageliu L, Grinberg D. Mutation analysis of Gaucher disease patients from Argentina: high prevalence of the RecNcil mutation. *American Journal of Medical Genetics*, v. 80, n. 4, p. 343-351, Dec. 1998.
69. Rozenberg R, Araújo FT, Fox DC, Aranda P, Nonino A, Micheletti C, Martins AM, Cravo R, Sobreira E, Pereira LV. High frequency of mutation G377S in Brazilian type 3 Gaucher disease patients. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 39, n. 9, p. 1171-1179, Sep. 2006
70. Giraldo P, Pocoví M, Pérez-Calvo J, Rubio-Félix D, Giralto M. Report of the Spanish Gaucher's disease registry: clinical and genetic characteristics. *Haematologica*, v. 85, n. 8, p. 792-799, Aug. 2000.
71. Alfonso P, Aznarez S, Giralto M, Pocovi M, Giraldo P. Spanish Gaucher's Disease Registry. Mutation analysis and genotype/phenotype relationships of Gaucher disease patients in Spain. *Journal of Human Genetics*, v. 52, n. 5, p. 391-396, 2007.
72. Tsuji S, Choudary PV, Martin BM, Stubblefield BK, Mayor JA, Barranger JA, Ginns EI. A mutation in the human glucocerebrosidase gene in neuronopathic Gaucher's disease. *New England Journal of Medicine*, v. 316, n. 10, p. 570-575, Mar. 1987.
73. Wan L, Hsu CM, Tsai CH, Lee CC, Hwu WL, Tsai FJ. Mutation analysis of Gaucher disease patients in Taiwan: high prevalence of the RecNcil and L444P mutations. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, v. 36, n. 3, p. 422-425, May/Jun. 2006.
74. Kaplan P, Andersson HC, Kacena KA, Yee JD. The clinical and demographic characteristics of nonneuronopathic Gaucher disease in 887 children at diagnosis. *Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine*, v. 160, n. 6, p. 603-608, Jun. 2006.
75. Kishnani PS, DiRocco M, Kaplan P, Mehta A, Pastores GM, Smith SE, Puga AC, Lemay RM, Weinreb NJ. A randomized trial comparing the efficacy and safety of imiglucerase (Cerezyme) infusions every 4 weeks versus every 2 weeks in the maintenance therapy of adult patients with Gaucher disease type 1. *Molecular Genetics and Metabolism*, v. 96, n. 4, p. 164-170, Apr. 2009.
76. Mistry PK, Sadan S, Yang R, Yee J, Yang M. Consequences of diagnostic delays in type 1 Gaucher disease: the need for greater awareness among hematologists-oncologists and an opportunity for early diagnosis and intervention. *American Journal of Hematology*, v.82, n.8, p. 697-701, Aug. 2007.
77. Hollak CE, Aerts JM, Goudsmit R, Phoa SS, Ek M, Van Weely S, Von Dem Borne AE, Van Oers MH. Individualised low-dose alglucerase therapy for type 1 Gaucher's disease. *Lancet*, v. 345, n. 8963, p. 1474-1478, Jun. 1995.

78. Stone DL, Ginns EI, Krasnewich D, Sidransky E. Life-threatening splenic hemorrhage in two patients with Gaucher disease. *American Journal of Hematology*, v. 64, n. 2, p. 140-2, Jun. 2000.
79. Deghady A, Marzouk I, El-Shayeb A, Wali Y. Coagulation abnormalities in type 1 Gaucher disease in children. *Journal of Pediatric Hematology and Oncology*, v. 23, n. 5, p. 411-7, Jul./Aug. 2006.
80. Mistry PK, Sirrs S, Chan A, Pritzker MR, Duffy TP, Grace ME, Meeker DP, Goldman ME. Pulmonary hypertension in type 1 Gaucher's disease: genetic and epigenetic determinants of phenotype and response to therapy. *Molecular Genetics and Metabolism*, v. 77, n. 1-2, p. 91-98, Sep./Oct. 2002.
81. Cohen IJ. Bone crises in Gaucher disease. *Israel Medical Association Journal*, v. 5, n. 11, p. 838-839, Nov. 2003.
82. Pastores GM, Meere PA. Musculoskeletal complications associated with lysosomal storage disorders: Gaucher disease and Hurler-Scheie syndrome (mucopolysaccharidosis type I). *Current Opinion in Rheumatology*. 2005;17(1):70-8.
83. Pastores GM, Barnett NL, Bathan P, Kolodny EH. A neurological symptom survey of patients with type I Gaucher disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, v. 26, n. 7, p. 641-645, 2003.
84. Halperin A, Elstein D, Zimran A. Are symptoms of peripheral neuropathy more prevalent in patients with Gaucher disease? *Acta Neurologica Scandinavica*, v. 115, n. 4, p. 275-278, Apr. 2007.
85. Capablo JL, Saenz De Cabezón A, Fraile J, Alfonso P, Pocovi M, Giraldo P, Spanish Group on Gaucher Disease. Neurological evaluation of patients with Gaucher disease diagnosed as type 1. *Journal Of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, v. 79, n. 2, p. 219-222, Feb. 2008.
86. Goker-Alpan O, Schiffmann R, Park JK, Stubblefield BK, Tayebi N, Sidransky E. Phenotypic continuum in neuronopathic Gaucher disease: an intermediate phenotype between type 2 and type 3. *Journal of Pediatrics*, v. 143, n. 2, p. 273-276, Aug. 2003.
87. Harris CM, Taylor DS, Vellodi A. Ocular motor abnormalities in Gaucher disease. *Neuropediatrics*, v. 30, n. 6, p. 289-293, Dec. 1999.
88. Verghese J, Goldberg RF, Desnick RJ, Grace ME, Goldman JE, Lee SC, Dickson DW, Rapin I. Myoclonus from selective dentate nucleus degeneration in type 3 Gaucher disease. *Arch. Neurol.*, v.57, n. 3, p. 389-395, Mar. 2000.
89. Frei KP, Schiffmann R. Myoclonus in Gaucher disease. *Advances in Neurology*, v. 89, p. 41-48, 2002.

90. Vigan M, Stirnemann J, Caillaud C, Froissart R, Boutten A, Fantin B, Belmatoug N, Mentré F. Modeling changes in biomarkers in Gaucher disease patients receiving enzyme replacement therapy using a pathophysiological model. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, v. 9, p. 92-95, Jun. 2014.
91. Levy-Lahad E, Zimran A. Gaucher's disease: genetic counselling and population screening. *Baillieres Clin Haematol*, v.10, p.4, p.779-792, Dec. 1997.
92. Boven LA, Van Meurs M, Boot RG, Mehta A, Boon L, Aerts JM, Laman JD. Gaucher cells demonstrate a distinct macrophage phenotype and resemble alternatively activated macrophages. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 122, n. 3, p. 359-369, Sep. 2004.
93. Charrow J, Esplin JA, Gribble TJ, Kaplan P, Kolodny EH, Pastores GM, Scott CR, Wappner RS, Weinreb NJ, Wisch JS. Gaucher disease: recommendations on diagnosis, evaluation and monitoring. *Archives of Internal Medicine*, v. 158, n. 16, p. 1754-1760, Sep. 1998.
94. Mistry PK, Smith SJ, Ali M, Hatton CS, McIntyre N, Cox TM. Genetic diagnosis of Gaucher's disease. *Lancet*, v. 339, n. 8798, p. 889-92, Apr. 1992.
95. Abrahamov A, Elstein D, Gross-Tsur V, Farber B, Glaser Y, Hadas-Halpern I, Ronen S, Tafakjdi M, Horowitz M, Zimran A. Gaucher's disease variant characterised by progressive calcification of heart valves and unique genotype. *Lancet*, v. 346, n. 8981, p. 1000-1003, Oct. 1995.
96. Wenstrup RJ, Roca-Espiau M, Weinreb NJ, Bembi B. Skeletal aspects of Gaucher disease: a review. *British Journal of Radiology*, v. 75, Suppl 1, p. 2-12, 2002.
97. Pastores GM, Patel MJ, Firooznia H. Bone and joint complications related to Gaucher disease. *Current Rheumatology Reports*, v. 2, n. 2, p. 175-180, Apr. 2000
98. Levin, B. Gaucher's disease. Clinical and roentgenologic manifestations. *American Journal of Roentgenology, Radium Therapy And Nuclear Medicine*, v. 85, p. 685-696, Apr. 1961.
99. Stowens DW, Teitelbaum SI, Kahn AJ, Barranger JA. Skeletal complications of Gaucher disease. *Medicine (Baltimore)*, v. 64, n. 5, p. 310-322, Sep. 1985.
100. Aerts JM, Van Breemen MJ, Bussink AP, Ghauharali K, Sprenger R, Boot RG, Groener JE, Hollak CE, Maas M, Smit S, Hoefsloot HC, Smilde AK, Vissers JP, De Jong S, Speijer D, De Koster CG. Biomarkers for lysosomal storage disorders: identification and application as exemplified by chitotriosidase in Gaucher disease. *Acta Paediatrica Supplement*, v. 97, n. 457, p. 7-14, Apr. 2008.

101. Poll LW, Koch JA, Willers R, Aerts H, Scherer A, Häussinger D, Mödder U.; Vom Dahl S. Correlation of bone marrow response with hematological.; biochemical.; and visceral responses to enzyme replacement therapy of nonneuronopathic (type 1) Gaucher disease in 30 adult patients. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, v. 28, n. 2, p. 209-220, Mar./Apr. 2002.
102. Hollak C, Maas M, Akkerman E, Den Heeten A, Aerts H. Dixon quantitative chemical shift imaging is a sensitive tool for the evaluation of bone marrow responses to individualized doses of enzyme supplementation therapy in type 1 Gaucher disease. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, v. 27, n. 6, p. 1005-1012, 2001.
103. Hollak CE, Van Weely S, Van Oers MH, Aerts JM. Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease. *Journal of Clinical Investigation*, v. 93, n. 3, p. 1288-1292, Mar. 1994.
104. Hollak CE, Maas M, Aerts JM. Clinically relevant therapeutic endpoints in type I Gaucher disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, v. 24, Suppl 2, p. 97-105, 2001.
105. Boot RG, Renkema GH, Verhoek M, Strijland A, Blik J. De Meulemeester TM, Mannens MM, Aerts JM. The human chitotriosidase gene. Nature of inherited enzyme deficiency. *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, n. 40, p. 25680-25685, Oct. 1998.
106. Cohen LA, Gutierrez L, Weiss A, Leichtmann-Bardoogo Y, Zhang DL, Crooks DR, Sougrat R, Morgenstern A, Galy B, Hentze MW, Lazaro FJ, Rouault TA, Meyron-Holtz EG. Serum ferritin is derived primarily from macrophages through a nonclassical secretory pathway. *Blood*, v. 116, n. 9, p. 1574-1584, Sep. 2010.
107. Cabrera-Salazar MA, O'rourke E, Henderson N, Wessel H, Barranger JÁ. Correlation of surrogate markers of Gaucher disease. Implications for long-term follow up of enzyme replacement therapy. *Clinica Chimica Acta*, v. 344, n. 1-2, p. 101-107, Jun. 2004.
108. Stirnemann J, Belmatoug N, Vincent C, Fain O, Fantin B, Mentré F. Bone events and evolution of biologic markers in Gaucher disease before and during treatment. *Arthritis Research & Therapy*, v. 12, n. 4, 2010.
109. Barton NW, Brady RO, Dambrosia JM, Di Bisceglie AM, Doppelt SH, Hill SC, Mankin HJ, Murray GJ, Parker RI, Argoff CE. Replacement therapy for inherited enzyme deficiency--macrophage-targeted glucocerebrosidase for Gaucher's disease. *New England Journal of Medicine*, v. 324, n. 21, p. 1464-1470, May 1991.
110. Casal JÁ, Lacerda L, Pérez LF, Pinto RA, Clara Sá Miranda M, Carlos Tutor J. Relationships between serum markers of monocyte/macrophage activation in type 1 Gaucher's disease. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, v. 40, n. 1, p. 52-55, Jan. 2002.

111. Stein P, Yu H, Jain D, Mistry PK. Hyperferritinemia and iron overload in type 1 Gaucher disease. *American Journal of Hematology*, v. 85, n. 7, p. 472-476, Jul. 2010.
112. Weinreb NJ, Aggio MC, Andersson HC, Andria G, Charrow J, Clarke JT, Erikson A, Giraldo P, Goldblatt J, Hollak C, Ida H, Kaplan P, Kolodny EH, Mistry P, Pastores GM, Pires R, Prakash-Cheng A, Rosenbloom BE, Scott CR, Sobreira E, Tylki-Szymańska A, Vellodi A, Vom Dahl S, Wappner RS, Zimran A, International Collaborative Gaucher Group (ICGG). Gaucher disease type 1: revised recommendations on evaluations and monitoring for adult patients. *Seminars in Hematology*, v. 41, n. 4, Suppl 5, p. 15-22, Oct. 2004.
113. Drugan C, Jebeleanu G, Grigorescu-Sido P, Caillaud C, Craciun AM. Biochemical markers of bone turnover as tools in the evaluation of skeletal involvement in patients with type 1 Gaucher disease. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, v. 28, n. 1, p. 13-20, Jan./Feb. 2002.
114. Ciana G, Martini C, Leopaldi A, Tamaro G, Katouzian F, Ronfani L, Bembì B. Bone marker alterations in patients with type 1 Gaucher disease. *Calcified Tissue International*, v. 72, n. 3, p. 185-189, Mar. 2003.
115. Guggenbuhl P, Grosbois B, Chalès G. Gaucher disease. *Joint Bone Spine*, v. 75, n. 2, p. 116-124, Mar. 2008.
116. Gross ML. Ethics, policy and rare genetic disorders: the case of Gaucher disease in Israel. *Theoretical Medicine and Bioethics*, v. 23, n. 2, p. 151-170, 2002.
117. Beutler E. Gaucher disease: multiple lessons from a single gene disorder. *Acta Paediatrica Supplement*, v. 95, n. 451, p. 103-109, Apr. 2006.
118. BRASIL. Ministério da Saúde. *Portaria Nº 1.266*, de 14 de novembro de 2014. Disponível em:
<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2014/prt1266_14_11_2014.html>. Acesso em: 15 maio 2015.
119. Zimran A, Elstein D. Gaucher disease and the clinical experience with substrate reduction therapy. *Philosophical transactions of the Royal Society of London, Biological sciences*, v. 358, n. 1433, p. 961-966, May 2003.
120. Schmitz J, Poll LW, Vom Dahl S. Therapy of adult Gaucher disease. *Haematologica*, v. 92, n. 2, p. 148-152, Feb. 2007.
121. Starzyk K, Richards S, Yee J, Smith SE, Kingma W. The long-term international safety experience of imiglucerase therapy for Gaucher disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, v. 90, n. 2, p. 157-163, Feb. 2007.
122. Mistry P, Germain DP. Therapeutic objectives in Gaucher disease. *La Revue de Médecine Interne*, v. 28, Suppl 2, p. 171-175, Oct. 2007.

123. Pastores GM. Recombinant glucocerebrosidase (imiglucerase) as a therapy for Gaucher disease. *Biodrugs*, v. 24, n. 1, p. 41-47, Feb. 2010
124. Zimran A. Velaglucerase alfa: a new option for Gaucher disease treatment. *Drugs Today (Barc)*, v. 47, n. 7, p. 515-529, Jul. 2011.
125. Zimran A, Brill-Almon E, Chertkoff R, Petakov M, Blanco-Favela F, Muñoz ET, Solorio-Meza SE, Amato D, Duran G, Giona F, Heitner R, Rosenbaum H, Giraldo P, Mehta A, Park G, Phillips M, Elstein D, Altarescu G, Szleifer M, Hashmueli S, Aviezer D. Pivotal trial with plant cell-expressed recombinant glucocerebrosidase.; taliglucerase alfa.; a novel enzyme replacement therapy for Gaucher disease. *Blood*, v. 118, n. 22, p. 5767-5773, Nov. 2011.
126. Hollak CE. An evidence-based review of the potential benefits of taliglucerase alfa in the treatment of patients with Gaucher disease. *Core Evidence*, v. 7, p. 15-20, 2012.
127. Pastores GM, Rosenbloom B, Weinreb N, Goker-Alpan O, Grabowski G, Cohn GM, Zahrieh D. A multicenter open-label treatment protocol (HGT-GCB-058) of velaglucerase alfa enzyme replacement therapy in patients with Gaucher disease type 1: safety and tolerability. *Genetics in Medicine*, v. 16, n. 5, p. 359-366, May 2014.
128. Grabowski GA, Barton NW, Pastores G, Dambrosia JM, Banerjee TK, Mckee M A, Parker C, Schiffmann R, Hill SC, Brady RO. Enzyme therapy in type 1 Gaucher disease: comparative efficacy of mannose-terminated glucocerebrosidase from natural and recombinant sources. *Annals of Internal Medicine*, v. 122, n. 1, p. 33-39, Jan. 1995.
129. Zimran A, Elstein D. Gaucher disease and the clinical experience with substrate reduction therapy. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series Biological sciences*. 2003;358(1433), p. 961-6.
130. Weinreb NJ, Charrow J, Andersson HC, Kaplan P, Kolodny EH, Mistry P, Pastores G, Rosenbloom BE, Scott CR, Wappner RS, Zimran A. Effectiveness of enzyme replacement therapy in 1028 patients with type 1 Gaucher disease after 2 to 5 years of treatment: a report from the Gaucher Registry. *American Journal of Medicine*, v. 113, n. 2, p. 112-119, Aug. 2002.
131. Andersson H, Kaplan P, Kacena K, Yee J. Eight-year clinical outcomes of long-term enzyme replacement therapy for 884 children with Gaucher disease type 1. *Pediatrics*, v. 122, n. 6, p. 1182-1190, Dec. 2008.
132. Cox T, Lachmann R, Hollak C, Aerts J, Van Weely S, Hrebíček M, Platt F, Butters T, Dwek R, Moyses C, Gow I, Elstein D, Zimran A. Novel oral treatment of Gaucher's disease with N-butyldeoxynojirimycin (OGT 918) to decrease substrate biosynthesis. *Lancet*, v. 355, n. 9214, p. 1481-5, Apr. 2000.
133. Schiffmann R, Mankin H, Dambrosia JM, Xavier RJ, Kreps C, Hill SC, Barton N. W, Rosenthal DI. Decreased bone density in splenectomized Gaucher patients

receiving enzyme replacement therapy. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, v. 28, n. 2, p. 288-96, Mar./Apr. 2002.

134. Zimran A, Altarescu G, Phillips M, Attias D, Jmoudiak M, Deeb M, Wang N, Bhirangi K, Cohn GM, Elstein D Phase 1/2 and extension study of velaglucerase alfa replacement therapy in adults with type 1 Gaucher disease: 48-month experience. *Blood*, v. 115, n. 23, p. 4651-6, Jun. 2010.
135. Anderson LJ, Henley W, Wyatt KM, Nikolaou, V, Hughes DA, Waldek S, Logan S. Long-term effectiveness of enzyme replacement therapy in adults with Gaucher disease: results from the NCS-LSD cohort study. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, v. 37, n. 6, p. 953-960, Nov. 2014.
136. Rodrigue SW, Rosenthal DI; Barton NW, Zurakowski D, Mankin HJ. Risk factors for osteonecrosis in patients with type 1 Gaucher's disease. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, n. 362, p. 201-207, May 1999.
137. Deegan PB, Pavlova E, Tindall J, Stein PE, Bearcroft P, Mehta A, Hughes D, Wraith JE, Cox TM. Osseous manifestations of adult Gaucher disease in the era of enzyme replacement therapy. *Medicine (Baltimore)*, v. 90, n. 1, p. 52-60, Jan. 2011.
138. Rosenthal DI, Scott JA, Barranger J, Mankin HJ, Saini S, Brady TJ, Osier LK, Doppelt S. Evaluation of Gaucher disease using magnetic resonance imaging. *J. Bone Joint Surg Am.*, v. 68, n. 6, p. 802-808, Jul. 1986.
139. Charrow J, Dulisse B, Grabowski GA, Weinreb NJ. The effect of enzyme replacement therapy on bone crisis and bone pain in patients with type 1 Gaucher disease. *Clinical Genetics*, v. 71, n. 3, p. 205-211, 2007.
140. Sims KB, Pastores GM, Weinreb NJ, Barranger J, Rosenbloom BE, Packman S, Kaplan P, Mankin H, Xavier R, Angell J, Fitzpatrick MA, Rosenthal D. Improvement of bone disease by imiglucerase (Cerezyme) therapy in patients with skeletal manifestations of type 1 Gaucher disease: results of a 48-month longitudinal cohort study. *Clinical Genetics*, v. 73, n. 5, p. 430-440, 2008.
141. Piran S, Amato D. Gaucher disease: a systematic review and meta-analysis of bone complications and their response to treatment. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, v. 33, n. 3, p. 271-279, Jun. 2010.
142. Zimran A, Loveday K, Fratazzi C, Elstein D. A pharmacokinetic analysis of a novel enzyme replacement therapy with Gene-Activated human glucocerebrosidase (GA-GCB) in patients with type 1 Gaucher disease. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, v. 39, n. 1, p. 115-118, Jul./Aug. 2007.
143. Nature News Blog. *First plant-made drug on the market*. Disponível em: <<http://blogs.nature.com/news/2012/05/first-plant-made-drug-on-the-market.html>>. Acesso em: 15 maio 2015.

144. US. Food and Drug Administration. Supplement approval fulfillment of postmarketing requirement - for Eleyso (Taliglucerase Alfa). *Services Dohah*, 2014. Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/applletter/2014/022458Orig1s003,022458Orig1s006ltr.pdf>. Acesso em: 15 maio 2015.
145. BRASIL. Ministério da Saúde. Alfataliglicerase para o tratamento da Doença de Gaucher. *Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos*. Disponível em: <http://conitec.gov.br/images/Artigos_Publicacoes/Alfataliglicerase-Gaucher_FINAL.pdf>. Acesso em: 15 maio 2015.
146. Abian O, Alfonso P, Velazquez-Campoy A, Giraldo P, Pocovi M, Sancho J. Therapeutic strategies for Gaucher disease: miglustat (NB-DNJ) as a pharmacological chaperone for glucocerebrosidase and the different thermostability of velaglucerase alfa and imiglucerase. *Molecular Pharmaceutics*, v. 8, n. 6, p. 2390-2397, Dec. 2011.
147. Alfonso P, Pampín S, Estrada J, Rodríguez-Rey JC, Giraldo P, Sancho J, Pocoví M. Miglustat (NB-DNJ) works as a chaperone for mutated acid beta-glucosidase in cells transfected with several Gaucher disease mutations. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, v. 35, n. 2, p. 268-276, Sep./Oct. 2005.
148. Lukina E, Watman N, Dragosky M, Pastores GM, Arreguin EA, Rosenbaum H, Zimran A, Angell J, Ross L, Puga AC, Peterschmitt JM. Eliglustat.; an investigational oral therapy for Gaucher disease type 1: Phase 2 trial results after 4 years of treatment. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, v. 53, n. 4, p. 274-276, Dec. 2014.
149. Cox TM, Drellichman G, Cravo R, Balwani M, Burrow TA, Martins AM, Lukina E, Rosenbloom B, Ross L, Angell J, Puga AC. Eliglustat compared with imiglucerase in patients with Gaucher's disease type 1 stabilised on enzyme replacement therapy: a phase 3.; randomised.; open-label.; non-inferiority trial. *Lancet*. 2015 Jun 13;385(9985), p. 2355-62.
150. Desnick RJ, Schuchman EH. Enzyme replacement and enhancement therapies: lessons from lysosomal disorders. *Nature Reviews Genetics*, v. 3, n. 12, p. 954-966, Dec. 2002.
151. Futerman AH, Sussman JL, Horowitz M, Silman I, Zimran A. New directions in the treatment of Gaucher disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 25, n. 3, p. 147-151, Mar. 2004.
152. Connock M, Burls A, Frew E, Fry-Smith A, Juarez-Garcia A, McCabe C, Wailoo A, Abrams K, Cooper N, Sutton A, O'hagan A, Moore D. The clinical effectiveness and cost-effectiveness of enzyme replacement therapy for Gaucher's disease: a systematic review. *Health Technology Assessment*, v. 10, n. 24, p. 3-136, Jul. 2006.
153. Connock M, Juarez-Garcia A, Frew E, Mans A, Dretzke J, Fry-Smith A, Moore D. A systematic review of the clinical effectiveness and cost-effectiveness of

enzyme replacement therapies for Fabry's disease and mucopolysaccharidosis type 1. *Health Technology Assessment*, v. 10, n. 20, p. 3-113, Jun. 2006.

154. Rosenbloom BE, Weinreb NJ, Zimran A, Kacena KA, Charrow J, Ward E. Gaucher disease and cancer incidence: a study from the Gaucher Registry. *Blood*, v. 105, n. 12, p. 4569-4572, Jun. 2005.
155. De Fost M, Vom Dahl S, Weverling GJ, Brill N, Brett S, Häussinger D, Hollak CE. Increased incidence of cancer in adult Gaucher disease in Western Europe. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, v. 36, n. 1, p. 53-58, Jan./Feb. 2006.
156. Landgren O, Turesson I, Gridley G, Caporaso NE. Risk of malignant disease among 1525 adult male US Veterans with Gaucher disease. *Archives of Internal Medicine*, v. 167, n. 11, p. 1189-1194, Jun. 2007.
157. Wine E, Yaniv I, Cohen IJ. Hyperimmunoglobulinemia in pediatric-onset type 1 Gaucher disease and effects of enzyme replacement therapy. *Journal of Pediatric Hematology and Oncology*, v. 29, n. 7, p. 451-457, Jul. 2007.
158. Brautbar A, Elstein D, Pines G, Abrahamov A, Zimran A. Effect of enzyme replacement therapy on gammopathies in Gaucher disease. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, v. 32, n. 1, p. 214-217, Jan./Feb. 2004.
159. Langeveld M, De Fost M, Aerts JM, Sauerwein HP, Hollak CE. Overweight.; insulin resistance and type II diabetes in type I Gaucher disease patients in relation to enzyme replacement therapy. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, v. 40, n. 3, p. 428-432, May/Jun. 2008.
160. Langeveld M, Endert E, Wiersinga WM, Aerts JM, Hollak, CE. Hypermetabolism in Gaucher disease type I is not associated with altered thyroid hormone levels. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, v. 30, n. 6, Nov. 2007.
161. Taddei TH, Dziura J, Chen S, Yang R, Hyogo H, Sullards C, Cohen DE, Pastores G, Mistry PK. High incidence of cholesterol gallstone disease in type 1 Gaucher disease: characterizing the biliary phenotype of type 1 Gaucher disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, v. 33, n. 3, p. 291-300, Jun. 2010.
162. De Fost M, Langeveld M, Franssen R, Hutten BA, Groener JE, De Groot E, Mannens MM, Bikker H, Aerts JM, Kastelein JJ, Hollak CE. Low HDL cholesterol levels in type I Gaucher disease do not lead to an increased risk of cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, v. 204, n. 1, p. 267-72, May 2009. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2008.08.027.
163. Rosenbaum H, Sidransky E. Cholelithiasis in patients with Gaucher disease. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, v. 28, n. 1, p. 21-27, Jan./Feb. 2002.

164. Packman W, Wilson Crosbie T, Riesner A, Fairley C, Packman S. Psychological complications of patients with Gaucher disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, v. 29, n. 1, p. 99-105, Feb. 2006.
165. Evans MI, Galen RS, Britt DW. Principles of screening. *Seminars in Perinatology*, v. 29, n. 6, p. 364-366, Dec. 2005.
166. Civallero G, Michelin K, De Mari J, Viapiana M, Burin M, Coelho JC, Giugliani R. Twelve different enzyme assays on dried-blood filter paper samples for detection of patients with selected inherited lysosomal storage diseases. *Clinica Chimica Acta*, v. 372, n. 1-2, p. 98-102, Oct. 2006.
167. Chamoles NA, Blanco M, Gaggioli D, Casentini C. Gaucher and Niemann-Pick diseases--enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper: retrospective diagnoses in newborn-screening cards. *Clinica Chimica Acta*, v. 317, n. 1-2, p. 191-197, Mar. 2002.
168. Beiguelman B. Genética de Populações Humanas. *Sociedade Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, São Paulo: Sociedade Brasileira de Genética Médica, 2008. 235 p. Disponível em: <http://media.wix.com/ugd/b703be_159e8feebd6149c7b27fa8dde1bc8d52.pdf> Acesso em 5 maio 2015.
169. BIBLIOTECA Virtual em Saúde. *DeCS – Descritores em Ciências da Saúde*. Disponível em: <<http://decs.bvs.br/cgi-bin/wxis1660.exe/decserver/>>. Acesso em: 5 maio 2015.
170. Thompson EA, Neel JV. Private polymorphisms: how many? How old? How useful for genetic taxonomies? *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 5, n. 1, p. 220-231, Feb. 1996.
171. Slatkin M. A population-genetic test of founder effects and implications for Ashkenazi Jewish diseases. *American Journal of Human Genetics*, v. 75, n. 2, p. 282-293, Aug. 2004.
172. Bittles AH. Endogamy.; consanguinity and community disease profiles. *Community Genetics*, v. 8 n. 1, p. 17-20, 2005.
173. Haldane JBS, Moshinsky P. Inbreeding in Mendelian populations with special reference to human cousin marriage. *Annals of Eugenics*, 9., p. 321-340.
174. Hajnal J. Concepts Of Random Mating And The Frequency Of Consanguineous Marriages. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, v. 159, p. 125-177, Dec. 1963.
175. Freire-Maia N, Freire-Maia A. The structure of consanguineous marriages and its genetic implications. *Annals of Human Genetics*, v. 25, p. 29-39, May 1961.

176. Agostini JM, Nasser CM. Consanguineous marriages in the archdiocese of Florianópolis.; South Brazil. *Revista Brasileira de Genética IX*, v. 9, n. 3, p. 479-486, 1986.
177. Richards B, Skoletsky J, Shuber AP, Balfour R, Stern RC, Dorkin HL, Parad RB, Witt D, Klinger KW. Multiplex PCR amplification from the CFTR gene using DNA prepared from buccal brushes/swabs. *Human Molecular Genetics*, v. 2, n. 2, p. 159-163, Feb. 1993.
178. Devost NC, Choy FY. Mutation analysis of Gaucher disease using dot-blood samples on FTA filter paper. *American Journal of Medical Genetics*, v. 94, n. 5, p. 417-420, Oct. 2000.
179. VIEIRA VMG. *Os Gadelhas no Mundo*. 2000. Disponível em: <<http://www.gentree.org.br/artigos/gadelha.html>>. Acesso em: 25 jul. 2009.
180. Amaral O, Marcão A, Sá Miranda M, Desnick RJ, Grace ME. Gaucher disease: expression and characterization of mild and severe acid beta-glucosidase mutations in Portuguese type 1 patients. *European Journal of Human Genetics*, v. 8, n. 2, p. 95-102, Feb. 2000.
181. Amaral O, Lacerda L, Marcão A, Pinto E, Tamagnini G, Sá Miranda MC. Homozygosity for two mild glucocerebrosidase mutations of probable Iberian origin. *Clinical Genetics*, v. 56, n. 1, p. 100-102, Jul. 1999.
182. Perić, Z, Kardum-Skelin I, Puskarić BJ, Letilović T, Vrhovac R, Jaksić B. An unusual presentation of Gaucher's disease: aortic valve fibrosis in a patient homozygous for a rare G377S mutation. *Collegium Antropologicum*, v. 34, n. 1, p. 275-278, Mar. 2010.