

Biomarcadores nas doenças lisossomais de sobrecarga: o que são e o que nos dizem?

Biomarkers in lysosomal storage disorders: what do they tell us?

Paulo Gaspar¹, Hugo Rocha¹, Raquel Neiva¹, Olga Azevedo², Tabita Maia³, Patrício Aguiar⁴, Teresa Cardoso⁵, Paulo Chaves⁵, Sandra Alves⁶, Laura Vilarinho^{1,6}

laura.vilarinho@insa.min-saude.pt

(1) Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Porto, Portugal

(2) Departamento de Cardiologia. Centro de Referência em Doenças Lisossomais de Sobrecarga, Hospital Senhora da Oliveira, Guimarães, Portugal

(3) Departamento de Hematologia Clínica, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal

(4) Centro de Referência de Doenças Hereditárias do Metabolismo, Centro Hospitalar e Universitário de Lisboa Norte, Lisboa, Portugal

(5) Centro de Referência de Doenças Hereditárias do Metabolismo, Centro Hospitalar Universitário do S. João, Porto, Portugal

(6) Unidade de Investigação e Desenvolvimento. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Porto, Portugal

_Resumo

As Doenças Lisossomais de Sobrecarga (DLSs) são um conjunto de patologias raras, crónicas, multissistémicas com modo de apresentação e gravidade muito variáveis. No seu conjunto afetam aproximadamente 1:5000 nados vivos e são causadas pela acumulação de metabolitos não degradados no interior do lisossoma. As esfingolipidoses são o grupo de DLS com maior prevalência e incluem a doença de Gaucher, a doença de Fabry e a doença de Niemann-Pick. Por vezes, parte do produto primário de acumulação, através de uma reação de desacilação, é convertido na respetiva base esfingóide, que se encontra bastante elevada em casos de patologia. Em alguns doentes, estes compostos já se encontram aumentados, mesmo antes do aparecimento dos primeiros sintomas. Os tratamentos disponíveis para estas patologias (terapia de substituição enzimática, terapia de redução de substrato de chaperones farmacológicos) conduzem a um decréscimo da concentração destas bases esfingóides, tornando o doseamento destes compostos útil também para aferir a eficácia da terapêutica utilizada. Pela primeira vez em Portugal, é disponibilizado o estudo destes biomarcadores para as DLSs, através da tecnologia de espectrometria de massa em *tandem* (MS/MS). Os autores apresentam os resultados obtidos do doseamento destes lisólípidos em diferentes doentes de DLSs, com a clara demonstração da especificidade destes biomarcadores, permitindo um diagnóstico atempado, um melhor conhecimento da evolução da doença e monitorização da eficácia do respetivo tratamento.

_Abstract

More than 50 inherited lysosomal storage disorders (LSDs) are presently known. They are a group of rare, multisystemic diseases with a variable presentation. Most are the result of an impairment of a catabolic enzyme, leading to the accumulation of the corresponding specific substrate(s) and subsequent pathology. LSDs are individually rare diseases, but as group they affect about 1 in 5,000 live births. The sphingolipidoses are due to deficiencies in the enzymes needed for lysosomal degradation of sphingolipid substrates and constitute the most prevalent group, where Gaucher, Fabry and Niemann-Pick diseases are included. In these disorders, the primary product of storage is deacylated into the respective sphingoid bases. In some cases, these products are already increa-

sed before the appearance of the first symptoms making them important for an early diagnosis. The available treatments for these pathologies can lead to the decrease of these sphingoid bases, raising the possibility of using them for treatment follow-up. For the first time in Portugal, it is available the study of several biomarkers for LSDs, through the technology of liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). The authors present the results of the measurement of these sphingoid bases in several LSD patients, showing a clear specificity of these biomarkers, allowing an early diagnosis, a better knowledge of the natural history of the disease and a evaluation of the efficacy of the treatment.

_Introdução

As doenças hereditárias do metabolismo, são um conjunto de patologias de origem genética, em que ocorrem alterações na correta degradação ou síntese de certos metabolitos celulares. Embora individualmente raras, globalmente são um grupo bastante grande e heterogéneo, responsável por uma morbidade e mortalidade significativas (1). As doenças Lisossomais de Sobrecarga (DLSs), um importante grupo das doenças hereditárias do metabolismo, são patologias crónicas, multissistémicas, com modo de apresentação e gravidade muito variáveis. No seu conjunto afetam aproximadamente 1:5000 nados-vivos e são causadas pela acumulação de produtos não degradados no interior do lisossoma, consequência de distintas deficiências enzimáticas (2). As esfingolipidoses são o grupo de DLS com maior prevalência e incluem a doença de Gaucher, a doença de Fabry e a doença de Niemann-Pick (2,3). Na doença de Gaucher, ocorre a acumulação de glucosilceramida devido à deficiência



enzimática em β -glucocerebrosidase e no caso da doença de Fabry, devido a um déficit enzimático em α -galactosidase A, ocorre a acumulação em globotriosilceramida. Na doença de Nieman-Pick tipo AB, ocorre a acumulação de esfingomieli-
na ácida, devido a uma deficiência da enzima esfingomieli-
nase, enquanto na doença de Niemann-Pick tipo C, verifica-se a acumulação de colesterol dentro dos lisossomas, em resul-
tado da deficiência das proteínas a NPC1 e/ou NPC2 codifi-
cadas por dois genes diferentes, *NPC1* e *NPC2* e envolvidas
no tráfego de colesterol (4). No que diz respeito aos sintomas,
a doença de Gaucher é caracterizada por hepatoesplenome-
galia, anemia e trombocitopenia, a doença de Fabry por into-
lerância ao exercício, angioqueratomas, acroparestesias e
pode apresentar ainda envolvimento cardíaco e/ou renal (5,6).
A doença de Niemann-Pick, tem o tipo A, caracterizado por
ser a forma mais severa com grande comprometimento neu-
rológico, sendo fatal entre os 2-3 anos de vida. No tipo B,
forma não neurológica ou visceral, apresenta envolvimento
respiratório, hepático e cardíaco. O tipo C, é a forma mais
frequente da doença de Niemann-Pick e apresenta um com-
prometimento neurológico, com atraso do desenvolvimento
motor e mental (4). O tratamento destas patologias é atual-
mente efetuado através da utilização de terapia de substitui-
ção enzimática para as doenças de Gaucher e de Fabry, de
terapia de redução de substrato para as doenças de Gaucher
e de Nieman-Pick tipo C ou utilizando chaperones farma-
cológicos para alguns casos da doença de Fabry (7). O diag-
nóstico destas patologias realiza-se através da determinação
da respetiva atividade enzimática ou da quantificação dos
substratos acumulados, específicos para cada uma das pato-
logias (8-10). No entanto, a falta de biomarcadores mais sen-
síveis e universalmente aceites, torna difícil, por um lado o
diagnóstico assim como o seu *follow-up*. Exemplo disso, é o
doseamento dos níveis da enzima quitotriosidase, usada na
monitorização da doença de Gaucher, que se encontra igual-
mente elevada em outras patologias, a sua correlação com
o nível de severidade é discutível e cerca de 5-10% da popu-
lação é homozigótica para uma duplicação de 24bp no gene
que codifica a quitotriosidase, conduzindo a uma inatividade
da enzima, o que torna inviável a sua utilização como biomar-
cador da doença nestes indivíduos (11,12). No entanto, parte

dos produtos primários de acumulação são convertidos em
novos compostos, através de uma reação de desacetilação,
que se encontram cerca de 10-1000x aumentados no san-
gue destes doentes. São exemplo disso a glucosilesfingosina
(LysoGl1) para a doença de Gaucher, a globotriosilesfingo-
sina (LysoGb3) para a doença de Fabry, a lisoesfingomieli-
na (LysoSM) para a doença de Niemann Pick, tipo AB e a
lisoesfingomieli-509 (LysoSM-509), análogo carboxilado
da LysoSM, para a doença de Niemann-Pick tipo C (13-16)
(quadro 1).

Em alguns casos, estes compostos já se encontram aumenta-
dos, mesmo antes do aparecimento dos primeiros sintomas.
Pela primeira vez em Portugal, é disponibilizado o estudo des-
tes biomarcadores para as DLSs, através da tecnologia de es-
pectrometria de massa em *tandem* (MS/MS). Uma reduzida
quantidade de amostra é suficiente para quantificação destes
metabolitos e diagnóstico destas patologias. A disponibiliza-
ção desta metodologia permite um diagnóstico atempado, um
melhor conhecimento da evolução da doença e monitorização
da eficácia do respetivo tratamento.

Quadro 1: ⬇ Doenças Lisossomais de Sobrecarga e respetivos biomarcadores.

Doença Lisossomal de Sobrecarga	Biomarcador
Doença de Fabry	LysoGb3 (Globotriosilesfingosina)
Doença de Gaucher	LysoGl1 (Glucosilesfingosina)
Doença de Niemann-Pick, tipo AB	LysoSM (Lisoesfingomieli- na)
Doença de Niemann-Pick, tipo C	LysoSM-509 (Lisoesfingomieli- na - 509)

_Objetivo

Apresentar os resultados obtidos num estudo de biomar-
cadores para as Doenças Lisossomais de Sobrecarga (DLSs)
em Portugal, nomeadamente do doseamento destes lisolí-
pidos em diferentes doentes DLSs, demonstrando a espe-
cificidade destes biomarcadores para o diagnóstico, o
conhecimento da evolução da doença e a monitorização da
eficácia do respetivo tratamento.



_Doentes e métodos

Doentes

A análise foi efetuada em amostras de plasma de doentes com suspeita das DLSs acima referidas ou em doentes já identificados com o objetivo de realizar a monitorização da eficácia terapêutica. As amostras rececionadas eram provenientes de vários centros hospitalares de Portugal.

Métodos

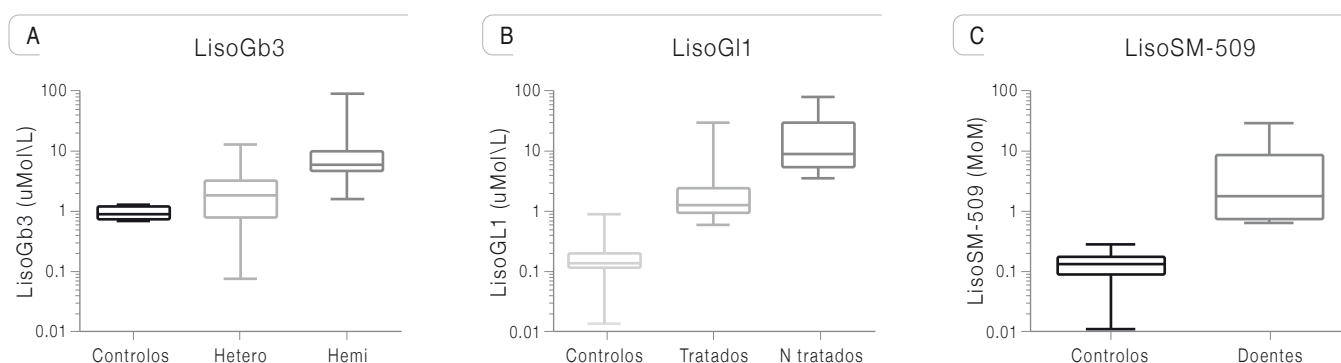
A quantificação dos biomarcadores faz-se através da tecnologia de espectrometria de massa em *tandem* (MS/MS), como previamente descrito (17,18). Resumidamente, o padrão interno (IS), lisolactosilceramida é adicionado a todas as amostras para posterior quantificação dos lisolípidos. Após precipitação da proteína com clorofórmio:methanol, os lisolípidos são extraídos numa mistura de clorofórmio:metanol:água. O *pellet* previamente seco sob corrente de azoto, é reconstituído em metanol e analisado por LC-MS/MS, num 4000QTRAP (SCIEX). A quantificação dos diferentes lisolípidos é feita com recurso ao IS adicionado no início.

_Resultados

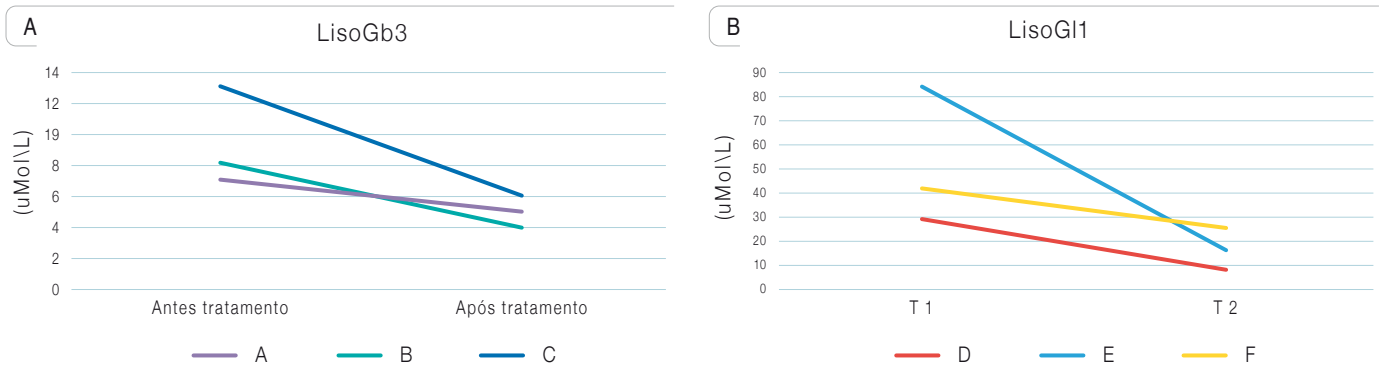
Os denominados lisolípidos são compostos fisiológicos, residuais na população em geral. O seu aparecimento ocorre quando se verifica uma interrupção na cadeia catabólica de um determinado lípido. No caso da doença de Fabry, verifica-se a acumulação de liso-globotriosilceramida

(LisoGb3), proveniente da desacetilação da globotriosilceramida (gráfico 1A). Como se trata de uma doença de transmissão ligada ao cromossoma X, as mulheres podem apresentar desde valores elevados a valores perfeitamente normais, tal como acontece com a atividade enzimática da enzima responsável pela patologia, a α -galactosidase A. No entanto, os homens afetados, apresentam valores aumentados de LisoGb3. No gráfico 1A, encontram-se representados os controlos, os doentes do género feminino e masculino em tratamento. A grande maioria dos doentes apresentados, já se encontram em terapia, tendo apenas valores ligeiramente aumentados, sendo um bom indicador da eficácia da terapia, uma vez que quando foram diagnosticados, apresentavam valores bastante elevados. No gráfico 2A, encontra-se representados formas tardias, da doença de Fabry, onde se verifica a redução do biomarcador LisoGb3 com o tratamento. No caso da doença de Gaucher, a acumulação da glucosilceramida, conduz a um aumento do LisoGl1 (gráfico 1B), patognomónico desta patologia. Verifica-se uma correlação entre o biomarcador e o fenótipo apresentado, sendo o valor mais elevado quanto mais grave for o seu fenótipo e por outro lado, quanto mais eficaz for o seu tratamento, menor será o valor de LisoGl1. No gráfico 2B verifica-se a redução do LisoGl1, entre monitorizações anuais, em três doentes de Gaucher em tratamento. No que diz respeito aos doentes de Niemann-Pick, tipo AB, e aos valores de LisoSM, verifica-se a mesma tendência como os demais biomarcadores. O LisoSM-509, usado para a dete-

Gráfico 1: Valores dos diferentes biomarcadores LisoGb3 (A), LisoGl1 (B) e LisoSM-509 (C) em controlos e doentes de Gaucher, Fabry e Niemann-Pick tipo C, respetivamente.



Hetero: Mulheres; Hemi: Homens; N tratados: antes de iniciar o tratamento; Doentes: Doentes de NPC; MoM: Média da mediana

**Gráfico 2:** ↓ Valores de LisoGb3 (A) e LisoGl1 (B) em três doentes de Fabry (A, B e C) e Gaucher (C, D e E), respetivamente.

Hetero: Mulheres; Hemi: Homens; N tratados: antes de iniciar o tratamento; Doentes: Doentes de NPC; MoM: Média da mediana

ção e *follow-up* dos doentes de NPC, encontra-se aumentado nestes pacientes (gráfico 2C). Em todos os casos, a presença dos biomarcadores aqui referenciados na circulação sanguínea tem um papel preponderante no curso e evolução da patologia.

_Conclusão

A quantificação dos biomarcadores referidos, através da tecnologia de espectrometria de massa em *tandem* (MS/MS), permite um estudo mais aprofundado das patologias em questão. A disponibilização desta metodologia permite um diagnóstico atempado, uma melhor compreensão da evolução da doença e monitorização da eficácia do respetivo tratamento. A descoberta de novos biomarcadores para outras patologias lisossomais torna-se assim igualmente importante, para o seu estudo e investigação.

Referências bibliográficas:

- (1) Garrod AE. About Alkaptonuria. *Med Chir Trans.* 1902;85:69-78. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2036375/>
- (2) Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, et al. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA.* 1999 20;281(3):249-54. <https://doi.org/10.1001/jama.281.3.249>
- (3) Pinto R, Caseiro C, Lemos M, et al. Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal. *Eur J Hum Genet.* 2004;12(2):87-92. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201044>
- (4) Vanier MT. Niemann-Pick diseases. *Handb Clin Neurol.* 2013;113:1717-21. Review. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-59565-2.00041-1>
- (5) Gary SE, Ryan E, Steward AM, et al. Recent advances in the diagnosis and management of Gaucher disease. *Expert Rev Endocrinol Metab.* 2018;13(2):107-118. <https://doi.org/10.1080/17446651.2018.1445524>
- (6) Mahmud HM. Fabry's disease-a comprehensive review on pathogenesis, diagnosis and treatment. *J Pak Med Assoc.* 2014;64(2):189-94. Review. <https://jpma.org.pk/PdfDownload/5948>
- (7) RRastall DPW, Amalfitano A. Current and Future Treatments for Lysosomal Storage Disorders. *Curr Treat Options Neurol.* 2017;19(12):45. Review. <https://doi.org/10.1007/s11940-017-0481-2>
- (8) Kingma SD, Bodamer OA, Wijburg FA. Epidemiology and diagnosis of lysosomal storage disorders: challenges of screening. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2015;29(2):145-57. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2014.08.004>
- (9) Verma J, Thomas DC, Kasper DC, et al. Inherited metabolic disorders: efficacy of enzyme assays on dried blood spots for the diagnosis of lysosomal storage disorders. *JIMD Rep.* 2017;31:15-27. Epub 2016 Mar 24. https://doi.org/10.1007/8904_2016_548
- (10) Davison J. How to use... white blood cell enzyme assays. *Arch Dis Child Educ Pract Ed.* 2017;102(3):143-147. Epub 2016 Nov 15. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2015-309964>
- (11) Giraldo P, Cenarro A, Alfonso P, et al. Chitotriosidase genotype and plasma activity in patients type 1 Gaucher's disease and their relatives (carriers and non carriers). *Haematologica.* 2001;86(9):977-84. <http://www.haematologica.org/content/86/9/977>
- (12) Barone R, Sotgiu S, Musumeci S. Plasma chitotriosidase in health and pathology. *Clin Lab.* 2007;53(5-6):321-33. Review.
- (13) Aerts JM, Groener JE, Kuiper S, et al. Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(8):2812-7. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712309105>
- (14) Dekker N, van Dussen L, Hollak CE, et al. Elevated plasma glucosylsphingosine in Gaucher disease: relation to phenotype, storage cell markers, and therapeutic response. *Blood.* 2011;118(16):e118-27. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-05-352971>
- (15) Kuchar L, Sikora J, Gulino ME, et al. Quantitation of plasmatic lysosphingomyelin and lysosphingomyelin-509 for differential screening of Niemann-Pick A/B and C diseases. *Anal Biochem.* 2017;525:73-77. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.02.019>
- (16) Patterson MC, Clayton P, Gissen P, et al. Recommendations for the detection and diagnosis of Niemann-Pick disease type C: An update. *Neurol Clin Pract.* 2017;7(6):499-511. <https://doi.org/10.1212/cpj.0000000000000399>
- (17) Polo G, Burlina AP, Ranieri E, et al. Plasma and dried blood spot lysosphingolipids for the diagnosis of different sphingolipidoses: a comparative study. *Clin Chem Lab Med.* 2019;57(12):1863-74. <https://doi.org/10.1515/cclm-2018-1301>
- (18) Mirzaian M, Wisse P, Ferraz MJ, et al. Simultaneous quantitation of sphingoid bases by UPLC-ESI-MS/MS with identical (13)C-encoded internal standards. *Clin Chim Acta.* 2017;466:178-84. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2017.01.014>