

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

VANESSA FERNANDA STATI

**BIOTECNOLOGIA E ERROS INATOS DO
METABOLISMO**

BAURU

2014

VANESSA FERNANDA STATI

**BIOTECNOLOGIA E ERROS INATOS DO
METABOLISMO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Geisiany Maria de Queiroz.

BAURU

2014

Stati, Vanessa Fernanda.

S79768b

Biotecnologia e erros inatos do metabolismo / Vanessa
Fernanda Stati. -- 2014.

45f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Geisiany Maria de Queiroz.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em
Biomedicina) – Universidade do Sagrado Coração – Bauru –
SP.

1. Biotecnologia. 2. Erros inatos do metabolismo. 3.
Terapia de reposição enzimática. 4. Doenças de depósito
lisossômico. I. Queiroz, Geisiany Maria de. II. Título.

VANESSA FERNANDA STATI

BIOTECNOLOGIA E ERROS INATOS DO METABOLISMO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Geisiany Maria de Queiroz.

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Geisiany Maria de Queiroz
Universidade do Sagrado Coração

Prof^a. Dr^a. Cynthia Barbosa Rustiguel
Faculdade de Filosofia, Ciências e
Letras de Ribeirão Preto (USP)

Prof^a. Ms. Vanessa Sato
Faculdade de Filosofia, Ciências e
Letras de Ribeirão Preto (USP)

Bauru, 01 de dezembro de 2014.

Dedico este trabalho aos meus pais e irmã, pela paciência e apoio durante os últimos quatro anos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida, por me conceder saúde, força e fé para superar as dificuldades.

Aos meus professores, todos eles, desde o primário até o ensino superior, obrigada, têm minha eterna gratidão, pelo conhecimento transmitido, amizade e toda dedicação. Em especial, à minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Geisiany Maria de Queiroz, por toda a paciência e carinho durante a elaboração desse trabalho. Tenho certeza que sem você, a minha formação pessoal e profissional não teria sido a mesma.

À Universidade do Sagrado Coração e a todos os funcionários e monitores que sempre estiveram dispostos a ajudar.

Aos meus pais, Iraci e Edilson, por serem minha fonte de inspiração, sabedoria e amor, e por não me deixarem desistir jamais.

À minha irmã Priscila, pelo apoio e incentivo constante.

Aos tios e tias, que sempre estiveram ao meu lado, e com suas palavras e conselhos, me ajudaram a chegar até aqui. Em especial à Iracema, por não medir esforços em me ajudar.

Ao Fellipe, por ter sido companheiro, amigo, anjo e confidente nos últimos anos. Por me dar forças, incentivo e apoio nas horas mais difíceis.

Aos meus amigos, companheiros de trabalhos, irmãos na amizade, e às minhas vizinhas, que fazem parte de minha vida e construíram metade do que sou hoje. Obrigada pelos conselhos, conversas e por toda a história vivida, que não para por aqui.

A todas as pessoas envolvidas, direta ou indiretamente na minha formação. Tenho certeza que cada um acrescentou um pouquinho do que há de bom em minha vida.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

(José de Alencar)

RESUMO

Biotecnologia é a ciência que envolve diversas áreas do conhecimento, sua empregabilidade está vinculada às áreas da saúde, agronomia, indústria alimentícia, dentre tantas outras. Dentre suas aplicações, destaca-se a produção de enzimas que são direcionadas para o tratamento de reposição enzimática em doenças raras, como naquelas relacionadas aos Erros Inatos do Metabolismo (EIM). O objetivo deste estudo foi realizar revisão de literatura, buscando aspectos que envolvam processos biotecnológicos e Erros Inatos do Metabolismo, destacando-se o emprego desses processos no tratamento de doenças lisossômicas, para tanto, realizou-se levantamento bibliográfico em sites científicos. Nota-se que dentre as alterações de EIM, estão àquelas classificadas como doenças lisossômicas, que se manifestam devido à falta de determinada enzima causando o depósito de lipídeos em células do corpo. Como a Doença de Fabry que está relacionada à mutação no cromossomo X, e é causada pela deficiência da enzima alfa-galactosidase. A Doença de Gaucher, autossômica recessiva, na qual a enzima deficiente é a beta-glucocerebrosidase. As Mucopolissacaridoses ou doenças de acúmulo, onde a deficiência de algumas enzimas dão características a 6 tipos diferentes. O tratamento das doenças de depósito lisossômico é realizado através da Terapia de Reposição Enzimática (TRE). Estas enzimas são obtidas por técnicas de DNA recombinante. Concluiu-se que os avanços dos processos biotecnológicos contribuem para o desenvolvimento e produção de enzimas para o tratamento de doenças de depósito lisossômico, e que os pacientes portadores dessas doenças raras passaram a ter melhor qualidade de vida devido à diminuição dos sintomas após o emprego da TRE.

PALAVRAS-CHAVE: Biotecnologia. Erros Inatos do Metabolismo. Terapia de Reposição Enzimática. Doença de Gaucher. Doença de Fabry. Mucopolissacaridoses.

ABSTRACT

Biotechnology is the science that involves various areas of knowledge, their employability is linked to the areas of health, agronomy, food industry, among many others. Among its applications, there is the production of enzymes that are targeted to enzyme replacement therapy for rare diseases, such as those related Inborn Errors of Metabolism (IEM). The aim of this study was to review the literature, search for aspects involving biotechnological processes and Inborn Errors of Metabolism, highlighting the use of these processes in the treatment of lysosomal diseases, therefore realized search in scientific literature survey sites. It is noted that among the EIM are those classified as lysosomal diseases, which manifest themselves due to the lack of a particular enzyme causing the deposition of lipids in the body cells. As Fabry disease that is related to a mutation on the X chromosome, and is caused by a deficiency of the enzyme alpha-galactosidase. Gaucher disease, autosomal recessive, wherein the deficient enzyme is beta-glucocerebrosidase. Mucopolysaccharidosis or lysosomal storage disease, the impairment of some enzymes to 6 give different characteristics. The treatment of lysosomal storage diseases is achieved through Enzyme Replacement Therapy (ERT). These enzymes are obtained by recombinant DNA techniques. It was concluded that the advances of biotechnology processes contribute to the development and production of enzymes for the treatment of lysosomal storage diseases and the patients with these rare diseases now have better quality of life due to the decrease in symptoms after the use of ERT.

KEYWORDS: Biotechnology. Inborn Errors of Metabolism. Enzyme Replacement Therapy. Gaucher disease. Fabry disease. Mucopolysaccharidosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Angioqueratoma observado na Doença de Fabry	18
Figura 2: Lâmina histológica de tecido renal com acúmulo de GL-3	19
Figura 3: Criança com esplenomegalia, sinal característico da Doença de Gaucher.....	24
Figura 4: Criança apresentando face grosseira e baixa estatura, características fenotípicas das MPS.....	27
Figura 5: Técnica de obtenção de DNA recombinante	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação Clínicas dos Erros Inatos do Metabolismo	14
Tabela 2: Classificação das Mucopolissacaridoses.....	28
Tabela 3: Emprego de enzimas produzidas pela técnica de DNA recombinante	34

ABREVIATURAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

DF: Doença de Fabry

DG: Doença de Gaucher

EIM: Erros Inatos do Metabolismo

FDA: *Food and Drug Administration*

GBA: Gene da Glucocerebrosidase

GL-3: Globotriasilceramida-3

IL-6: Interleucina 6

IL-10: Interleucina 10

MPS: Mucopolissacarídeos

SUS: Sistema Único de Saúde

TGO: Transaminase Glutamina Oxalacética

TGP: Transaminase Glutâmica Pirúvica

TRE: Terapia de Reposição Enzimática

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Biotecnologia.....	12
1.2 Enzimas	13
1.3 Erros Inatos do Metabolismo.....	13
2 OBJETIVO	15
3 METODOLOGIA	16
4 DESENVOLVIMENTO	17
4.1 Doença de Fabry.....	17
4.1.1 Dados Epidemiológicos	17
4.1.2 Diagnóstico.....	17
4.1.3 Manifestações Clínicas.....	18
4.1.4 Tratamento	19
4.1.4.1 Terapia não específica.....	20
4.1.4.2 Terapia específica.....	20
4.2 Doença de Gaucher	22
4.2.1 Dados Epidemiológicos	22
4.2.2 Diagnóstico.....	22
4.2.3 Classificação Clínica.....	23
4.2.4 Manifestações Clínicas.....	24
4.2.5 Tratamento	25
4.3 Mucopolissacaridoses	27
4.4 Produção de Enzimas Terapêuticas.....	32
5 CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

1 INTRODUÇÃO

1.1 BIOTECNOLOGIA

Desde o primórdio dos tempos o homem vem aprimorando sua capacidade de pesquisa e descoberta. Do primeiro feito científico até os dias de hoje, os avanços tecnológicos têm sofrido progressos extremamente visíveis e essenciais para o ser humano e meio ambiente e a área biotecnológica, sem dúvida, contribui para esse desenvolvimento e melhoria de diferentes segmentos como saúde, diagnóstico, terapêutico, dentre tantos outros (STANKIEWICZ, 2002).

A Biotecnologia abrange diferentes áreas do conhecimento que incluem as ciências básicas como Biologia Molecular, Microbiologia, Biologia Celular, Genética, Genômica, Embriologia, as ciências aplicadas como Imunologia, Químicas e Bioquímicas, além de outras tecnologias como Informática, Robótica e Controle de processos, mostrando-se como uma ampla rede que faz tecnologia e ciência se entrelaçarem (PEREIRA, 2000).

Com o surgimento e desenvolvimento dos conhecimentos nas áreas da Microbiologia, Bioquímica e Engenharias, acelera-se o processo de desenvolvimento tecnológico, trazendo para o homem a possibilidade de novas descobertas através de pesquisas mais avançadas (PEREIRA, 2000).

A Biotecnologia tem seu marco em 1953 com o modelo da dupla hélice da molécula de DNA, elaborado por Watson e Crick. Vinte anos depois, Stanley Cohen e Herbet Boyer patentearam um experimento de clonagem, que consistiu em transferir um gene de um sapo a uma bactéria, o que só foi possível devido ao estudo da molécula de DNA (MALAJOVICH, 2012).

Assim, podemos considerar Biotecnologia como sendo a área que a partir da aplicação de multidisciplinas e utilização de diferentes seres vivos ou de partes deles, permite o desenvolvimento de serviços essenciais, capazes de resolver problemas relacionados ao bem estar humano, animal e ambiental (MALAJOVICH, 2012).

Dentre os processos biotecnológicos de grande importância para a saúde humana, destacam-se a produção e aplicação de enzimas, que são amplamente empregadas, sobretudo nas áreas de diagnóstico e terapêutica.

1.2 ENZIMAS

Enzimas são moléculas de proteínas com função de acelerar reações, diminuindo a energia de ativação, sem sofrer alterações. A enzima se une a um substrato específico, formando um complexo molecular, ou estado de transição. O encaixe no sítio ativo da molécula facilita a transformação do substrato em produto final da reação. No final, a enzima é recuperada sem perder sua função, podendo ser utilizada mais vezes (MALAJOVICH, 2012).

As enzimas possuem características importantes, como a especificidade, onde irá agir somente na presença de determinado substrato, a biodegradabilidade, devido a sua origem biológica. A ação enzimática depende de alguns parâmetros ideais como pH, temperatura e presença de cofatores orgânicos e/ou inorgânicos. Esses cofatores alteram a estrutura molecular da enzima, impedindo sua atividade catalítica (SILVA; PEREIRA, 2000).

Devidos às características citadas acima as enzimas apresentam diversas vantagens quando empregadas em processos tecnológicos. Dentre as diversas aplicações das enzimas, cerca de 10% são utilizadas pela indústria farmacêutica e analítica (MALAJOVICH, 2012). Outras diferentes áreas industriais também empregam enzimas como para a produção de produtos de limpeza, branqueamento de polpa de celulose, tecidos ou ainda na fabricação de laticínios, pão e biscoito. Na área da saúde, seu uso ocorre tanto na manipulação gênica, quanto em reagentes para laboratórios de análises clínicas, na produção de vacinas ou ainda em tratamentos médicos como no combate a inflamações, edemas, lesões e em terapias onde exista a deficiência enzimática (SILVA; PEREIRA, 2000).

1.3 ERROS INATOS DO METABOLISMO

Os Erros Inatos do Metabolismo (EIM) fazem parte de um grupo heterogêneo de defeitos genéticos que afetam a síntese, degradação, processamento e transporte de moléculas no organismo. Apesar de serem raros quando vistos individualmente, em conjunto se torna uma situação frequente, com uma prevalência estimada de 1 caso por 2.500 indivíduos (MEHTA et al., 2006). Ao contrário da maioria das doenças genéticas, muitos EIM são tratáveis. Os tratamentos incluem manejo dietético, reposição de produtos, administração de enzimas, transplantes e transferência gênica, entre outros (KRUG et al., 2009). A classificação clínica dos EIM está dividida em três grupos, demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1: Classificação Clínica dos Erros Inatos do Metabolismo

Grupos	Características	Doenças
I-Defeitos de síntese ou catabolismo de moléculas complexas	Manifestações clínicas permanentes que tendem a acentuar com o passar do tempo, como face grosseira, dismórficas, visceromegalias, neurodegeneração, entre outros, respeitando a localização do acúmulo.	Doenças Lisossômicas e Paroxissomais
II- Defeito no metabolismo intermediário	Intoxicação aguda e crônica; intervalo livre de sintomas; relação com ingestão alimentar	Aminoacidopatias; Acidúrias Orgânicas; Defeitos do ciclo da ureia e Intolerância aos açúcares.
III- Defeito na produção ou utilização de energia	Clínica é decorrente de alterações de produção e consumo energéticos. São provenientes de distúrbios do fígado, miocárdio, músculo e cérebro. Manifestam-se através de hipoglicemia, hipotomia generalizada, miopatia, insuficiência cardíaca, retardo de crescimento e até morte.	Glicogenoses, hiperlactemias congênitas, doenças mitocondriais da cadeia respiratória e defeitos na oxidação de ácidos graxos.

Fonte: OLIVEIRA, 2010.

2 OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo realizar uma revisão literária científica quanto aos aspectos que envolvam processos biotecnológicos e Erros Inatos do Metabolismo, destacando-se o emprego destes processos no tratamento de doenças lisossômicas.

3 METODOLOGIA

Realizou-se revisão da literatura científica buscando correlacionar os processos biotecnológicos que beneficiam o tratamento de Erros Inatos do Metabolismo com destaque sobre as doenças lisossômicas. Para tanto, utilizou-se dados disponíveis em bancos eletrônicos, com publicações a partir de 1999, para as seguintes palavras-chave: Biotecnologia, produção e aplicação de enzimas, Erro Inato do Metabolismo, Doença de Fabry, Doença de Gaucher, Mucopolissacaridoses, Terapia de Reposição Enzimática.

4 DESENVOLVIMENTO

Diversas doenças e síndromes são caracterizadas como Erros Inatos do Metabolismo, que podem ocorrer por defeitos de síntese ou catabolismo de moléculas complexas, defeitos no metabolismo intermediário ou então defeitos na produção ou utilização de energia, dando origem a doenças classificadas diferentemente. Dentre aquelas classificadas como Doenças Lisossômicas destacam-se a Doença de Fabry, Doença de Gaucher e Mucopolissacaridoses.

4.1 DOENÇA DE FABRY

A Doença de Fabry (DF) está relacionada à mutação no cromossomo X e foi descrita em 1989 por Wilian Anderson e Johannes Fabry. Ambos os médicos dermatologistas, que descreveram pacientes com *angiokeratoma corporis diffusum*, lesões de pele de cor vermelho púrpura, sinal característico dessa doença (FABRY, 2001).

4.1.1 Dados epidemiológicos

A Doença de Fabry é um EIM resultante da atividade deficiente da enzima alfa-galactosidase A, causando acúmulo de glicoesfingolípídeos, em especial globotriaosilceramida-3 (GL-3), nas paredes dos vasos sanguíneos de todo o corpo, podendo atingir órgãos e sistemas, principalmente rins, fígado, cérebro e coração. Aparece principalmente em homens e apresenta uma prevalência estimada de 1 a cada 40.000 recém nascidos do sexo masculino (MASSON et al., 2004).

Já os casos relatados de mulheres com a Doença de Fabry está estimada em 1:339.000 (MacDERMOT; HOLMES, 2001). As heterozigotas, geralmente, são descritas como assintomáticas ou como apresentando sintomas leves das doenças (GIBAS et al., 2008).

4.1.2 Diagnóstico

A observação da baixa atividade da alfa-galactosidase A em plasma e leucócitos e a identificação da mutação no gene GAL são exemplos de procedimentos utilizados para se chegar ao diagnóstico da Doença de Fabry (LINTHORST et al., 2005). A dosagem da atividade da alfa-galactosidase A é feita em leucócitos que são obtidos através do sangue periférico, ou seja, um material

biológico de fácil obtenção, dispensando a necessidade de realização de biópsias de órgãos, que são procedimentos de maior complexidade (PAGNINI et al., 2011).

A identificação de heterozigotos nem sempre é possível pela medida da atividade da alfa-galactosidase A (MEHTA et al., 2004) e acredita-se que a gravidade do caso clínico e o genótipo dos heterozigotos não estão correlacionados com a atividade da alfa-galactosidase A de plasma ou leucócitos (PLATT e WALKLEY, 2004). Porém, outros autores afirmam que mulheres com DF clássica geralmente têm menor atividade da alfa-galactosidase A e níveis aumentados de GL-3 na urina (KITAGAWA et al., 2008). Para o diagnóstico correto, a análise do DNA torna-se necessário apenas para mulheres que apresentam suspeita de DF, por causa da sintomatologia ou de resultados em biópsia de tecido e que tenham história familiar negativa (LINTHORST et al., 2008).

4.1.3 Manifestações clínicas

As manifestações incluem formigamento, rigidez e dor nas extremidades, aparecimento de angioqueratomas que são lesões cutâneas, demonstradas na Figura 1 e hipoidrose, que é a diminuição do suor, que aparecem, normalmente, na infância ou adolescência. Em alguns casos os sinais e sintomas podem ser mais tardios, aparecendo somente após a segunda ou terceira década de vida (DESNICK et al., 2001).



Figura 1: Angioqueratoma observado na Doença de Fabry.

Fonte: MEHTA et al., 2010.

O sintoma mais debilitante da Doença de Fabry é a dor (DESNICK et al., 2001), sendo típico o relato de acroparestesia ou sensação de queimação nas palmas das mãos e plantas dos pés (MASSON et al., 2004). Os sinais clínicos são caracterizados pelo aparecimento de angioqueratomas, que normalmente se tornam evidentes entre os 5 e 10 anos (MOHRENSCHLAGER et al., 2004).

A hipoidrose ou anidrose que é outro exemplo de sinal clínico é causada pelo acúmulo de GL-3 nas glândulas sudoríparas e em vasos sanguíneos associados. Muitas vezes é acompanhada pela redução da produção de lágrimas e saliva (SCHIFFMANN et al., 2003). Na Figura 2 está representado o acúmulo de GL-3 observado em lâmina histológica de tecido renal.

Em 70% dos heterozigotos podem apresentar sinais e/ou sintomas, e a gravidade pode acometer igualmente mulheres e pacientes do sexo masculino. Porém, o aparecimento em mulheres muitas vezes é tardio. A redução da expectativa de vida é de aproximadamente 20 anos em mulheres heterozigotas. (DEEGAN et al., 2006).

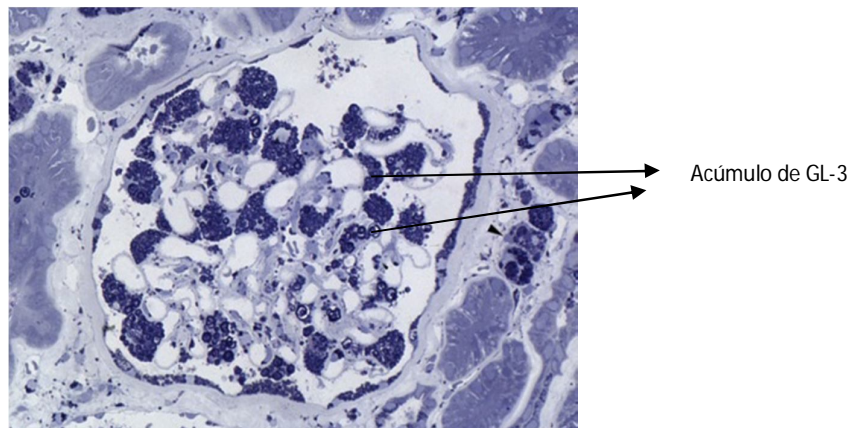


Figura 2: Lâmina histológica de tecido renal com acúmulo de GL-3
Fonte: BRADY et al., 2013.

4.1.4 Tratamento

Existem duas classificações para as terapias utilizadas no tratamento da Doença de Fabry, a terapia não específica e terapia específica.

4.1.4.1 Terapia não específica

É o tratamento de suporte utilizado para complementar a terapia específica, dirigido apenas ao controle dos sintomas e sinais presentes. Para a destruição dos angioquetomas são utilizados a eletrocoagulação, onde faíscas elétricas provocam desidratação, ruptura e carbonização das células; a crioterapia um procedimento que promove o congelamento da região, destruindo as células-alvo; e o tratamento com laser que costuma ser o tratamento de escolha onde as ondas do laser aquecem os líquidos intra e extracelulares até o ponto de ebulição. De acordo com o foco e a intensidade da luz, é possível extrair ou vaporizar o tecido comprometido (WEIDEMANN et al., 2013).

O tratamento que melhora parcialmente o formigamento, rigidez e a dor é obtido com difenilidantoína, carbamazepina, gabapentina, oxcarbazepina ou topiramato, que são medicamentos anticonvulsivos e analgésicos (WEIDEMANN et al., 2013).

Agentes antiplaquetários ou anticoagulantes são utilizados para as doenças vasculares cerebrais e retinianas como prevenção. A proteção vascular pode ser intensificada com inibidores da enzima de conversão da angiotensina, estatinas e ácido fólico (WEIDEMANN et al., 2013).

Em relação às alterações renais realiza-se o controle da hipertensão arterial, diálise, e em alguns casos transplante renal. O tratamento com inibidores da enzima conversora de angiotensina ou com bloqueadores dos receptores da angiotensina para reduzir a proteinúria (ZARATE; HOPKIN, 2008). As doenças cardíacas são controladas com drogas antiarrítmicas, marca-passo (quando houver indicação), e transplante cardíaco. A revascularização coronária ocorre somente em pacientes com doença coronariana (ABAD, 2009; LARRALDE, 2007).

4.1.4.2 Terapia específica

A terapia específica é realizada com a Terapia de Reposição Enzimática (TRE). Atualmente existem duas alfa-galactosidases humanas disponíveis no mercado a alfasidase alfa cujo nome comercial é Replagal[®], produzida pelas empresas Transkaryotic Therapies Inc., a partir de cultura de fibroblastos humanos acrescidos de promotores ativos para a transcrição do gene da alfa-galactosidase A, aprovada na Europa, e a alfasidase beta, produzida pela Genzyme Corp., cujo

nome comercial é Fabrazyme[®], obtida por terapia recombinante de ovários de hamsters, aprovada na Europa e nos Estados Unidos (LARRALDE, 2007).

A finalidade da TRE consiste em reverter tanto as anomalias metabólicas como as alterações patológicas da DF. Sua utilização tem o intuito de prevenir o desenvolvimento de doença em pacientes jovens ou de evitar, quando não for possível reverter, a progressão da disfunção orgânica nos doentes mais velhos (DESNICK; SCHUCHMAN, 2012).

Estudos clínicos realizados com essas duas enzimas demonstraram diminuição da frequência das crises de dor, da massa cardíaca, e do depósito de GL-3 nos rins, com estabilização ou melhora da função renal nos casos de acometimento leve e na pele. Também existem evidências de que a TRE melhora a sudorese, os sintomas gastrointestinais, pulmonares e a audição (LARRALDE, 2007; ZARATE, 2008).

Além do TRE, existe ainda a terapia gênica que visa acrescentar um gene normal da alfa-galactosidase ao DNA do doente, passando este a produzir a enzima normalmente. Os métodos utilizados para introduzir genes estranhos nas células são classificados de duas formas, a forma plasmidial, onde um gene de interesse é inserido em um plasmídeo de expressão eucariota, promovendo assim a síntese da proteína desejada nas células ou tecidos alvos, ou na forma viral, onde o transgene substitui regiões gênicas de certos vírus. A terapia gênica propõem o tratamento definitivo dessa doença porém, ainda está em fase experimental (SIATSKAS, 2014).

Existem ainda, outras modalidades específicas de tratamento da DF em estudo como com Chaperonas que são uma nova estratégia de realce enzimático, útil para os doentes que possuem variantes instáveis da alfa-galactosidase A mutante, que, por defeitos de qualidade é retida no retículo endoplasmático, mas conservam atividade enzimática residual (DESNICK, 2002; ROTH, 2008); tratamento com inibidores competitivos reversíveis da alfa-galactosidase A, que trata-se do uso de potentes inibidores competitivos da alfa-galactosidase A, que, uma vez no interior das células, determinam aumento da atividade da enzima. Ao mesmo tempo, essas substâncias parecem acelerar o transporte, a maturação e a estabilidade da enzima mutante (SEREGIN, 2011; YAM, 2006); ou ainda tratamento pela privação de substrato que se baseia na inibição de etapas precoces na síntese de glicosfingolipídeos com a consequente diminuição da formação e acúmulo de GL-3 (ABE, 2000).

4.2 DOENÇA DE GAUCHER

Relatada como a doença mais comum dentre as esfingolipidoses, a Doença de Gaucher (DG) é autossômica recessiva, causada por mutações do gene GBA (gene da glucocerebrosidase), localizado no braço longo do cromossomo 1. Esse gene é responsável por codificar a enzima beta-glucocerebrosidase, sendo que mutações genéticas determinam deficiência de sua atividade (OLIVEIRA, 2002). Assim, a DG é caracterizada pelo acúmulo intralisossomal de glucocerebrosídeo, um glicopeptídeo derivado de membranas celulares fagocitadas em macrófagos, nos tecidos do sistema reticuloendotelial (MEIKLE, 2012). Essas células carregadas de lipídeos são conhecidas como células de Gaucher (PARKIN; BRUNNING, 1982), encontradas por todo o sistema reticuloendotelial principalmente no baço, fígado, medula óssea, rins e pulmão, podendo também ser encontradas no sistema nervoso central (COZ, 2001). Danos irreparáveis podem ser observados, devido o acúmulo de glucocerebrosídeo perturbar e inibir o funcionamento normal desses órgãos e tecidos (KRUG, 2009).

Alguns estudos apontam que as células de Gaucher armazenadas podem estimular um aumento na liberação de citocinas tais como a interleucina IL-6 e IL-10 e o fatores de necrose tumoral, sendo que esses podem contribuir para o desenvolvimento da doença (MICHELAKAKIS, 1999).

4.2.1 Dados epidemiológicos

A Doença de Gaucher do tipo I corresponde a 95% dos casos, tendo uma prevalência de 1 caso a cada 10.000 habitantes (ALTARESCU, 2000). Já a incidência descrita para o tipo II e III da doença, é menor que 1 caso para 100.000 habitantes. (GIRALDO; PEREZ-CALVO, 2001).

4.2.2 Diagnóstico

Através da observação da redução da atividade da enzima beta-glucocerebrosidase em células nucleadas dos órgãos afetados, chega-se ao diagnóstico da doença de Gaucher (CHARROW, 1998). A dosagem da enzima nos leucócitos do sangue ou em fibroblastos encontra-se 10 a 30% abaixo do normal nos pacientes com DG tipo I. As células de Gaucher são encontradas na medula óssea, tecido esplênico ou no tecido hepático. Entretanto, células muito similares têm sido

descritas em muitas outras doenças, como leucemia mielóide crônica, leucemia mieloblástica, linfoma de Hodgkin, dentre outras (CHENG, 2012).

A quantificação de quitotriosidase é um exemplo de outro método que pode ser utilizado como auxiliar no diagnóstico que utiliza o plasma do paciente para realizar o exame através do método de ensaio enzimático. A quitotriosidase é uma enzima plasmática, que funciona como um biomarcador para atividade de macrófagos, que geralmente encontra-se com atividade elevada em pacientes com doenças lisossômicas (RODRIGUES, 2004).

Outros exames sanguíneos como tempo de tromboplastina, transaminase glutamina oxalacética (TGO), transaminase glutâmica pirúvica (TGP), ferro sérico, ferritina e vitamina B12 podem ser úteis a fim de descartar etiologias coexistentes (WEINREB, 2004).

4.2.3 Classificação Clínica

É uma doença multissistêmica, com grande variação em suas manifestações clínicas durante a evolução (SINDRANSKY, 2004). A anemia, hepatoesplenomegalia e lesões ósseas são manifestações primárias, e o acometimento pulmonar e envolvimento do sistema nervoso central são menos frequentes (BRANGER, 1995).

A Doença de Gaucher é classificada em três tipos, baseada na presença e gravidade do envolvimento neurológico.

O tipo I ou não-neuropático, acomete adultos e crianças, sendo que a idade de início dos sinais e sintomas é incerta. A manifestação clínica típica é caracterizado através da hepatomegalia, esplenomegalia levando a hiperesplenismo com progressiva anemia, trombocitopenia e leucopenia. O quadro é ainda combinado à fadiga, cansaço, plenitude gástrica pós-prandial e retardo de crescimento em crianças. O acúmulo de glicocerebrosídeo na medula óssea leva à osteopenia, lesões líticas (ossos), fraturas patológicas, dor óssea crônica, crises ósseas, infarto e osteonecrose. A progressão do quadro é, em geral, lenta ou variável, e a sobrevida pode ser normal na dependência da gravidade das complicações (AERTS, 2006; MACHACZKA, 2009).

O tipo II ou doença neuropática aguda é o mais raro. Lactentes com 4-5 meses de idade, são os afetados, e a doença compromete cérebro, baço, fígado e pulmão. O quadro neurológico é grave, com múltiplas convulsões, hipertonia, apneia

e progressivo retardo mental. A evolução é rápida e a morte ocorre entre os primeiros dois anos de vida, devido o envolvimento pulmonar (AERTS, 2006).

O tipo III, ou doença neuropática subaguda, afeta tanto crianças como adolescentes e envolve aspectos das duas formas anteriores com leve disfunção neurológica e de lento progresso. A expectativa de vida se estende entre os 20 e 30 anos (SINDRANSKY, 2004).

4.2.4 Manifestações Clínicas

Os sintomas clínicos, nesse caso, são heterogêneos, alguns pacientes com Doença de Gaucher apresentam poucos sintomas, porém outros podem apresentar clínica mais intensa. Em relação ao envolvimento visceral, o fígado e o baço são os órgãos com maior conteúdo do sistema reticuloendotelial, correspondendo a 10% de todo o tecido hepatoesplênico (WEINREB, 2004). O sinal mais comum é a esplenohepatomegalia, representada na Figura 3, definida em alguns estudos como a massa esplênica superior a 0,2% do peso corporal total (PASTORES, 2004). Já hepatomegalia em alguns estudos é definida como volume do fígado superior a 2,5% do peso corporal. São sintomas comuns em paciente com doença de Gaucher podendo ser assintomática ou então estar relacionado à distensão abdominal, desconforto e dor, e/ou anemia e trombocitopenia. A fibrose hepática ocorre frequentemente, porém a falência hepática, cirrose ou hipertensão não acontece comumente (LAICHMANN et al., 2000).



Figura 3: Criança com esplenohepatomegalia, sinal característico da Doença de Gaucher
Fonte: SAÚDE E MEDICINA, 2014.

O depósito de células de Gaucher na medula óssea e o sequestro esplênico ocasionam deformidades nas estruturas ósseas e complicações vasculares intraesponjosas graves, sendo observados em exames hematológicos (WEINREB, 2004). Entre essas anormalidades estão a anemia, trombocitopenia, neutropenia, pancitopenia, coagulopatia e tendência a sangramento e hematoma (PASTORES, 2004).

Observam-se também alterações esqueléticas, porém, não se sabe ao certo como ocorre o mecanismo no qual a infiltração da medula óssea leva à doença óssea (WEINREB, 2004), mas estudos sugerem que as células de Gaucher interferem na função normal dos osteoblastos pela liberação de citocinas e outras interleucinas, causando diminuição na sua capacidade de sintetizar osso novo (LAICHMANN et al., 2000). As alterações esqueléticas podem estar integradas ao alto grau de morbidade e impacto nas atividades diárias (MISTRY, 1999). As anormalidades mais frequentemente encontradas são: osteopenia, osteonecrose, osteosclerose e “deformidades em frasco de Erlenmeyer” – que são anormalidades esqueléticas causadas pela ausência de remodelagem da porção distal do fêmur e proximal da tíbia. (DESNICK et al., 2001). Mais de 50% dos pacientes com baço intacto e mais de dois terços dos esplenectomizados já sentiram dor óssea e apresentam evidências de doença óssea grave. Outro achado comum, que afeta cerca de 50% das crianças com Doença de Gaucher, é o atraso de crescimento e cerca de um quarto das crianças têm baixa estatura (MASSON et al., 2004).

Outro lugar de acúmulo que causam a patologia são os macrófagos pulmonares. Entretanto apenas 1 a 2 % dos relatos da doença do tipo I apresentam manifestações na forma de doença pulmonar (MEHTA et al., 2004). Após as manifestações hematológicas, são descritas as manifestações dermatológicas e o envolvimento renal e cardíaco são sinais menos comuns (KRUG et al., 2009).

4.2.5 Tratamento

Anteriormente a Terapia de Reposição Enzimática (TRE), era realizada apenas como tratamento paliativo para a morbidade associada à DG, além do aconselhamento genético. Para diminuir sintomas de compressão abdominal, citopenias e retardo do crescimento realizava-se a esplenectomia (WEINREB et al., 2004). Porém agora, a cirurgia para reverter o quadro de esplenomegalia não é mais indicada, pois é possível que a remoção deste órgão, que serve de armazenamento

para a deposição progressiva de macrófagos infiltrados de glicolipídios, acelere este depósito em outros órgãos como o esqueleto (tipo I) e Sistema Nervoso Central (tipo III), além dos riscos inerentes quanto ao procedimento (WEINREB et al., 2004).

Existe também a possibilidade de transplante de medula óssea, porém com a disponibilidade da TRE, criou-se a esperança de melhoria na qualidade de vida dos pacientes, com a regressão de muitos sintomas (WEINREB et al., 2004).

A TRE para a doença de Gaucher foi aprovada em 1991 pela *Food and Drug Administration* (FDA). Inicialmente a glicosilceramidase exógena, era obtida de placenta humana (alglucerase) depois foi substituída em pela imiglucerase obtida de forma recombinante (SOBREIRA, 2007). A TRE tornou-se o tratamento padrão para doença de Gaucher do tipo I, a partir de 2000. No tipo III, os resultados da TRE sobre as manifestações hematológicas, viscerais e esqueléticas são bons, mas os efeitos não são consistentes em relação às manifestações neurológicas.

Existe também a terapia de redução de substrato, realizada com o medicamento administrado via oral Miglustate®, para o tratamento da DG tipo I. O efeito de Miglustate® consiste em inibir reversivelmente a síntese de glicosilceramida e reduzir o acúmulo do substrato no interior das células. É indicado como opção terapêutica para pacientes com idades entre 18 e 70 anos que apresente manifestações leves a moderadas e sem riscos de novas complicações ósseas e que tenham restrições ao uso da TRE. No Brasil o Miglustate® foi aprovado em 2009, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Em agosto de 2010, a ANVISA autorizou a importação, em caráter excepcional, da taliglucerase alfa, que é a forma ativa recombinante da beta-glicocebrosidease. A decisão baseou-se na análise da documentação apresentada e a constatação de que um estudo clínico em fase de conclusão aponta resultados significantes no controle da DG. Esta autorização aconteceu devido ao responsável pela fabricação do medicamento Imiglucerase, estar enfrentando problemas para suprir as necessidades dos pacientes do Sistema Único de Saúde (SUS) (APPLEGARTH et al., 2000).

4.3 MUCOPOLISSACARIDOSES

As mucopolissacaridoses (MPS) fazem parte de um grupo de doenças descritas como “de acúmulo”, e que possuem como características deficiências enzimáticas, resultando em bloqueio na degradação dos mucopolissacarídeos, que são depositados nos lisossomos teciduais. Como consequência, há excreção aumentada dessas substâncias que não são totalmente degradadas e fenótipos anormais. A doença tem caráter genético, sendo que a criança é normal ao nascer, mas, junto ao acúmulo de mucopolissacarídeos, surgem deformidades que progridem ao longo da vida (MURAHOVSKI, 2013).

As MPS são caracterizadas como doenças raras, sendo que a incidência pode variar entre países, mantendo incidência de 4,5 casos a cada 100.000 nascidos vivos (ARLT et al., 2004).

As características fenotípicas são presença de face grosseira e baixa estatura (Figura 4), contraturas articulares, hepatoesplenomegalia, alterações no formato dos osso, surdez, opacificação da córnea, diarreia, cardiopatia, doença pulmonar obstrutiva crônica, apneia do sono e retardo mental (NEUFELD; MUENZER, 2001).



Figura 4: Criança apresentando face grosseira e baixa estatura, características fenotípicas das MPS.

Fonte: GIUGLIANI, 2014 (com modificações).

A classificação das MPS se dá de acordo com a enzima deficiente. São separadas em sete grupos, sendo que alguns desses grupos possuem subgrupos, como mostra a Tabela 2, e o tipo V não há relatos de casos até hoje.

Tabela 2: Classificação das Mucopolissacaridoses

Doença	Enzima Deficiente
MPS I	Alfa-L-iduronidase
MPS II (Síndrome de Hunter)	Iduronato sulfatase
MPS III (Síndrome de Sanfilippo)	A: Heparan-N-Sulfatase
	B: N-acetil-alfa-D-glicosaminidase
	C: Acetil CoA:alfa-glicosaminidase acetiltransferase
	D: N-acetilglicosamina-6-sulfatase
MPS IV (Síndrome de Mórquio)	A: N-acetilgalactosamina-6-sulfatase
	B: Beta-galactosidase
MPS V	NÃO DESCRITO NA LITERATURA
MPS VI (Síndrome de Maroteaux-Lamy)	Aryldulfatase Beta
MPS VII (Síndrome de Aly)	Beta-glucoronidase

MPS I é causada pela deficiência da enzima alfa-L-iduronidase. A doença é autossômica recessiva e ambos os sexos são afetados de forma igual. Três formas estão associadas a MPS I, diferindo entre sim baseado na presença de comprometimento neurológico, na velocidade de progressão da doença e na gravidade do acometimento dos órgãos-alvo, sendo os mais habituais o sistema nervoso central, ossos, articulações, vias aéreas superiores e inferiores, coração e córnea (NEUFELD; MUENZER, 2001).

Pacientes com a Síndrome de Hurler, que caracteriza a forma mais grave das MPS I, cujo diagnóstico normalmente ocorre até os 2 anos de idade, apresentam atraso de desenvolvimento aparente entre os 14 e 24 meses e estatura máxima de 110 cm, o histórico clínico evolui na maioria das vezes para problemas respiratórios e o óbito (NEUFELD; MUENZER, 2001).

Na Síndrome de Hurler-Scheie, que caracteriza a forma intermediária das MPS I, os pacientes costumam apresentar evidência clínica da doença entre os 3 e

8 anos de idade, sendo que a característica importante observada é a baixa estatura, pois a maioria dos pacientes apresentam inteligência normal e a sobrevivência até a idade adulta é comum (NEUFELD; MUENZER, 2001).

Na Síndrome de Scheie, que caracteriza a forma atenuada das MPS I, a sintomatologia dos pacientes costuma iniciar entre os 5 e 15 anos de idades, sendo que a evolução clínica é representado por problemas ortopédicos, a altura final é normal, assim como o tempo de vida, o qual, devido a doença cardíaca, pode se mostrar reduzido (NEUFELD; MUENZER, 2001).

A detecção de níveis baixos de alfa-L-idurnidase nos leucócitos ou nos fibroblastos da pele e a concentração alta de fragmentos de glicosaminoglicanos (GAG) na urina confirmam o diagnóstico das MPS (KRESSE et al., 2000).

As terapias disponíveis para tratamento da MPS I incluem intervenções realizadas no nível do fenótipo clínico, como cirurgias para correção de hérnias ou no nível da proteína mutante, transplante de células hematopoiéticas e TRE com laronidase. A indicação de TRE para MPS I é feita para pacientes de qualquer idade, que possua o diagnóstico confirmado e sintomas característicos, e que têm pelo menos uma manifestação clínica que responda ao tratamento com TRE (GIUGLIANI et al., 2010).

A MPS II acontece devido à deficiência da enzima lisossômica iduronato-2-sulfatase e tem herança ligada ao cromossomo X. A incidência é variável, e pode chegar a 1 caso para cada 130.000 recém nascidos vivos (SCHWARTZ et al., 2009). No Brasil, essa forma de MPS é a mais frequentemente diagnosticada, de acordo com dados da Rede MPS Brasil (PINTO et al., 2010).

As manifestações clínicas mais relatadas incluem face grosseira, alterações esqueléticas, baixa estatura, contraturas articulares, atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, infecções recorrentes de vias aéreas superiores e inferiores, surdez e cardiopatia. Podem aparecer também lesões papulares no dorso, braços e nádegas que são típicas da MPS II. As disostoses são todas as manifestações esqueléticas, e incluem macrocefalia, redução do diâmetro antero-posterior das vértebras, coxa valga, irregularidade da diáfise dos ossos longos e displasia da epífise dos ossos tubulares curtos (YOUNG et al., 2002).

A MPS II está ligada a vários sintomas clínicos e costuma ser classificada, de acordo com a presença de atraso de desenvolvimento e/ou retardo mental, em formas de neuropática ou não neuropática (YOUNG et al., 2002).

A TRE para pacientes com MPS II normalmente é indicada para todos os pacientes sintomáticos com diagnóstico confirmado. Devido à enzima ser administrada por via intravenosa, todos os benefícios do tratamento são questionáveis em pacientes que apresentam grave comprometimento das funções cognitivas, já que a enzima não atravessa a barreira hematoencefálica (WRAITH, 2005).

A MPS III ou Síndrome Sanfilippo afeta principalmente o sistema nervoso central. Existem quatro subtipos (MPS IIIA, MPS IIIB, MPS IIIC, MPS IIID) determinados pelas diferentes deficiências enzimáticas, porém as manifestações clínicas são iguais. Os subtipos estão associados à deficiência de quatro enzimas, respectivamente: sulfamidase, alfa-N-acetilglicosaminidase, acetil-Coa:a-glicosamida acetiltransferase e N-acetilglicosamina 6-sulfatase. A ausência dessas enzimas provoca o acúmulo de heparan sulfato generalizado nos tecidos do corpo, o aumento de sua eliminação na urina e o depósito de açúcares e gordura nas células do cérebro (NEUFELF; MUENZER, 2001).

A aparência e o desenvolvimento são normais nos primeiros anos de vida, iniciando com alterações do comportamento entre 2 e 6 anos de idade, e evoluindo com a perda progressiva da capacidade mental. O crescimento pode ser acelerado nos primeiros anos de vida e, após os 3 anos, pode ser mais lento (TYLKI-SZYMANSKA; METERA, 1995). A principal complicação é a degeneração, que resulta na apneia do sono, causada por alterações no centro respiratório no cérebro. Podem aparecer ainda convulsões e dificuldade em alimentar-se durante a evolução da doença (NEUFELF; MUENZER, 2001).

A incidência é diferente entre países, por se tratar de um dos tipos mais raros das MPS. No caso da MPS IIIA a variação é de 1:86.000 a 1:160.300; a MPS IIIB de 1:135.000 a 1:238.000; MPS IIIC de 1:476.000 a 1:1.406.000 e MPS IIID de 1:1.056.000 (NELSON et al., 2003).

A Síndrome de Morquio, ou MPS IV, acontece devido à degradação deficiente de queratano sulfato. A deficiência de duas enzimas resulta num fenótipo de manifestações clínicas heterogêneas. Na deficiência de N-acetilgalactosamina-6 sulfatase a doença causada é a MPS IVA e a deficiência de B-galactosidase resulta em MPS IVB. Ambas apresentam excreção de queratano sulfato na urina (NEUFELF; MUENZER, 2001).

Os sintomas causados pelo acúmulo de queratan sulfato variam entre displasia esquelética e doença sistêmica, baixa estatura e anormalidades articulares, que limitam a mobilidade e a resistência física. A função respiratória é afetada por causa da má-formação do tórax. A hipoplasia e a flacidez dos ligamentos provocam instabilidade na coluna cervical e a medula espinhal sofre constante compressão. Outros sintomas comuns envolvem ainda a perda auditiva, opacidade da córnea e valvulopatia. Os sintomas iniciais geralmente são observados nos primeiros 5 anos de vida (NEUFELF; MUENZER, 2001). Estima-se que a incidência de MPS IV está relacionada entre 1 a cada 40.000 nascidos vivos (NORTHOVER et al., 1996).

As observações clínicas e de radiografias chegam ao diagnóstico da doença, pois revelam displasia esquelética, característica diferente da disostose múltipla que é comumente observada nas outras MPS. Excreção de queratan sulfato na urina é um indicativo que deve ser confirmado com o ensaio enzimático em sangue periférico ou em fibroblastos da pele (NORTHOVER et al., 1996).

A MPS VI, ou Síndrome de Maroteaux-Lamy é semelhante à Síndrome de Hurler (MPS I), porém a inteligência é preservada e é observada a excreção de dermatan sulfato não acompanhada de herpatan sulfato na urina. A causa da doença é dada pela deficiência da enzima N-acetilgalactosamina-4-sulfatase (NEUFELF; MUENZER, 2001).

Três formas clínicas podem ser observadas, de acordo com a idade do diagnóstico, a idade do início dos sintomas e sua progressão, que são divididas em infantil ou grave, juvenil ou intermediária e forma adulta ou branda. O crescimento e desenvolvimento físico podem ser normais nos primeiros anos de vida, estacionando por volta dos 6 ou 8 anos. Existe ainda as manifestações oculares que são caracterizada pela opacidade da córnea, glaucoma e inchaço do nervo óptico com atrofia óptica em estágios mais avançados. A TRE é feita com a enzima galsulfase, uma forma recombinante da N-acetilgalactosamina-sulfatase (NEUFELF; MUENZER, 2001).

Na MPS VII, também chamada de Síndrome de Sly, são observadas três formas distintas. A forma fetal-neonatal pode causar óbito do feto e presença de inchaço generalizado (hidropsia fetal) no recém-nascido; ao nascimento fácies grosseira, alterações ósseas (disostose múltipla) comprometendo vértebras e ossos longos, aumento do fígado e baço, opacidade de córneas. Na forma leve ocorre todo o comprometimento sistêmico, porém esse é bem mais leve e a progressão mais

lenta. Na forma grave observam-se os sintomas que podem ter início nos primeiros meses de vida como hérnia umbilical e inguinal, aumento do perímetro do crânio (macrocefalia) e deformidade do tórax (NEUFELF; MUENZER, 2001).

4.4 PRODUÇÃO DE ENZIMAS TERAPÊUTICAS

Erros metabólicos resultam na deposição de quantidade inadequada de substrato que é atribuída à deficiência de uma enzima. Verificou-se que as enzimas podem ajudar a desfazer essa deposição, quando administradas no tratamento de doenças metabólicas de depósito (KAUR; SEKHON, 2012).

Na terapia de reposição enzimática, enzimas deficientes em pacientes são dadas por uma infusão intravenosa, para tanto são necessários padrões muito elevados de pureza. Sabe-se que a TRE não afeta o defeito genético subjacente, mas aumenta a concentração de enzima no paciente. Além disso, TRE tornou-se um padrão de tratamento para pacientes com várias doenças de depósito lisossômico como as doenças de Fabry, de Gaucher e Mucopolissacaridoses (KAUR; SEKHON, 2012). As enzimas utilizadas no tratamento das doenças lisossômicas são produzidas a partir de técnicas biotecnológicas como a tecnologia do DNA recombinante.

A tecnologia do DNA recombinante foi descrita primeiramente em 1973 por Stanley Cohen e Herbert Boyer. Esses estudiosos utilizaram o DNA humano e o copiaram em um plasmídeo bacteriano, que foi introduzido em uma bactéria, resultando em uma bactéria geneticamente modificada que apresentava redução de uma proteína. Isso foi possível porque os blocos de construção de DNA, e as regras para a codificação de informação biológica pelo DNA (código genético), são idênticos entre as diferentes espécies. Somente as regiões que controlam o processo de tradução da informação codificada de DNA em RNA e proteínas devem ser adotadas para o organismo alvo, já que o controle da expressão da informação genética é altamente específico, não só por espécie, mas muitas vezes até mesmo por tipo específico de célula (DINGERMAN, 2008), como representada na Figura 5.

Na produção de enzimas por DNA recombinante é realizada a fusão de um plasmídeo contendo gene que codifica a enzima deficiente em células específicas. No caso das enzimas utilizadas no tratamento dos EIM, as células utilizadas são de ovário de mamíferos, preferencialmente as de Hamster (KAUR; SEKHON, 2012). Após a infusão, as células com o gene de interesse são clonadas, passando a

produzir a enzima alvo. Essa enzima, por sua vez, é purificada e então administrada por via intravenosa em pacientes com doenças de depósito lisossômico (TORTORA et al., 2012).

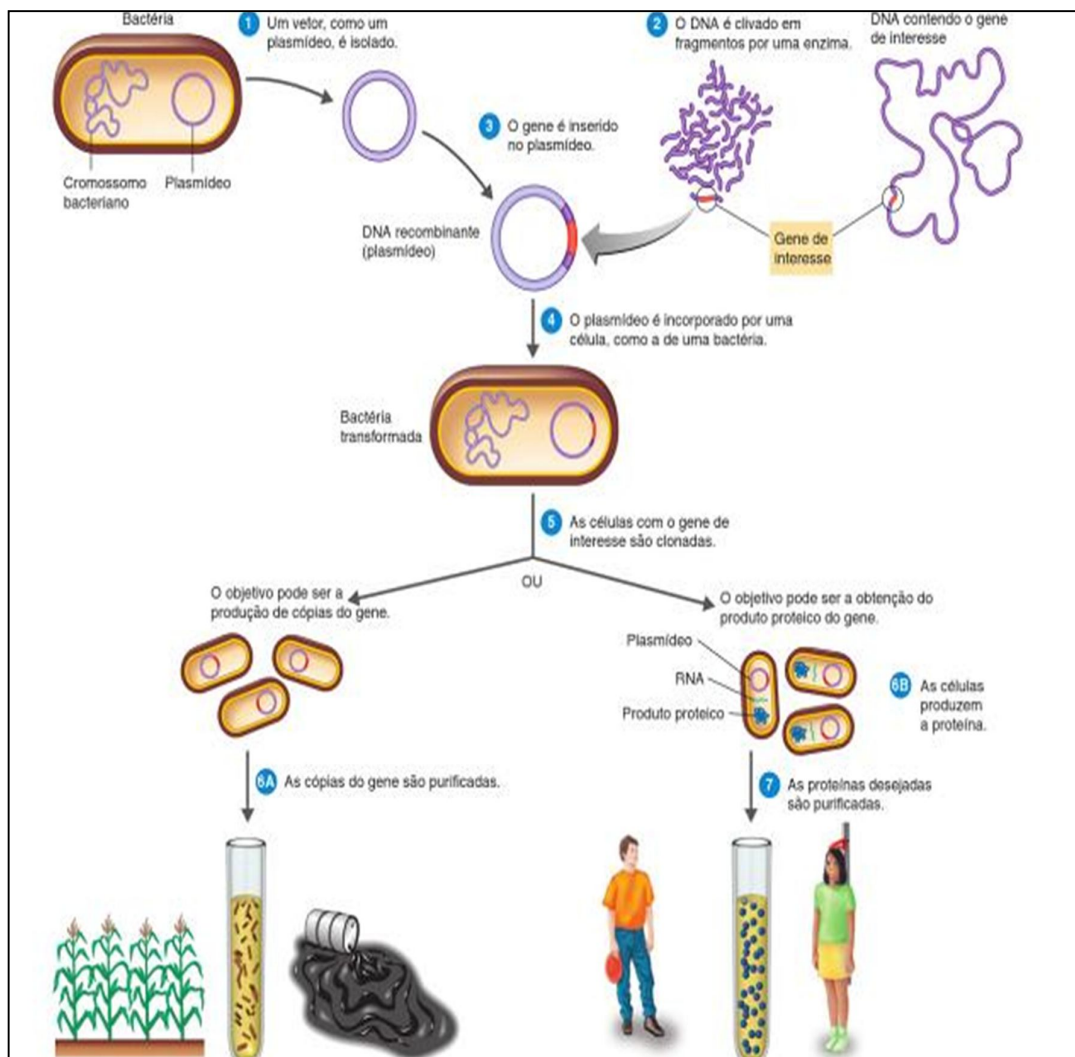


Figura 5: Técnica de obtenção de DNA recombinante.
Fonte: TORTORA et al., 2012

A cópia exata da enzima humana, que está deficiente no paciente, não é mais um problema a se considerar, tendo em vista que o desafio maior está relacionado com a farmacocinética dos medicamentos recombinantes artificiais (DINGERMANN, 2008). O alto custo de desenvolvimento de drogas terapêuticas para as doenças raras torna difícil atender as necessidades específicas desses pacientes (KAUR; SEKHON, 2012).

Atualmente, existem seis produtos para TRE que receberam aprovação para a comercialização pelo FDA nos Estados Unidos. Cada um é específico para uma única doença, como demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3: Emprego de enzimas produzidas pela técnica de DNA recombinante.

Enzima	Uso terapêutico
Imiglucerase	Doença de Gaucher
Alglucerase	Doença de Gaucher
Agalsidase-beta	Doença de Fabry
Iaronidase	MPS I
Idursulfase	MPS II
Galsulfase	MPS VI

Fonte: KAUR e SEKHON, 2012 (com modificações).

Fabrazyme® é o nome comercial da Agalsidase-beta que é indicado na terapia de reposição enzimática em pacientes com diagnóstico confirmado de doença de Fabry, ou seja, aqueles que apresentam deficiência de alfa-galactosidase. Fabricado pela técnica do DNA recombinante, o Fabrazyme facilita a cisão da globotriaosilceramida-3 (GL-3) e outros glicoesfingolipídios nas células do corpo inteiro. Espera-se que a eliminação de GL-3 do endotélio vascular de muitos tecidos e órgãos (rim, coração, pele) provoque uma lentidão ou uma parada nas consequências do acúmulo de GL-3, nesta rara doença de depósito lisossômico (Genzyme Corporation®, 2006).

Na doença de Gaucher que não há expressão suficiente do gene glucocerebrosidase, produtor de beta-glicocerebrosidase, é utilizada Cerezyme® nome comercial do Imiglucerase, e Ceredase® que é o nome comercial da Alglucerase. Imiglucerase e Alglucerase são análogos da enzima humana beta-glicocerebrosidase, que são produzidos por tecnologia de DNA recombinante. A beta-glicocerebrosidase (beta-D-glicosil-N-acilesfingosina glicoidrolase) é uma glicoproteína lisossomal que catalisa a hidrólise do glicolípídeo, glicocerebrosídeo, resultando em glicose e ceramida. A imiglucerase purificada é uma glicoproteína monomérica com 497 aminoácidos, contendo 4 sítios de N-glicosilação. Essas enzimas exógenas diferem da glicocerebrosidase natural, de origem placentária, por um aminoácido na posição 495 onde a histidina é substituída por arginina. As

cadeias de oligossacarídeos nos sítios de glicosilação foram modificadas de maneira a terminarem com resíduos de manose. Estas cadeias de oligossacarídeos terminando em manose são especificamente reconhecidas e captadas por receptores endocíticos para manose localizados nos macrófagos, as células que acumulam o glicocerebrosídeo na doença de Gaucher (Genzyme Corporation®, 2007).

Para características clínicas da Mucopolissacaridose I, a Aldurazyme®, laronidase, é usada com função de restabelecer um nível de atividade enzimática suficiente para hidrolisar o substrato acumulado e prevenir acumulação. Após perfusão intravenosa, a laronidase é rapidamente removida da circulação e captada pelas células para o interior dos lisossomas, mais provavelmente através dos recetores da manose-6-fosfato (Genzyme Corporation®, 2008).

Na MPS II é utilizado a Idursulfase, disponível comercialmente como Elprase®. A Idursulfase é produzida por tecnologia de DNA recombinante em linhagens de células humanas. A Idursulfase é uma enzima que hidrolisa os ésteres 2-sulfato dos resíduos terminais de sulfato de iduronato dos glicosaminoglicanos dermatan-sulfato e heparan-sulfato nos lisossomos de vários tipos de células. Na TRE a enzima exógena é fornecida para captação pelos lisossomos no interior das células. Resíduos de manose-6-fosfato (M6P) nas cadeias de oligossacarídeos permitem a ligação da enzima com os receptores M6P na superfície das células, levando à internalização da enzima tendo como alvo os lisossomos e subsequente catabolismo dos GAGs acumulados (Shire Human Genetic Therapies Inc®, 2013).

Para MPS VI utiliza-se a Naglazyme®, galsulfase. A atividade reduzida ou inexistente da N-acetilgalactosamina 4-sulfatase resulta na acumulação de sulfato de dermatano em muitos tipos de células e tecidos. A fundamentação lógica para a terapia de substituição enzimática é restaurar um nível de atividade enzimática suficiente para hidrolisar o substrato acumulado e evitar mais acumulação (BioMarin Pharmaceutical Inc®, 2011).

Esses medicamentos utilizados na TRE são autorizados pela ANVISA, porém apenas aquele usado no tratamento da Doença de Gaucher é oferecido gratuitamente pelo SUS, por ser a doença mais comum dentre aquelas dadas como raras. A falta de assistência aos outros tratamentos se deve ao fato de o governo alegar que seria antiético investir somas substanciais que beneficiam um pequeno

número de pacientes, tendo em vista a raridade das doenças, ou seja, investir muito em poucos pacientes (BOY; SCHRANN, 2009).

É possível, porém, conseguir esses medicamentos através de ações judiciais que são fundamentadas nos princípios constitucionais da universalidade, igualdade, integralidade descentralização e participação social, e nos direitos também garantidos pela constituição brasileira de 1988, que diz que a saúde é direito de todos e dever do estado (JUNIOR et al., 2012).

5 CONCLUSÃO

Com o avanço dos processos biotecnológicos, doenças raras, como as apresentadas por pacientes que possuam EIM passam a ser vistas de maneira diferente, pois novas técnicas científicas permitem maior especificidade no diagnóstico e tratamento. O emprego da Terapia de Reposição Enzimática, em portadores de doenças de depósito lisossômico faz com que esses pacientes apresentem melhor qualidade e aumento da expectativa de vida. Essa melhoria se deve ao fato de esses medicamentos proporcionarem diminuição dos sintomas e também dos desconfortos que as doenças causam.

É evidente que existem muitas descobertas pela frente, porém com a rápida evolução das pesquisas nessas áreas, acredita-se que, cada vez mais, o diagnóstico e tratamento de doenças raras, como os EIM, possam se tornar mais eficientes, favorecendo a qualidade de vida destes pacientes.

REFERÊNCIAS

ABAD, M.E.; LARRALDE, M. Paula Boggio¹ Paula Carolina Luna². **An. Bras. Dermatol.** v. 84, n. 4, p. 367-76, jul./aug. 2009.

ABE, A. et al. Reduction of globotriaosylceramide in Fabry disease mice by substrate deprivation. **J. Clin. Invest.** v. 105, p.1563-71, jun. 2000.

AERTS, J. M. F. G et al. Substrate reduction therapy of glycosphingolipid storage disorders. **J. Inherit. Metab. Dis.** v. 29, n. 2-3, p. 449-456, apr./jun. 2006.

ALDURAZYME. Responsável técnico: Márcia Regina Moscatelli. Naarden, Países Baixos. Genzyme Corporation, 2008. Bula de remédio.

ALTARESCU, G et al. The efficacy of enzyme replacement therapy in patients with chronic neuronopathic Gaucher's disease. **J. pediat.**, v. 138, n. 4, p. 539-547, apr. 2001.

APPLEGARTH, D. A.; TOONE, J. R.; LOWRY, R. B. Incidence os inborn errors of metabolism in British Columbia. v. 105, n. 1, p. 10, jan. 2000.

ARLT G., et al. Juvenile form of mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome). A C-terminal extension causes instability but increases catalytic efficiency of arylsulfatase B. **J. Biol. Chem.** v. 269, n. 13, p. 9638-43, apr. 1994.

BOGGIO, P et al. Fabry disease. **An. Bras. Dermatol.**, v. 84, n. 4, p. 367-376, 2009.

BOY, R.; SCHRAMM, F. R. Bioética da proteção e tratamento de doenças genéticas raras no Brasil: o caso das doenças de depósito lisossomal Principle of protection and treatment of rare genetic diseases in Brazil: the case of lysosomal. **Cad. Saúde Pública.** v. 25.6 p.1276-1284, 2009.

BRAD, M. et al. Diagnosing Fabry disease—delays and difficulties within discordant siblings. **Q. J. Med.** 2013.

BRANGER, J. A et al. Enzymatic And Molecular Diagnosis Of Gaucher Disease. **Clin. Lab. Med.** 1995.

CEREZYME. Responsável técnico: Márcia Regina Moscatelli. Allston, MA. Genzyme Corporation, 2007. Bula de remédio.

CHARROW, J. Enzyme replacement therapy for Gaucher disease. **Expert. Opin. Biol. Ther.** v. 9, n. 1, p. 121-31, jan. 2009.

CHARROW, J. et al. Gaucher disease: recommendations on diagnosis, evaluation and monitoring. **Arch. Intern. Med.** v. 156, n. 16, p. 1754-60, sep. 1998.

CHENG, S. H.; MEEKER, D. Combination enzyme replacement and small molecule therapy for treatment of lysosomal storage diseases. **U.S. Patent.** 2012.

CLARKE, J. T. R. Narrative review: Fabry disease. **Ann. Internal. Med.** v. 146, n. 6, p. 425-433, 2007.

COZ, T. M. Gaucher disease: understanding the molecular pathogenesis os sphingolipidoses. **J. Inherit. Metab. Dis.** 2001.

de FOST M.; ARTES J. M.; HOLLAK C. E. Gaucher disease: from fundamental research to effective therapeutic interventions. **Neth. J. Med.** v. 61, n. 1, p. 3-8, jan. 2003.

DESNICK, R. J.; SCHUCHMAN, E. H. Enzyme replacement therapy for lysosomal diseases: lessons from 20 years of experience and remaining challenges. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.** v. 13, p. 307-335, 2012.

DESNICK, R. J.; WASSERSTEIN, M. P.; BANIKAZEMI, M. Fabry disease (alpha-galactosidase A deficiency): renal involvement and enzyme replacement therapy. **Contrib. Nephrol.** v. 139, p.174-92, 2001.

DESNICK, R.J.; SCHUCHMAN, E. H. Enzyme replacement and enhancement therapies: lessons from 20 lysosomal disorders. **Nat Rev Genet.** v. 3, p. 954-66, dec. 2002.

DEEGAN, P. B. et al. Natural history Fabry disease in females in the Fabry Outcome Survey. **J. Med. Genet.** v. 43, n.4, p. 347-52, apr. 2006.

DINGERMANN, T. Recombinant therapeutic proteins: production platforms and challenges. **J. Biotechnol.** v. 3, n. 1, p. 90-97, jan. 2008

ELAPRASE. Responsável técnico: Carla C. G. Chimikus Mugarte. Cambridge, MA. Shire Human Genetic Therapies Inc, 2013. Bula de remédio.

FABRAZYME. Responsável técnico: Márcia Regina Moscatelli. Cambridge, MA. Genzyme Corporation, 2006. Bula de remédio.

FABRY, H. An historical overview of Fabry disease. **J. Inherit. Metab. Dis.** v. 24, Suppl 2, p. 3-7, 2001.

GIBAS A. L. et al. Disease rarity, Carrier status and gender: a triple disadvantage for women with Fabry disease. **J. Genet. Couns.** v. 17, n. 6, p. 528-37, dec. 2008.

GIRALDO, P.; PEREZ-CALVO J. I. Gaucher's disease and other lysosomal diseases. **Med. Clin. (Barc.)** v. 117, n. 17, p. 660-1, nov. 2001.

GIUGLIANI, R., et al. Terapia de reposição enzimática para as mucopolissacarídeos I, II e VI: recomendações de um grupo de especialistas brasileiros. **Rev. Assoc. Med. Bras.** v. 56, n. 3, p. 271-7, may./jun. 2010.

GIUGLIANI, R., et al. História Natural e tratamento galsulfase na mucopolissacarídose VI (MPS VI, síndrome de Maroteaux-Lamy) -10-year follow-up de pacientes que anteriormente participaram de um estudo de levantamento de MPS VI. **American J. Med. Genet.** 2014.

HOFFMANN, B.; MAYATEPEK, E. Fabry disease—often seen, rarely diagnosed. **Dtsch. Arztebl. Int.** v. 106, n. 26, p. 440, jun. 2009.

JUNIOR, D. S., et al. Judicialização do acesso ao tratamento de doenças genéticas raras: a doença de Fabry no Rio Grande do Sul. **Revista Ciência & Saúde Coletiva**, 2012.

KAUR, R.; SEKHON, B. S. Enzyme as drugs: an overview. **J. Adv. Pharm. Technol. Res.** 2012.

KITAGAWA, T., et al. Non-invasive high-risk screening for Fabry disease hemozygotes and heterozygotes. **Pediatr. Nephrol.** v. 23, n. 9, p. 1461-71, sep. 2008.

KRESSE, H.; et al. Enzymic diagnosis of the genetic mucopolysaccharide storage disorders. **Methods Enzymol.** v. 83, p. 559-72. 1982.

KRUG, B. C. et al. The Management of Gaucher Disease in Developing Countries: A Successful Experience in Southern Brazil. **Public. Health. Genomics.** v. 13, n. 1, p. 27-33, 2009.

LACHMANN, R. H. et al. Massive hepatic fibrosis in Gaucher's disease: clinic-pathological and radiological features. **Q. J. M.** v. 92, n. 4, p. 237-44, apr. 2000.

LARRALDE, M.; LUNA, P. Fabry disease. In: Wolff K, Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrist BA, Paller A, Leffell DJ, editors. **Dermatol. Gen. Med.** New York: McGraw-Hill; 2007

LINTHORST, G. E. et al. Screening for Fabry disease using wholeblood spots fails to identify one-third of female carriers. **Clin. Chim. Acta.** v. 353, n. 1-2, p. 201-3, mar. 2005.

MACDERMOT, K. D.; HOLMES, A., Miners AH. Anderson-Fabry disease: clinical manifestations and impact of disease in a cohort of 60 obligate carrier females. **J. Med. Genet.** v. 38, n. 11, p. 769-75, nov. 2001.

MACHACZKA, M. et al. Treatment of multiple myeloma in patients with Gaucher disease. **Am. J. Hematol. Oncol.** v. 84, n. 10, p. 694-696, oct. 2009.

MALAJOVICH M. A. M., SOUZA CASTRO S. e DEUTSCHER E. **Biotechnol. ORT** Brasil, Rio de Janeiro. 2012.

MASSON, C, et al. Fabry disease: a review. **Joint. Bone. Spine.** v. 75, n. 5, p. 381-3, sep. 2004.

MEHTA, A. et al. Fabry disease defined: baseline clinical manifestations of 366 patients in the Fabry Outcome Survey. **Eur. J. Clin. Invest.** v. 34, n. 3, p. 236-42, mar 2004.

MEHTA, A. et al. History of lysosomal storage diseases: an overview. **Oxford Pharm. Genesis**; 2006. Chapter 1.

MEHTA, et al. Fabry disease: a review of current management strategies. **Q. J. M.** v. 106, n. 9, p. 641-59, sep. 2010.

MEIKLE, P. J. et al. Multiplex screening for lysosomal storage disorders (LSDs). **U.S. Patent.** 2012.

MICHELAKAKIS, H. et al. Plasma tumor necrosis factor- α (TNF- α) levels in Gaucher disease. **Acta Biochim Biophys.** V. 1317, n. 3, p. 219-22, dec. 1996.

MISTRY, P. K. A Practical Approach To Diagnosis And Management Of Gaucher's Disease. **Baillieres Clin. Haematol.** v. 10, n. 4, p. 817-38, dec 1997.

MOHRENSCHLAGER, M.; HENKEL, V.; RING, J. Fabry disease: more than angiokeratoma. **Arch. Dermatol.** v. 140, n. 12, p. 1526-8, dec. 2004.

MURAHOVSKI. Principais manifestações dos erros inatos do metabolismo **Pediatria, diagnóstico e tratamento**. 2013

NAGLAZYME. Novato, CA. BioMarin Pharmaceutical Inc, 2011. Bula de remédio.

NELSON J., et al. Incidence of the mucopolisaccharidoses in Western Australia. **Am J. Hum. Genet.** 2003

NEUFELD E. F.; MUENZER, J. The metabolic and molecular basis inherited disease. **N. Engl. J. Med.** v. 344, n. 3, p. 182-8, jan. 2001.

NORTHOVER, H.; COWIE, R. A.; WRAITH, J. E. Mucopolysaccharidosis type IV A (Morquio syndrome): a clinical review. **J. Inherit. Metab. Dis.** v. 344, n. 3, p. 182-8, jan 1996.

OLIVEIRA, M. C. L. A. et al. Clinical and nutritional aspects of Gaucher disease: prospective study of 13 children at a single center. **J. Pediat. (Rio J)**. v. 79, n. 6, p. 571-22, nov./dec.2002.

OLIVEIRA, F. L. Avaliação da qualidade de vida de pacientes com doença de gaucher, doença de fabry e mucopolissacaridoses. 2010.

PARKIN, J. L.; BRUNNING R. D. Pathology of the Gaucher cell. **Prog. Clin. Biol. Res.** v. 95 p.151-75, 1982.

PASTORES, G. M. et al. Therapeutic goals in the treatment og Gaucher disease. **Semin. Hematol.** v. 41, p. 4-14, oct 2004.

PINTO, L. L., et al. Expression of the disease on female carriers of X-linked lysosomal disorders: a brief review. **Orphanet J Rare Dis.** v. 28, p. 5-14, may 2010.

PLATT, F. M.; WALKEY, S. U. Lysosomal Disorders of the Brain Great Britain. **Oxford University Press**. 2004.

RODRIGUES, M. R.; SA MIRANDA M. C.; AMARAL O. Allelic frequency determination of the 24-bp chitotriosidase duplication in the Portuguese population by real-time PCR. **Blood Cells Mol. Dis.** v. 33, n. 3, p. 362-4, nov/dec 2004.

ROTH, J et al. Protein quality control: the who's who, the where's and therapeutic escapes. **Histochem. Cell Biol.** v. 129, p. 163-77, feb 2008.

SCHIFFMANN, R. et al. Enzyme replacement therapy improves peripheral nerve and sweat function in Fabry disease. **Muscle & nerve**, v. 28, n. 6, p. 703-710, dec 2003.

SCHWARTZ, I. V., et al. Clinical and biochemical studies in mucopolysaccharidosis type II carriers. **J. Inherit. Metab. Dis.** v. 32, n. 6, p. 732-8, dec 2009.

SEREGIN, S.; AMALFITANO, A. Gene therapy for lysosomal storage diseases: progress, challenges and future prospects. **Curr. Pharm Des.**, v. 17, n. 24, p. 2558-2574, 2011.

SIATSKAS, C.; MEDIN J. A. Gene therapy for Fabry disease. **J. Inherit. Metab. Dis.** v. 24, p. 25-41, 2001.

SIDRANSKY, E. Gaucher disease: complexity in a "simple" disorder. **Mol. Genet. Metab.** v. 83, n.1-2, p. 6-15, sep/oct 2004.

SILVA, L. H. PEREIRA da. Ciências biológicas e biotecnologia: realidades e virtualidades. **São Paulo Perspec.**, São Paulo , v. 14, n. 3, jul. 2000.

SOBREIRA, E. et al. Phenotypic and genotypic heterogeneity in Gaucher disease type 1: a comparison between Brazil and the rest of the world. **Mol. Genet. Metab.** v. 90, n. 1, p. 81-6, jan 2007.

STANKIEWICZ, P. Genoma, rearranjos genômicos e transtornos. **Trends in Genetics.** 2002

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Artmed, 2012. C. 9 p. 248.

TYLKI-SZYMANSKA, A.; METERA, M. Precocious puberty in three boys with Sanfilippo A (MPS IIIA). **J. Pediatr. Endocrinol. Metab.** v. 8, n. 4, p. 291-3, oct/dec 1995.

WEIDEMANN, F et al. Fibrosis: a key feature of Fabry disease with potential therapeutic implications. **Orphanet. J. Rare. Dis**, v. 8, p. 116, aug. 2013.

WEINREB, N. J, et al. Gaucher disease type 1: revised recommendations on evaluations and monitorind for the adult patients. **Semin. Hematol.** v. 41, p. 15-22, oct. 2004.

WRAITH J. E. Clinical presentation and follow-up of patients with the attenuated phenotype of mucopolysaccharidosis type I. **Acta Paediatr.** 2005

YAM, G. H. et al. Pharmacological chaperone corrects lysosomal storage in Fabry disease caused by trafficking-incompetent variants. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.** v. 290, p. 1076-82, apr. 2006

YOUNG, I. D., et al. A clinical and genetic study of Hunter's syndrome. **J. Med. Genet.** 2002

ZARATE, Y. A.; HOPKIN, R. J. Fabry's disease. **Lancet.** 2008.