

P. PORTO

**ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE**

Escola Superior de Saúde do Porto

Instituto Politécnico do Porto

Filipe Jorge Sales Almeida

Estudo de biomarcadores da doença de Niemann-Pick tipo C

Mestrado em
Bioquímica em Saúde

Março de 2019

Escola Superior de Saúde do Porto
Instituto Politécnico do Porto

Filipe Jorge Sales Almeida

**Estudo de biomarcadores da doença de
Niemann-Pick tipo C**

Dissertação submetida à Escola Superior de Saúde do Porto para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica em Saúde, realizada sob a orientação científica de Isaura Ribeiro, MSc e Dulce Quelhas, MSc Geneticistas laboratoriais da Unidade de Bioquímica Genética, Centro Genética Médica Jacinto Magalhães, Centro Hospitalar do Porto e institucional de Ricardo Ferraz, Professor do Departamento de Ciências Químicas e Biomoléculas da Escola Superior de Saúde do Porto, Politécnico do Porto.

Março de 2019

Agradecimentos

Quero agradecer à Professora Doutora Cristina Prudêncio e Professor Doutor Ricardo Ferraz e Professora Doutora Mónica Vieira por possibilitarem a realização deste trabalho no Centro de Genética Médica Jacinto Magalhães.

Às Doutoras Dulce Quelhas e Isaura Ribeiro, pela orientação durante toda esta etapa, assim como ao conhecimento transmitido.

A todos os restantes colaboradores do CGM pelo acolhimento, e com especial ênfase a todos os companheiros das horas de almoço.

A todos os colaboradores da empresa Maldral, com uma atenção muito especial para a Engenheira Ana Paula Sequeira, Damien Costa e Luís Coelho.

À Diana pela constante paciência e amor em todos os momentos.

E aos meus pais por possibilitarem todo o meu percurso académico e acreditarem sempre em mim.

Um sincero Obrigado a todos!

Filipe Sales

Resumo

A doença de Niemann-Pick tipo C (NPC) é uma patologia neurodegenerativa progressiva e transmissão autossômica recessiva. É classificada como uma doença rara apresentando uma prevalência estimada de 1 por cada 100000 nados vivos.

A doença de NPC é caracterizada por uma acumulação de colesterol e vários esfingolípidos no cérebro e nos órgãos viscerais, devido à perda funcional das proteínas NPC1 e/ou NPC2 envolvidas no tráfego de colesterol. Esta acumulação de colesterol constitui o *hallmark* patognomónico da doença.

A heterogeneidade clínica, associada a sinais e sintomas não específicos e que se sobrepõem com outras patologias, dificultam o diagnóstico, podendo levar a um longo atraso entre a apresentação dos sintomas iniciais e a confirmação laboratorial.

Até muito recentemente, o diagnóstico bioquímico desta patologia era efetuado com recurso à coloração de filipina. Apesar de durante muito tempo ter sido considerado *gold standard* para o diagnóstico de NPC, este ensaio apresenta limitações: i) implica uma colheita invasiva, pois pressupõe a realização de uma biópsia de pele; ii) morosidade, implica o tempo de cultura da biópsia; iii) tecnicamente exigente; iv) é um método qualitativo e pouco específico. O diagnóstico é posteriormente confirmado pela identificação de variantes patogénicas nos genes *NPC1* e *NPC2*.

Recentemente, e baseado na acumulação de lípidos que ocorre nesta patologia, nomeadamente esteróis, esfingolípidos e liso esfingolípidos, têm sido desenvolvidas novas abordagens de diagnóstico.

Este trabalho teve como objetivo primário a implementação de um teste rápido, quantitativo, sensível e robusto que permitisse o estudo dos biomarcadores Liso esfingomielina (LysoSM) e do seu análogo carboxilado, Liso esfingomielina-509 (LysoSM-509), recorrendo ao método de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em *tandem*, LC-MS/MS.

O estudo destes biomarcadores permitiu implementar um método complementar de diagnóstico para os doentes de NPC, além de permitir discriminá-los dos doentes com deficiência em Esfingomielinase Ácida (ASMD). Este método passou a ser utilizado como método de rastreio de primeira linha para estas duas patologias, ultrapassando

essencialmente as limitações dos tradicionais testes de diagnóstico, reduzindo o tempo de intervenção do operador, além do custo e tempo de resposta.

Palavras-chave

Niemann-Pick tipo C, espectrometria de massa, lisoesfingomielina, lisoesfingomielina, 509, deficiência em esfingomielase ácida.

Abstract

Niemann-Pick type C disease (NPC) is a progressive autosomal recessive neurodegenerative disease. It is classified as a rare disease presenting an estimated prevalence of 1 case per 100000 live births.

NPC disease is characterized by an accumulation of cholesterol and several sphingolipids in the brain and visceral organs due to a functional loss of the proteins involved in the cholesterol traffic, NPC1 and/or NPC2 proteins. This cholesterol accumulation constitutes the pathognomonic hallmark.

Clinical heterogeneity, associated with nonspecific signs and symptoms that overlap with other pathologies, complicates the diagnostic process, leading to a long delay between the initial symptom presentation and the diagnosis.

Until recently, the biochemical diagnosis of this pathology was made using filipin staining. This test was considered gold standard for the diagnosis of NPC for a long time, in spite of his limitations, since it is an invasive method and presupposes the accomplishment of a skin biopsy, in addition to being a technically demanding and time consuming test. The biochemical diagnosis is afterwards confirmed by the identification of pathogenic variants by sequencing the NPC1 and NPC2 genes.

Based on the accumulation of lipids that occurs in this pathology, specifically sterols, sphingolipids and lysosphingolipids, alternative approaches of diagnosis haven been developed.

This work had as its primary approach the implementation of a rapid, sensitive and robust test that allows the detection of Lysosphingomyelin (LysoSM) and its carboxylated analogue Lysosphingomyelin-509 (LysoSM-509) biomarkers by the analytical technique of liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, LC-MS/MS.

That biomarkers study allowed the discrimination between NPC patients and patients with Acid Sphingomyelinase deficiency (ASMD), and clearly distinguish them from control individuals. This procedure is now used as a first-line screening method for these two pathologies, essentially overcoming the limitations of traditional diagnostic tests, reducing operator intervention time, besides its costs and response time.

Keywords

Niemann-Pick type C, mass spectrometry, lysosphingomyelin, lysosphingomyelin-509, acid sphingomyelinase deficiency.

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract.....	iv
Índice	vi
Índice de Abreviaturas.....	viii
Índice de Figuras	xi
Índice de tabelas	xii

Capítulo I - Introdução

1.1. Unidade de Bioquímica Genética	2
1.2. Erros inatos do metabolismo.....	2
1.2.1. Doenças lisossomais de sobrecarga.....	3
1.2.1.1. Esfingolipidoses	4
1.3. Doença de Niemann-Pick	4
1.3.1. Deficiência em esfingomielinase ácida	5
1.3.2. Niemann-Pick tipo C	6
1.3.2.1. Patogénese.....	7
1.3.2.2. Apresentação clínica	8
1.3.2.3. Testes de diagnóstico	10
1.3.2.4. Monitorização e terapia.....	12
1.3.2.5. Uma nova era no diagnóstico de NPC	13

Capítulo II - Método analítico

2.1. Técnicas de quantificação de biomarcadores.....	17
2.2. Cromatografia líquida	17
2.3. Espectrometria de massa	18
2.3.1. Fonte de ionização por <i>eletrospray</i>	19
2.3.2. Analisador de massas triplo quadrupolo.....	19

2.4. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa	21
Capítulo III - Método experimental	
3.1. Equipamento, materiais e reagentes.....	23
3.2. Preparação de soluções	24
3.3. Doentes, controlos e amostras.....	25
3.4. Preparação de amostras de plasma humano a analisar	28
3.5. Condições cromatográficas e de espectrometria de massas.....	29
3.6. Análise estatística	30
Capítulo IV - Resultados e discussão	
4.1. Método analítico	33
4.2. Análise plasmática em amostras de plasma humano	36
4.2.1. População controlo / valores de referência.....	36
4.2.2. Doentes e portadores de Niemann-Pick tipo C.....	36
4.2.2.1. Suspeitas clínicas de Niemann-Pick tipo C.....	39
4.2.2.2. Relação genótipo-quitotriosidase-filipina-biomarcadores	40
4.2.2.3. Avaliação da utilidade de LysoSM e LysoSM-509 na monitorização terapêutica de doentes Niemann-Pick tipo C.....	42
4.2.3. Doentes e portadores de deficiência em esfingomielinase ácida.....	44
4.2.4. Outras patologias	46
Conclusões e perspetivas futuras.....	50
Referências Bibliográficas.....	51

Índice de Abreviaturas

7

7-KC – 7-Ketocholesterol

A

ACOX – Acyl-CoA oxidase

ASM – Esfingomielinase ácida (**Acid SphingoMyelinase**)

ASMD – Deficiência em esfingomielinase ácida (**Acid SphingoMyelinase Deficiency**)

C

C-Triol – Cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol

CGMJM – Centro de Genética Média Jacinto Magalhães

CTX – Xantomatose cerebrotênidosa (**CerebroTendineous Xanthomatosis**)

E

ER – Retículo endoplasmático (**Endoplasmatic Reticulum**)

ESI – Ionização por electrospray (**ElectroSpray Ionization**)

F

FD – Doença de Fabry (**Fabry Disease**)

G

GD – Doença de Gaucher (**Gaucher Disease**)

GM1 – Gangliosidose GM1

H

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (**High Performance Liquid Chromatography**)

I

IEM – Doença hereditária do metabolismo (**Inborn Error of Metabolism**)

K

KD – Doença de Krabbe (**K**rabbe **D**isease)

L

LC – Cromatografia líquida (**L**iquid **C**hromatography)

LC-MS/MS –Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry

LAL – Lipase ácida lisossomal (**L**ysosomal **A**cid **L**ipase)

LDL – Lipoproteínas de baixa densidade (**L**ow **D**ensity **L**ipoproteins)

LE/L – Endossoma tardio / lisossoma (**L**ate-**E**ndosome / **L**ysosome)

LoD – Limite de detecção (**L**imit of **D**etection)

LoQ– Limite de quantificação (**L**imit of **Q**uantification)

LSD – Doença lisossomal de sobrecarga (**L**ysosomal **S**torage **D**isorder)

LysoGb2 – Lisolactosilceramida (**L**yso**L**actosylceramide)

LysoSM – Lisoesfingomielina (**L**yso**S**phingomyelin)

LysoSM-509 – Lisoesfingomielina-509 (**L**yso**S**phingomyelin-509)

M

m/z – Razão massa/carga

MLPA – **M**ultiplex **L**igation-dependent **P**robe **A**mplification

MOM – Múltiplos da mediana (**M**ultiple **O**f **M**edian)

MRM – Monitorização de múltiplas reações (**M**ultiple **R**eaction **M**onitoring)

MS – Espectrometria de massa (**M**ass **S**pectrometry)

MS/MS – Espectrometria de massa sequencial

N

NPC – Niemann-Pick tipo C

NPD – Doença de Niemann-Pick (**N**iemann-**P**ick **D**isease)

P

PBD – Doença da biogénese peroxissomal (**P**eroxissomal **B**iogenesis **D**isorder)

PM – Membrana plasmática (**P**lasmatic **M**embrane)

R

RNA- Ácido Ribonucleico (**R**ibo**N**ucleic **A**cid)

Q

QC – Controlo de qualidade (**Q**uality **C**ontrol)

S

SL – Esfingolípidos (**S**phingolipids)

SMPD1 – Phosphodiesterase sphingomyelinase 1

U

UBG – Unidade de Bioquímica Genética

UPLC – Cromatografia líquida de ultra eficiência (**U**ltra **P**erformance **L**iquid **C**hromatography)

X

X-ALD – Adrenoleucodistrofia ligada ao cromossoma X (**X**-Linked adrenoleukodystrophy)

Índice de Figuras

Figura 1-1: Papel das proteínas NPC1 e NPC2.....	8
Figura 1-2: Estrutura química da lisoesfingomielina	14
Figura 2-1: Esquema de um sistema típico de cromatografia líquida	17
Figura 2-2: Esquema de um sistema típico de espetrometria de massa	18
Figura 2-3: Representação esquemática do modo operacional “product scan”	20
Figura 2-4: Representação esquemática do modo operacional “precursor scan”	20
Figura 2-5: Representação esquemática do modo operacional “MRM”	21
Figura 4-1: Separação cromatográfica dos compostos.....	35
Figura 4-2: Caixa e Whisker de concentrações plasmáticas de LysoSM e LysoSM-509 em controlos, heterozigóticos <i>NPC1</i> , e doentes NPC	37
Figura 4-3: Caixa e Whisker de concentrações plasmáticas de LysoSM e LysoSM-509 em doentes NPC, NPC < 9 anos e NPC > 9 anos.....	38
Figura 4-4: Caixa e Whisker de concentrações plasmáticas de LysoSM e LysoSM-509 em controlos, heterozigóticos <i>NPC1</i> , casos com apenas uma variante identificada e doentes NPC	40
Figura 4-5: Correlação da atividade enzimática da quitotriosidase e dos níveis plasmáticos de LysoSM e LysoSM-509 em função do tempo, em tratamento com Miglustat® em 2 doentes NPC.....	43
Figura 4-6: Caixa e Whisker de concentrações plasmáticas de LysoSM e LysoSM-509 em controlos, heterozigóticos <i>SMPDI</i> e doentes com ASMD.....	44
Figura 4-7: Caixa e Whisker de concentrações plasmáticas de LysoSM e LysoSM-509 em doentes com ASMD e doentes NPC.....	45
Figura 4-8: Correlação dos níveis plasmáticos de LysoSM e de LysoSM-509 em doentes NPC e doentes ASMD.....	46
Figura 4-9: Caixa e Whisker de concentrações plasmáticas de LysoSM e LysoSM-509 em controlos, doentes NPC, ASMD, Gaucher, Krabbe, Fabry, gangliosidose GM1, CTX, LAL e doenças peroxissomais.....	48

Índice de tabelas

Tabela 1-1: Classificação da doença de Niemann-Pick em 4 subgrupos	5
Tabela 1-2: Sumário dos sinais e sintomas da doença de NPC pela idade de início dos sintomas neurológicos	9
Tabela 3-1: Constituição kit para doseamento de LysoSM e LysoSM-509 no plasma	23
Tabela 3-2: Preparação das soluções de fortificação.....	24
Tabela 3-3: Preparação das soluções de calibração.....	25
Tabela 3-4: Descrição sumária dos doentes NPC	27
Tabela 3-5: Sumário das características dos indivíduos incluídos no estudo.....	28
Tabela 3-6: Parâmetros cromatográficos e de massas utilizados neste trabalho.....	29
Tabela 3-7: Parâmetros de deteção dos compostos.....	30
Tabela 4-1: Comparação dos biomarcadores avaliados com os fenótipos, genótipo e atividade da quitotriosidase.	40
Tabela 4-2: Concentrações plasmáticas de LysoSM e LysoSM-509	47

Capítulo I

Introdução

1.1. Unidade de Bioquímica Genética

A Unidade de Bioquímica Genética (UBG) do Centro de Genética Médica Jacinto Magalhães (CGMJM) é uma unidade transversal do Centro Hospitalar do Porto e desenvolve atividade de prestação de serviços no diagnóstico de doenças hereditárias do metabolismo (IEM) em período pré- e pós-natal, recorrendo frequentemente a metodologias de âmbito bioquímico e molecular. A melhoria contínua da qualidade dos serviços prestados depende da adequada articulação entre a atividade assistencial e as atividades de investigação e desenvolvimento.

1.2. Doenças hereditárias do metabolismo

As doenças hereditárias do metabolismo são um conjunto de patologias que resultam de anomalias numa determinada via metabólica. Atualmente, estão descritas centenas de IEM, as quais resultam da acumulação de substratos tóxicos para a célula ou que interferem com o seu normal funcionamento (J.-M. Saudubray & Sedel, 2009).

As IEM são individualmente raras, mas coletivamente estima-se uma prevalência de aproximadamente 1 caso por 2500 nados vivos (Applegarth, Toone, & Lowry, 2000). Contudo, este valor pode, ainda assim, estar subestimado quer pela coexistência de fenótipos atenuados de difícil diagnóstico, bem como pela inexistência de biomarcadores específicos, associado a limitações metodológicas para a deteção dos mesmos (Bonnot et al., 2014; Sedel et al., 2007).

A grande maioria das IEM está relacionada com deficiências enzimáticas ou em proteínas de transporte, e podem ser classificadas em duas grandes categorias. A categoria I abrange alterações que afetam apenas um sistema funcional ou um órgão e resultam numa apresentação clínica clássica, sendo por isso de mais fácil diagnóstico. A categoria II inclui patologias nas quais o defeito bioquímico básico afeta uma via metabólica comum a vários órgãos, originando alterações de síntese e catabolismo celular (Jean-Marie Saudubray & Garcia-Cazorla, 2018).

A apresentação clínica das patologias inseridas na categoria II é caracterizada por uma considerável variabilidade fenotípica, com as primeiras manifestações clínicas a poder ocorrer desde o período intrauterino, ou neonatal, até à idade adulta. Apesar da maioria deste tipo de patologias ser diagnosticada durante a infância, nos últimos anos tem-se assistido a uma crescente sensibilidade da comunidade clínica para variantes de início

tardio, com fenótipo clínico que engloba problemas cognitivos e psiquiátricos (Bonnot et al., 2014; J.-M. Saudubray, Sedel, & Walter, 2006).

Devido a uma grande diversidade de sintomas apresentados, foi necessária uma divisão da categoria II em 3 grupos úteis ao diagnóstico (Jean-Marie Saudubray & Garcia-Cazorla, 2018): o grupo 1 inclui doenças do metabolismo intermediário afetando pequenas moléculas; o grupo 2 inclui doenças que envolvem o metabolismo energético primário; e o grupo 3 inclui doenças envolvendo moléculas complexas. Este último grupo engloba alterações que resultam da síntese anormal, processamento, controlo de qualidade, ou catabolismo de moléculas complexas, as quais ocorrem em organelos específicos (mitocôndria, lisossomas, peroxissomas, retículo endoplasmático e aparelho de Golgi) (Jean-Marie Saudubray & Garcia-Cazorla, 2018). As doenças incluídas podem ser lisossomais, peroxissomais, congénitas da glicosilação, entre outras, e apresentam sintomas associados permanentes e muitas vezes de carácter progressivo.

1.2.1. Doenças lisossomais de sobrecarga

O lisossoma, organelo presente em todas as células nucleadas, é especializado no processamento de macromoléculas recebidas da via endocítica e biossintética. O interior possui um pH ácido, e é composto por enzimas hidrolíticas ativas, conhecidas como hidrolases que, juntamente com proteínas transportadoras da membrana (como NPC1 e NPC2), movimentam, degradam e reciclam produtos celulares. Um defeito neste processo leva à acumulação intra-lisossomal de substratos parcialmente metabolizados e à falta de outros, podendo resultar em doenças lisossomais de sobrecarga (Evans & Hendriksz, 2017; Saftig, 2006).

As doenças lisossomais de sobrecarga (LSD) são um grupo heterogéneo de aproximadamente 50 IEM, classificadas em diferentes grupos, como por exemplo, esfingolipidoses, mucopolissacaridoses, oligossacaridoses e defeitos de proteínas transportadoras. A maioria destas patologias tem um padrão de hereditariedade autossómica recessiva e é caracterizada por um fenótipo multissistémico (Bellettato, Hubert, Scarpa, & Wangler, 2018; Ferreira & Gahl, 2017).

Apesar de individualmente raras, as LSD apresentam uma prevalência combinada de 1:5000 nados vivos (Wraith, 2011). Contudo, a sua prevalência no norte de Portugal, 1:4000 nados vivos (Pinto et al., 2004), é ligeiramente superior à verificada em diferentes países, entre os quais República Checa (Poupětová et al., 2010), Austrália (Meikle,

Hopwood, Clague, & Carey, 1999) e Holanda (Poorthuis et al., 1999), podendo este desvio ser justificado pelo extensivo estudo de uma particular zona populacional (Pinto et al., 2004).

1.2.1.1. Esfingolipidoses

As esfingolipidoses são LSD caracterizadas pela acumulação de esfingolípido (SL) nos lisossomas, devido a um defeito de uma hidrolase lisossomal ou, em casos raros, de uma proteína ativadora necessária ao catabolismo destes compostos. Os SL são um componente essencial da bainha de mielina e do tecido neuronal, pelo que defeitos na sua degradação originam uma progressiva neuro degeneração (Bellettato et al., 2018; Piraud et al., 2018).

Este grupo é composto por diversas patologias, nomeadamente doença de Gaucher (GD), deficiência em esfingomielinase ácida (ASMD), doença de Fabry (FD), doença de Krabbe (KD) e gangliosidoses. Estas patologias, apesar de individualmente raras, apresentam uma prevalência combinada de 1 caso por 10000 nados vivos (Bellettato et al., 2018).

1.3. Doença de Niemann-Pick

No início do século passado, após os trabalhos pioneiros de Albert Niemann e de Ludwig Pick, o epónimo doença de Niemann-Pick (NPD) começou a ser empregue para designar um grupo heterogéneo de doenças autossómicas recessivas no qual ocorria hepatosplenomegalia por acumulação de lípidos, com ou sem envolvimento neurológico (revisto em Marie T. Vanier, 2010).

Vários anos depois, Crocker e Farber avaliaram 18 casos de NPD, evidenciando a elevada heterogeneidade da doença, e a associação da variabilidade da idade de início com a expressão clínica e também com o nível de acumulação de esfingomielina, lípido mais acumulado em vários tecidos, nomeadamente no fígado (Crocker & Farber, 1958). A elevada heterogeneidade clínica e bioquímica levou Crocker a sugerir a classificação da patologia em 4 subgrupos, A-D, baseando-se nas diferenças clínicas e químicas, como também na incidência geográfica (Crocker, 1961). Na tabela 1-1 são apresentados os 4 subgrupos, e as características de cada um, segundo a classificação de Crocker.

Tabela 1-1: Classificação da doença de Niemann-Pick em 4 subgrupos, segundo Crocker (adaptado de Crocker, 1961).

	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
	NPD “clássica” (6 famílias)	Elevado envolvimento visceral, normal SNC (3 famílias)	Curso moderado (3 famílias)	Grupo de “Nova Scotian” (4 famílias)
Aumento do baço e fígado	++++	++++	++	+++
Raio-X ao peito	++	++	0	0
Início dos sintomas do SNC	Início infância	Não visto dos 4-13 anos	Final infância	Início a meio idade infantil
Acumulação de lípidos	Sangue	++	++	0
	Tecidos	++++	++++	++
Idade da morte (anos)	1-2		3-5	12-20
Etnia	Maioria Judeu	Mistura	Não-Judeu	Católico

No simpósio internacional em Praga (1982), procedeu-se à reclassificação de NPD em dois grupos: o Grupo I incluía os tipos A e B, nos quais ocorria uma exorbitante acumulação de esfingomiélin, resultante de uma deficiência primária na esfingomiélinase – enzima de hidrólise da esfingomiélin; e o Grupo II, constituído pelos tipos C e D, passou a ser caracterizado por uma deficiente translocação de colesterol exógeno dos lisossomas para outros locais da membrana intracelular, com a inconsistente diminuição da atividade da esfingomiélinase a ser considerada um fenómeno secundário (Butler et al., 1987; Elleder, 1989; Pentchev et al., 1987). Atualmente, já não se justifica a existência do tipo D como uma identidade distinta (Marie T. Vanier, 2010).

De um ponto de vista prático, dar um diagnóstico de “doença de Niemann-Pick” sem especificação do subgrupo é manifestamente insuficiente, sendo necessário especificar se é uma deficiência em esfingomiélinase ácida, englobando os tipos A e B, ou Niemann-Pick tipo C (Marie T. Vanier, 2010).

1.3.1. Deficiência em esfingomiélinase ácida

A deficiência em esfingomiélinase ácida (ASMD; MIM *257200; MIM *607616), historicamente classificada como Niemann-Pick tipo A/B, (Edward H. Schuchman &

Desnick, 2017) é uma LSD autossômica recessiva causada por mutações no gene esfingomielinase fosfodiesterase 1 (*SMPDI*; MIM *607608).

O gene *SMPDI*, localizado na região cromossômica 11p15.4 (da Veiga Pereira, Desnick, Adler, Distèche, & Schuchman, 1991; E. H. Schuchman, Levrán, Pereira, & Desnick, 1992) é responsável pela codificação da enzima esfingomielinase ácida (ASM; EC 3.1.4.12), crucial para a degradação lisossomal de esfingomielina em ceramida e fosfocolina. A sua deficiência resulta na acumulação de esfingomielina e outros lípidos relacionados em diferentes órgãos, resultando em fenótipo clínico de ASMD (McGovern et al., 2017).

A ASMD apresenta uma prevalência estimada de entre 0.4 a 0.6 casos por 100000 nados vivos (Meikle et al., 1999; Pinto et al., 2004; Poorthuis et al., 1999), com o estudo da população do norte de Portugal a apresentar a maior prevalência, de 0.6 casos por 100000 nados vivos (Pinto et al., 2004).

Clinicamente, os dois tipos distinguem-se pela severidade da doença e presença ou ausência de sintomas neurológicos: o tipo A, uma forma severa na qual ocorre uma rápida e progressiva neurodegeneração levando a morte durante a infância; e o tipo B, uma forma crónica visceral progressiva, de início tardio, com ausência de sintomas neurológicos. Contudo, baseado na evidência presente nas últimas décadas, muitos doentes apresentam um fenótipo clínico intermédio, caracterizado por envolvimento multissistémico e regressão psicomotora progressiva lenta (McGovern et al., 2017, 2008; Pavlû-Pereira et al., 2005; Marie T. Vanier, 2010; Wasserstein & Schuchman, 1993).

O diagnóstico bioquímico de ASMD é realizado através da atividade enzimática da ASM nos leucócitos periféricos (Kampine, Bardy, Kanfer, Feld, & Shapiro, 1967) ou fibroblastos da pele cultivados, e confirmado pela presença de variantes patogénicas no gene *SMPDI*.

De momento, não se encontra disponível tratamento para a ASMD, no entanto encontram-se em curso ensaios clínicos para uma terapia de substituição enzimática (NCT 00410566).

1.3.2. Niemann-Pick tipo C

Niemann-Pick tipo C (NPC; MIM *257220; MIM *607625) é uma doença rara progressiva com um padrão de hereditariedade autossômico recessivo, caracterizado por

mutações nos genes *NPC1* (MIM *607623) ou *NPC2* (MIM *601015) (Carstea et al., 1997; Geberhiwot et al., 2018; Naureckiene et al., 2000).

O gene *NPC1*, localizado na região cromossômica 18q11, está envolvido em 95% das famílias com NPC, e o gene *NPC2* (14q24.3) apenas engloba as restantes 5% (Carstea et al., 1997; Geberhiwot et al., 2018; Naureckiene et al., 2000). Estes genes codificam proteínas transportadoras de membrana: NPC1 (Neufeld et al., 1999), uma proteína do lisossoma/endossoma tardio, que se liga à membrana, e NPC2 (Friedland, Liou, Lobel, & Stock, 2003), uma proteína solúvel de ligação ao colesterol.

Classificada como doença rara, NPC apresenta uma prevalência estimada de 1 caso por 100000 nados vivos (Geberhiwot et al., 2018). Contudo, a prevalência observada em Portugal, 2.2 casos por 100000 nados vivos (Pinto et al., 2004), é mais elevada do que em outros países (Al-Jasmi et al., 2012; Meikle et al., 1999; Poorthuis et al., 1999; Poupětová et al., 2010), o que não é explicada por uma mutação frequente. A maior prevalência, tal como as das LSD em geral, poderá ser explicada por um extensivo estudo de uma particular área populacional (Pinto et al., 2004).

1.3.2.1. Patogénese

Bioquimicamente, a doença de NPC é caracterizada por uma anomalia no tráfego de colesterol, com a sua conseqüente acumulação, seguindo-se uma acumulação secundária de outros lípidos, incluindo esfingolípidos, no cérebro e nos órgãos viscerais.

O colesterol é um componente crucial da membrana celular, com importantes papéis estruturais e funcionais, regulando várias vias de sinalização e funções celulares. A sua obtenção celular resulta de síntese endógena, no retículo endoplasmático (ER) e de *uptake* de lipoproteínas de baixo peso molecular (LDL), e exógena, via recetores LDL (Arenas, Garcia-Ruiz, & Fernandez-Checa, 2017).

As LDL que entram na célula por via endocítica são hidrolisadas nos endossomas-tardios/lisossomas (LE/L) pela lipase ácida lisossomal (LAL), libertando colesterol livre. Em condições normais, a proteína NPC2 liga-se inicialmente à cadeia hidrofóbica do colesterol não esterificado, cedendo posteriormente a molécula ao domínio N-terminal da NPC1, que vai inserir o colesterol na membrana lisossomal, distribuindo-o primariamente para a membrana plasmática (PM) como também para o retículo endoplasmático (ER) (figura 1-1). Contudo, o mecanismo específico pela qual a NPC1 participa na saída de

colesterol do LE/L para o ER e para a PM não está totalmente esclarecido (Vance & Karten, 2014, p. 2; Marie T. Vanier, 2010).

A perda funcional de qualquer uma destas proteínas leva à acumulação progressiva de colesterol e vários esfingolípidos nos compartimentos intracelulares dos LE/L (Kwon et al., 2009; Sleat et al., 2004; Marie T. Vanier, 2015). Devido a essa acumulação, a subsequente indução de todas as LDL mediadas homeostaticamente pelo colesterol vai apresentar uma resposta tardia nas células deficientes em NPC (Marie T. Vanier, 2010). Esta anomalia constitui o *hallmark* celular da doença.

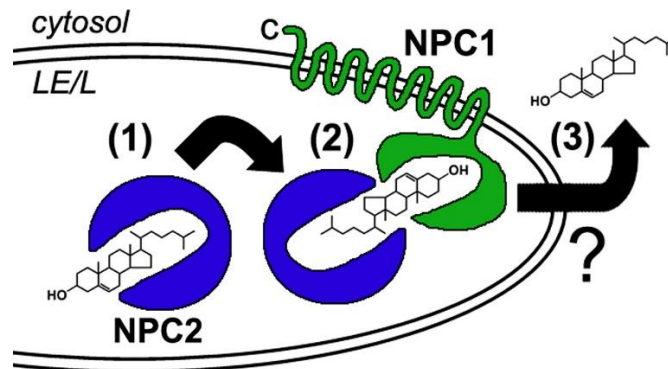


Figura 1-1: Papel das proteínas NPC1 e NPC2 no transporte de colesterol livre nos endossomas-tardios/lisossomas (Peake & Vance, 2010).

Apesar das proteínas NPC1 e NPC2 terem, aparentemente, uma distribuição ubiquitária, as consequências mais devastadoras da deficiência em NPC ocorrem, tipicamente, no cérebro.

O sistema nervoso central é impermeável às lipoproteínas plasmáticas, devido à barreira hematoencefálica, pelo que praticamente todo o colesterol existente no cérebro é produzido localmente, por síntese *de novo*. No entanto, os neurónios também adquirem colesterol, parcialmente, por entrega glial, particularmente pelos astrócitos, através de endocitose de uma proteína Apo-E-colesterol-fosfolípido (Vance, 2012). Esta particular fonte de colesterol não necessita de LAL, mas continua a necessitar das proteínas NPC1 e NPC2 funcionais (Marie T. Vanier, 2015).

1.3.2.2. Apresentação clínica

A apresentação clínica e a esperança de vida dos doentes com NPC são altamente heterogêneas, variando de acordo com a idade de início da doença, podendo mesmo diferir entre indivíduos com genótipos similares (Marie T. Vanier et al., 2016).

Os sinais e sintomas podem ser agrupados em três grupos: visceral, neurológico e psiquiátrico, mas em termos práticos, e segundo as orientações clínicas mais recentes, a doença de NPC deve ser classificada de acordo com a idade de início dos sintomas neurológicos (Geberhiwot et al., 2018), uma vez que se relacionam diretamente com a severidade da doença e com a esperança de vida (Marie T. Vanier, 2010).

Com base na idade de início dos sintomas neurológicos é possível distinguir 4 subgrupos da doença: infantil precoce (< 2 anos), infantil tardia (2-6 anos), juvenil (6-15 anos) e adolescente/adulta (>15 anos).

Na tabela 1-2 encontram-se sumarizadas as manifestações sistêmicas e neurológicas/psiquiátricas presentes em cada subgrupo.

Tabela 1-2 Sumário dos sinais e sintomas da doença de Niemann-pick tipo C (NPC) pela idade de início dos sintomas neurológicos (retirado de Geberhiwot et al., 2018)

Age of onset	Systemic manifestations	Neurological/psychiatric manifestations
Pre/peri-natal (< 2 months)	Foetal ascites/hydrops Hepatosplenomegaly Cholestatic jaundice Thrombocytopenia Pulmonary disease Liver failure Failure to thrive	Hypotonia
Early-infantile (2 m to < 2 yrs.)	Hepatosplenomegaly or Splenomegaly (isolated or with neurological manifestations) Prolonged neonatal jaundice	Central hypotonia Delayed developmental motor milestones, speech delay Dysphagia, spasticity VSGP
Late-infantile (2 to 6 yrs.)	Hepatosplenomegaly or Splenomegaly (isolated or with neurological manifestations) History of prolonged neonatal cholestatic jaundice	Developmental delay/regression, speech delay Clumsiness, Frequent falls, Progressive ataxia, dystonia, dysarthria, dysphagia Seizures (partial/generalized) Cataplexy VSGP Hearing loss

Juvenile (6 to 15 yrs.)	Hepatosplenomegaly or Splenomegaly (isolated or with neurological manifestations; often not present)	Poor school performance, learning disability. Loss of language skill Frequent falls, clumsiness Progressive ataxia, dysarthria, dystonia, dysmetria, dyskinesia, dysphagia VSGP Gelastic cataplexy Seizures Behavioural problems
Adolescent/adult (> 15 yrs.)	Splenomegaly (often not present; isolated in very rare cases)	Cognitive decline, dementia, learning disability Psychiatric signs. Schizophrenia (psychosis), depression Clumsiness, progressive motor symptoms, tremor, ataxia, dystonia/dyskinesia, dysarthria, dysphagia VSGP

Como descrito na tabela, nas formas clínicas tardias (juvenil e adolescente/adulta) o envolvimento sistémico é ligeiro, podendo em muitos casos estar ausente.

Os doentes com idade de início pré/neo-natal (<2 meses) apresentam manifestações sistémicas severas, incluindo ascite fetal, colestase neonatal, hepatoesplenomegalia, doença pulmonar, falha hepática e/ou respiratória, entre outros, o que leva à morte nos primeiros meses de vida, mesmo antes do aparecimento dos sintomas neurológicos.

A apresentação clinicamente heterogénea da patologia, associada a sinais e sintomas não específicos complica o processo de diagnóstico, podendo levar a um longo atraso na sua identificação (Geberhiwot et al., 2018; Patterson et al., 2012).

1.3.2.3. Testes de diagnóstico

À semelhança de outros laboratórios de referência no diagnóstico de LSD e mais especificamente em NPC, esta patologia é estudada com recurso à coloração com filipina e confirmada pela identificação de variantes patogénicas, por sequenciação dos genes *NPC1* e *NPC2*.

Coloração com filipina

A filipina é um antibiótico polieno fluorescente que se liga especificamente ao colesterol, mas não a esteróis esterificados. Desenvolvido há cerca de 30 anos (Kruth et al., 1986), este teste permitiu a distinção de três fenótipos bioquímicos: clássico, intermédio e

variante, com base na acumulação de colesterol não esterificado visualizado pela coloração com filipina.

Na forma clássica ocorre uma acumulação massiva de colesterol, que é intensamente corado pela filipina, ao contrário da forma variante, na qual ocorre uma menor acumulação. Esta última, é frequente em formas neurológicas presentes em adultos e jovens, raro em formas infantis tardia e nunca descrita em formas infantis precoce (M. T. Vanier et al., 1991).

Por muito tempo classificado como o ensaio *gold standard* para o diagnóstico de NPC, este teste não é atualmente considerado de primeira linha, uma vez que é um método invasivo, sendo necessária a realização de uma biópsia de pele, sendo além do mais uma metodologia tecnicamente exigente e morosa, apenas realizada em centros de referência especializados. Apresenta ainda como limitações a sua falta de especificidade, dando origem a falsos positivos, além de apresentar falta de sensibilidade nas formas cujo fenótipo bioquímico é classificado como variante (Patterson et al., 2017; Marie T. Vanier et al., 2016).

Sequenciação dos genes *NPC1* e *NPC2*

A identificação de variantes genéticas patogénicas nos dois alelos, seja no gene *NPC1* ou no gene *NPC2*, confirma o diagnóstico de NPC. No entanto, em 10 a 15% dos casos de NPC não são identificadas variantes genéticas patogénicas nos dois alelos, sendo necessário recorrer a testes complementares, nomeadamente estudos de RNA e *multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA) para detetar alterações intrónicas ou deleções não detetadas na sequenciação de Sanger (Patterson et al., 2017).

De salientar que, a sequenciação dos genes, é também o único método que permite identificar os heterozigóticos (portadores da doença), e é também o método de eleição para o diagnóstico pré-natal.

Até à data estão descritas mais de 700 variantes no gene *NPC1*, sendo que 400 são consideradas patogénicas. Tendo em conta a panóplia de variantes patogénicas, torna-se difícil estabelecer uma relação genótipo/fenótipo, contudo, nas últimas orientações, foram enumerados, alguns aspetos relevantes da relação genótipo-fenótipo (Geberhiwot et al., 2018):

- A presença em ambos os alelos de variantes patogénicas severas (*frameshift*, *nonsense*, *large deletion*) está geralmente relacionada com um fenótipo clínico de doença neurológica presente na forma infantil precoce;
- A variante genética p.I1061T (*NPCI*), quando em homozigotia, está associada a fenótipo juvenil de início de sintomas neurológicos;
- A p.P1007A (*NPCI*) aparenta estar relacionada com formas juvenis ou adultas, mesmo se só presente em um único alelo.
- Está descrito um elevado número de alterações *missense* no gene *NPCI* associadas a formas neurológicas de início tardio, mesmo estando em heterozigotia.

1.3.2.4. Monitorização e terapia

A monitorização da resposta terapêutica é realizada, com recurso ao ensaio da atividade enzimática da quitotriosidase.

A quitotriosidase é uma quitinase maioritariamente produzida pela ativação dos macrófagos, seja em condições normais ou patológicas (Hollak, van Weely, van Oers, & Aerts, 1994). A sua atividade encontra-se também aumentada na maioria das esfingolipidoses, com especial ênfase na doença de Gaucher. Contudo, nas formas atenuadas de NPC, a atividade da quitotriosidase pode encontrar-se normal, evidenciando a falta de especificidade como biomarcador para esta patologia.

Embora não exista atualmente uma terapêutica específica para a doença de NPC, os doentes afetados podem beneficiar de terapêutica sintomática assim como de agente modificador do curso da doença, mais concretamente dos sintomas neurológicos. O Miglustat® é, até à data, a única terapêutica licenciada pela União Europeia para o tratamento dos sintomas neurológicos nos doentes com NPC, não existindo ainda assim consenso por parte da comunidade científica de que todos os doentes beneficiem desta terapia (Geberhiwot et al., 2018).

Estão em curso novos ensaios clínicos promissores com vista a testar a segurança e eficácia de preparações intravenosas de hidroxipropil-B-ciclodextrina (NCT 01747135) e Arimoclomol® oral (NCT 02612129). Outras terapêuticas estão a ser testadas, mas ainda em fases incipientes (Geberhiwot et al., 2018).

Diagnóstico pré-natal

O diagnóstico pré-natal deve ser oferecido a todos os casais com risco de transmissão da patologia à descendência, sendo estes devidamente aconselhados por especialistas na área (Geberhiwot et al., 2018). A sequenciação dos genes *NPC1* e *NPC2* é o método recomendado para o diagnóstico pré-natal.

1.3.2.5. Uma nova era no diagnóstico de NPC

Oxiesteróis

O defeito nas proteínas transportadoras, NPC1 ou NPC2, que ocorre em NPC leva à acumulação de lípidos lisossomais, os quais são acompanhados de stress oxidativo celular e um subsequente aumento de produtos de oxidação de colesterol formados não enzimaticamente (Fu, Yanjanin, Bianconi, Pavan, & Porter, 2010; Porter et al., 2010; Zampieri et al., 2009).

Estes produtos de oxidação do colesterol, designados por oxiesteróis têm sido extensivamente estudados como biomarcadores de NPC (Boenzi et al., 2016, 2014; Hammerschmidt et al., 2018; Jiang et al., 2011; Kannenberg et al., 2017; Klinke et al., 2015; Lin et al., 2014; Pajares et al., 2015; Pataj, Liebisch, Schmitz, & Matysik, 2016; Polo et al., 2016; Ribas et al., 2016; Romanello et al., 2016; Voorink-Moret et al., 2018; Zhang et al., 2014). Em particular, dois oxiesteróis, *cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol* (C-Triol) e *7-ketocholesterol* (7-KC) foram identificados e propostos como biomarcadores da patologia (Jiang et al., 2011; Porter et al., 2010), apesar de nenhum deles ser específico para NPC.

Além de ocorrer uma sobreposição em alguns doentes com fenótipo bioquímico denominado “variante” com controlos e heterozigóticos para *NPC1/NPC2*, foi também descrito (Romanello et al., 2016) um aumento de C-triol na deficiência em LAL e na xantomatose cerebrotendinosa (CTX), doenças do metabolismo do colesterol, e em ASMD (Pajares et al., 2015). O 7-KC, um produto ainda menos específico, para além das patologias já referidas anteriormente, encontra-se também elevado em defeitos da síntese do colesterol (síndrome Smith-Lemli-Opitz), mucopolidoses, doenças peroxissomais, e indivíduos com doença colestática (Björkhem et al., 2014; Boenzi et al., 2016; Jiang et al., 2011; Klinke et al., 2015; Lin et al., 2014; Pataj et al., 2016; Polo et al., 2016; Ribas et al., 2016; Romanello et al., 2016).

Esfingolípido

A acumulação de SL, apesar de ser um processo secundário, nos doentes com NPC, tem um papel relevante não só nesta patologia, mas também na neuropatologia de diversas LSD, contribuindo para a cascata de eventos patológicos (Marie T. Vanier, 2015).

Os lisoesfingolípido, formas deacetiladas dos SL, contêm um grupo amina livre que é possivelmente a função responsável pela patogenicidade destes compostos. Com o desenvolvimento de novos métodos analíticos, assumiram um papel relevante como biomarcadores para o diagnóstico e monitorização da resposta terapêutica de diversas esfingolipidoses (Piraud et al., 2018).

Um ligeiro aumento de lisoesfingomielina (LysoSM) (Welford et al., 2014) e um aumento mais significativo da sua forma carboxilada, lisoesfingomielina-509 (LysoSM-509) (Giese et al., 2015) foram observados no plasma de indivíduos com NPC, confirmando o seu potencial como biomarcadores de diagnóstico da patologia (Kuchar et al., 2017; Pettazzoni et al., 2017; Polo et al., 2017; Voorink-Moret et al., 2018). LysoSM-509 está também aumentada nos doentes com ASMD, contudo o aumento de LysoSM nestes doentes é muito mais significativo quando comparado com o que acontece nos doentes de NPC. Esta constatação mostra que a quantificação dos dois parâmetros, e a razão LysoSM-509/LysoSM é muito importante para o diagnóstico de NPC. É também importante de salientar, que a disponibilidade de ensaio da atividade enzimática de ASM facilita o diagnóstico de ASMD.

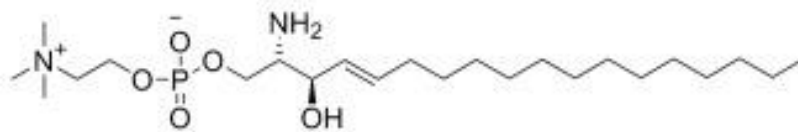


Figura 1-2: Estrutura química da lisoesfingomielina (LysoSM) (Welford et al., 2014).

Um ligeiro aumento destes biomarcadores parece estar também presente nos doentes de Gaucher, patologia inserida no grupo das esfingolipidoses (Pettazzoni et al., 2017) e na deficiência em LAL (Pettazzoni et al., 2017; Polo et al., 2017; Voorink-Moret et al., 2018), no entanto a concentração dos biomarcadores não aparenta interferir no diagnóstico de NPC.

Segundo as últimas recomendações de diagnóstico, embora não exista um único biomarcador específico para a doença de NPC, a combinação da quantificação dos produtos de oxidação do colesterol em conjunto com a dos esfingolípidos, pode melhorar a especificidade do diagnóstico (Patterson et al., 2017).

Capítulo II

Método analítico

2.1. Técnicas de quantificação de biomarcadores

Nos últimos anos têm sido descritas várias técnicas de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa, para quantificação de biomarcadores com o intuito de diagnóstico e monitorização da resposta terapêutica de diversas esfingolipidoses (Piraud et al., 2018).

2.2. Cromatografia líquida

A cromatografia líquida (LC) é um método físico que permite a separação e identificação de compostos presentes numa matriz complexa. A cromatografia líquida de alta/ultra eficiência (HPLC/UPLC) é assim designada pois permite a utilização de colunas cromatográficas de alta/ultrapressão de forma a obter uma melhor separação dos compostos pretendidos.

Um sistema de HPLC/UPLC inclui um sistema de distribuição de solventes, uma seringa de injeção da amostra, uma coluna de alta/ultrapressão, um detetor e um sistema de controlo e aquisição de dados (figura 2-1).

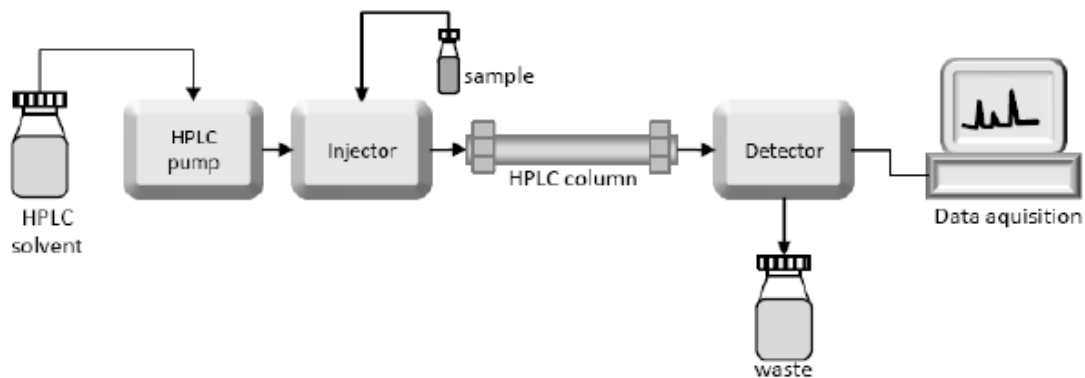


Figura 2-1: Esquema de um sistema típico de cromatografia líquida de alta eficiência (Czaplicki, 2013).

A separação cromatográfica ocorre pela interação entre os analitos na amostra e as duas fases imiscíveis que compõem uma cromatografia, a fase móvel e a fase estacionária. A fase estacionária encontra-se imóvel, dentro da coluna, enquanto que a amostra diluída na fase móvel (eluente) é forçada a atravessá-la. A escolha das fases móveis é realizada de modo a que os analitos presentes na amostra tenham solubilidades diferentes para cada fase, o que por migração diferencial leva os compostos a separarem-se, podendo ser posteriormente analisados qualitativa ou quantitativamente.

O cromatograma é a representação gráfica da variação, em função do tempo, da amostra de analito que é expelida da coluna cromatográfica com a fase móvel. O tempo de retenção e a área do pico, presentes no cromatograma, permitem a identificação e quantificação do composto alvo.

A representação gráfica provém de um sinal elétrico emitido pelo detetor e reconstituído computacionalmente em valores. Existem vários detetores que podem ser adaptados, como é o caso dos espectrómetros de massa.

2.3. Espectrometria de massa

A espectrometria de massa (MS) é um método analítico altamente específico e sensível, baseado na determinação de massas atómicas ou moleculares de compostos individualizados, presentes numa matriz complexa. É um método qualitativo, possibilitando a identificação estrutural de compostos, mas é também um método quantitativo.

Um espectrómetro de massa moderno típico é composto por um sistema de introdução da amostra, uma fonte de ionização, um analisador de massa, um detetor de iões e um sistema de controlo e aquisição de dados (figura 2-2).

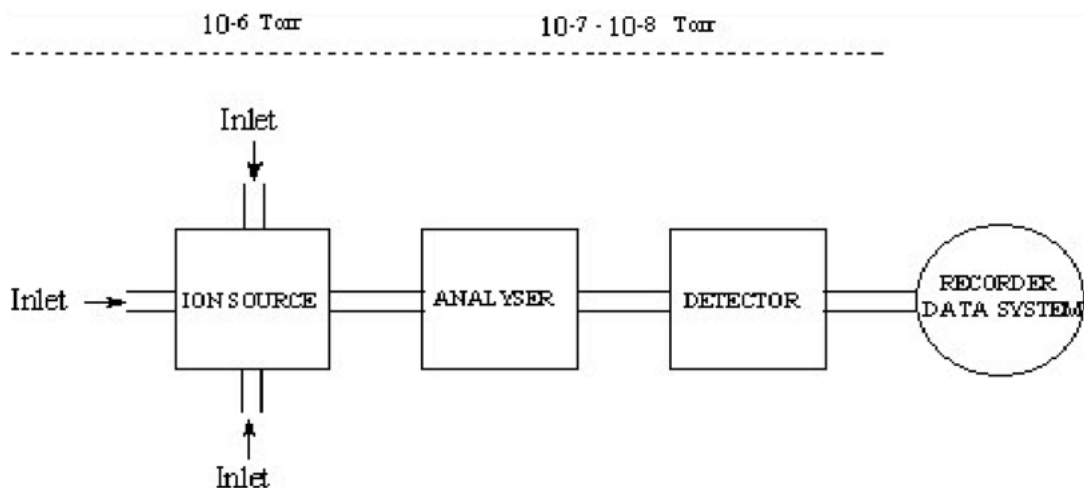


Figura 2-2: Esquema de um sistema típico de espectrometria de massa e correspondentes níveis de vácuo habituais (Vairamani, 2003)

A possibilidade de utilização de diferentes fontes de ionização e analisadores de massa possibilita a adaptação a cada método, assim como às propriedades físico-químicas de

cada analito. As fontes de ionização por *eletrospray* (ESI) e os analisadores triplo quadrupolo são usualmente os mais utilizados para quantificação de analitos.

2.3.1. Fonte de ionização por *eletrospray*

Todo este processo começa com a introdução da amostra líquida na fonte de ionização através de um tubo capilar ao qual é aplicado uma diferença de potencial, criando um campo elétrico forte. Esse campo elétrico promove a acumulação de cargas à superfície do líquido, no final do capilar, formando um cone de Taylor que vai libertar gotas altamente carregadas.

Um gás inerte, denominado gás de desolvatação é introduzido com o intuito de remover as moléculas de solvente, aumentando assim a carga por unidade de volume das gotas, as quais começam a alongar e formam um novo cone de Taylor, originando gotas cada vez mais pequenas, mas mais carregadas. Este processo contínuo de evaporação de solvente vai continuar até à desadsorção dos iões da superfície do líquido, passando estes pelo cone de extração e seguidamente para o analisador.

A ESI é considerada uma fonte de ionização suave, na qual é usada relativamente pouca energia, não ocorrendo, normalmente, fragmentação do analito. É uma técnica extremamente versátil, pois a possibilidade de aplicar uma diferença de potencial positiva ou negativa permite a produção de catiões no modo positivo (ESI+) ou de aniões no modo negativo (ESI-).

2.3.2. Analisador de massas triplo quadrupolo

Após a formação de iões na fonte de ionização, estes são separados, no analisador, de acordo com a sua razão massa-carga (m/z), propriedade física dos iões que é medida, e das fragmentações/transições específicas, ou seja, o específico par ião precursor-ião produto resultante. Cada transição é considerada uma assinatura para o analito medido, o que torna esta técnica tão específica e sem risco de grandes interferências (Piraud et al., 2018).

Um analisador quadrupolo usa a estabilidade da trajetória em campos magnéticos oscilantes para separar os iões. O quadrupolo consiste em 4 barras metálicas cilíndricas e perfeitamente paralelas. Uma combinação de constantes e variadas voltagens permitem a transmissão de uma restrita banda de valores m/z ao longo do eixo.

O triplo quadrupolo é composto por quadrupolos em sequência (MS/MS) de modo a aumentar a versatilidade e especificidade da análise. O quadrupolo central, denominado “célula de colisão”, permite a fragmentação de iões, por parte de um gás de colisão, sendo então essas frações resultantes analisadas no terceiro quadrupolo.

A versatilidade dos triplos quadrupolos permite a utilização dos quadrupolos em dois modos, estático ou dinâmico. O modo estático permite a seleção de um determinado ião, enquanto que o modo dinâmico permite a passagem de todos os iões. Estes dois modos combinados permitem a utilização de vários modos operacionais:

Product scan

Neste modo, o primeiro quadrupolo encontra-se em modo estático, permitindo a passagem apenas do ião selecionado, o qual vai colidir no quadrupolo central e criar diversos fragmentos, produtos da reação, que vão ser todos analisados no terceiro quadrupolo, operando em modo dinâmico (figura 2-3). Este modo possibilita a identificação de todos os iões produtos resultantes de um determinado ião precursor.

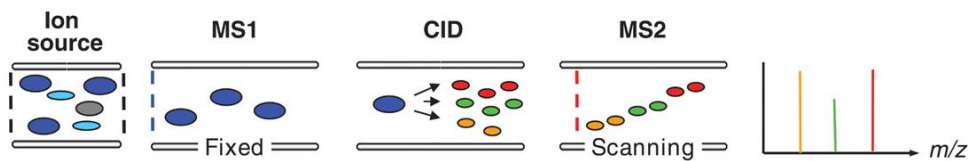


Figura 2-3: Representação esquemática do modo operacional “product scan” (Domon & Aebersold, 2006).

Precursor scan

Precursor scan funciona com o primeiro quadrupolo em modo dinâmico e o terceiro em modo estático (figura 2-4). Este modo permite identificar todos os iões precursores que dão origem a um determinado ião produto.

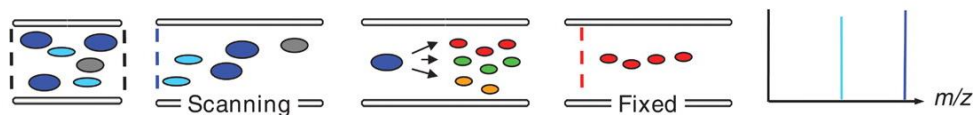


Figura 2-4: Representação esquemática do modo operacional “precursor scan” (Domon & Aebersold, 2006).

Multiple reaction monitoring

Multiple reaction monitoring (MRM) é o modo que garante mais versatilidade e especificidade necessária à quantificação de analitos pretendidos. Tanto o primeiro quadrupolo como o terceiro funcionam em modo estático, detetando assim apenas o íon precursor e o seu fragmento específico (figura 2-5).

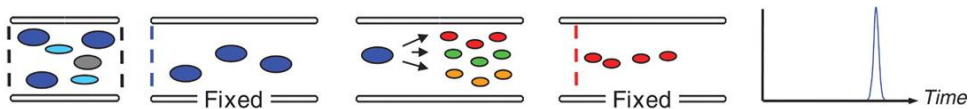


Figura 2-5: Representação esquemática do modo operacional “MRM” (Domon & Aebersold, 2006).

É possível monitorizar e quantificar diferentes íões e fragmentações em simultâneo, o que torna este modo extremamente útil à quantificação, em simultâneo, de vários biomarcadores.

2.4. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa é uma metodologia que tem vindo a ganhar muita popularidade para a análise de biomarcadores, com diversas e variadas técnicas reportadas com o intuito de simplificar e aprimorar o diagnóstico preciso para algumas patologias.

Este acoplamento combina a capacidade exímia de análise da espectrometria de massa com a separação física fornecida pela cromatografia líquida.

Na análise de amostras biológicas ocorre muitas vezes efeitos de matriz causados por outros compostos presentes na amostra (matrizes complexas) ou pelo método de preparação da amostra. A utilização de um padrão interno adequado permite, geralmente, a correção desse efeito, com a concentração do analito a ser proporcional à razão sinal analito/padrão interno.

Capítulo III

Método experimental

3.1. Equipamento, materiais e reagentes

Equipamento

As análises de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa tandem (LC-MS/MS) foram realizadas num cromatógrafo de ultra eficiência (UPLC), modelo Acquity Ultra Performance LC™, da marca Waters (USA) e um espectrómetro de massas, modelo TQ Detector, também da marca Waters, equipado com uma sonda do tipo ESI. A coluna cromatográfica utilizada foi uma Mediterrânea Sea C18, 5 µm 2.1x150 mm, da marca Teknokroma. Estes equipamentos encontravam-se associados ao software MassLynx, versão 4.1 da marca Waters.

Materiais

Para a preparação das amostras a injetar no LC-MS/MS foram utilizadas duas centrífugas, uma Eppendorf modelo 5417 R e uma Hereaus modelo Megafuge 1.0 R, um vortex da marca Heidolph modelo REAX 2000, micropipetas automáticas e respetivas pontas.

Reagentes

Para este trabalho foi utilizado um kit desenvolvido pela empresa Maldral Scientia® que permitiu o doseamento dos compostos LysoSM e LysoSM-509 no plasma recorrendo à técnica de LC-MS/MS.

A constituição do kit encontra-se descrita na tabela 3-1.

Tabela 3-1 Constituição do kit para doseamento de LysoSM e LysoSM-509 no plasma.

Artigo	Descrição	Quantidade
VA-LYSSM01001	Solução padrão LysoSM 10 mg/l	2 ml
VA-LYSSM01002	Padrão Interno (Lyso Gb2)	20 ml
VA-LYSSM01003	Reagente 1	60 ml
VA-LYSSM01004	Reagente 2	50 ml
VA-LYSSM01005	Reagente 3	100 ml
VA-LYSSM01006	Reagente 4	30 ml
VA-LYSSM01007	Fase móvel A	1000 ml
VA-LYSSM01008	Fase móvel B	1500 ml
VA-LYSSM01009	Solução de lavagem “Weak” e “Seal”	500 ml
VA-LYSSM01010	Solução de lavagem “Strong”	500 ml

VA-LYSSM01011	Coluna	1 unidade
VA-9.407700	Microtubos	200 unidades
VA-VZM-1509CC-100	Vials	200 unidades
VA-TR400026	Tampas de vials	200 unidades

3.2. Preparação de soluções

A preparação das soluções foi realizada de acordo com o manual de utilizador da técnica desenvolvida pela empresa.

A partir da solução padrão primária de LysoSM foram preparadas 2 soluções intermédias.

Soluções padrão intermédias I e II

A solução padrão intermédia I foi preparada adicionando 50 µl da solução padrão primária a um balão volumétrico de 5 ml, perfazendo-o com reagente 1.

A solução padrão intermédia II foi preparada adicionando 500 µl da solução padrão primária a um balão volumétrico de 5 ml, perfazendo-o com reagente 1.

Soluções padrão de fortificação

Partindo da solução padrão primária e das soluções padrão intermédias I e II, obtiveram-se 7 soluções padrão de fortificação, a diferentes concentrações. O procedimento encontra-se detalhado na tabela 3-2.

Tabela 3-2: Preparação das soluções de fortificação, incluindo quantidade de solução e solvente a pipetar juntamente com a concentração final das diferentes soluções de fortificação.

Solução	Solução a pipetar (µL)	Reagente 2 (µL)	Concentração (ng/mL)
Fortificação 1	Intermédia 1 (300)	700	30
Fortificação 2	Intermédia 2 (80)	920	80
Fortificação 3	Intermédia 2 (150)	850	150
Fortificação 4	“Stock” (40)	960	400
Fortificação 5	“Stock” (70)	930	700
Fortificação 6	“Stock” (100)	900	1000
Fortificação 7	“Stock” (300)	700	3000

Soluções padrão de calibração e controlo

Partindo das soluções padrão de fortificação, obtiveram-se 7 soluções padrão de calibração necessárias ao traçado da curva de calibração, pela adição de 20 µl de solução padrão de fortificação a 180 µl de mistura de plasma de controlos.

Para avaliar a precisão e eficácia do ensaio foram preparadas 3 soluções padrão de controlo de qualidade (QC), pela adição de 30 µl de solução padrão de fortificação a 170 µl de mistura de plasma de controlos.

Estas soluções foram preparadas diariamente a cada dia de trabalho.

Na tabela 3-3 são apresentadas as concentrações para cada solução, assim como a solução padrão de fortificação a usar.

Tabela 3-3: Preparação das soluções de calibração, incluindo quantidade de solução a pipetar juntamente com a concentração final das diferentes soluções de concentração.

Solução	Solução a pipetar	Concentração (ng/mL)	Concentração (nmol/L)
Calibração 1	Fortificação 1	3	6.46
Calibração 2	Fortificação 2	8	17.29
Calibração 3	Fortificação 3	15	32.28
Calibração 4	Fortificação 4	40	86.45
Calibração 5	Fortificação 5	70	150.66
Calibração 6	Fortificação 6	100	215.23
Calibração 7	Fortificação 7	300	645.69
QC 1	Fortificação 2	4.5	9.67
QC 2	Fortificação 4	22.5	48.34
QC 3	Fortificação 5	60	128.92

3.3. Doentes, controlos e amostras

Para a realização deste trabalho foram utilizadas como amostras controlo sangue de 64 indivíduos, compreendendo uma gama de idades entre 1 e 66 anos. Os indivíduos controlo incluíram amostras de dadores de sangue adultos saudáveis (n=44) e de crianças referenciadas para investigação metabólica com exclusão de diagnóstico de LSD (n=20). Todas as amostras de sangue provenientes de indivíduos controlo foram colhidas

contendo anticoagulante-EDTA, centrifugadas durante 10 minutos a 3000 g, separado o plasma e seguidamente guardadas a -70°C até à sua análise.

Adicionalmente, foram estudadas amostras, de 12 indivíduos pertencentes ao banco de amostras biológicas do CGMJM, colhidas quando do diagnóstico de NPC. A caracterização bioquímica deste grupo de doentes foi efetuada, com recurso à coloração com filipina e à análise molecular por sequenciação dos genes *NPC1* e *NPC2* (tabela 3-4). Com base na idade do início do aparecimento dos sintomas neurológicos, 5 doentes (1-5) estavam classificados como fenótipo clínico infantil-precoce/tardio, 3 doentes (6-8) como fenótipo clínico juvenil e os restantes 4 (9-12) como fenótipo clínico adolescente/adulto. Todos os doentes apresentaram uma coloração com filipina sugestiva do fenótipo bioquímico clássico, sendo que apenas um estava classificado como intermédio (doente 9).

Foram incluídas mais 10 amostras seriadas dos doentes 11 e 12, nas quais se encontravam em tratamento com Miglustat®, para averiguar a eficácia na monitorização da resposta terapêutica. O espaço temporal entre a 1ª amostra, aquando do diagnóstico, e a última foi de 10 anos para o doente 11, e de 12 anos para o doente 12.

Adicionalmente, analisaram-se 5 casos com elevada suspeita clínica de NPC, nos quais apenas foi identificada uma variante considerada patogénica no gene *NPC1*, classificação com recurso a bases de dados ou na previsão *in silico*. Os 5 casos encontravam-se classificados como formas clínicas adolescente/adulto e a coloração com filipina era sugestiva de fenótipo bioquímico variante em 4 casos, sendo que um deles apresentava um fenótipo bioquímico clássico (doente 15).

A classificação fenotípica e genotípica assim como a atividade enzimática da quitotriosidase se avaliada, dos 12 casos (1-12) previamente diagnosticados com NPC e dos 5 casos (13-17) nos quais apenas uma variante patogénica foi identificada, estão detalhadas na tabela 3-4.

Tabela 3-4: Descrição sumária dos doentes NPC.

Doente	Fenótipo clínico	Fenótipo bioquímico	Gene	Genótipo	Quitotriosidase (nmol/ml/hora)
1	Infantil precoce	Clássico	<i>NPCI</i>	p.A1035V/p.A1035V	25.79
2	Infantil precoce	Clássico	<i>NPCI</i>	p.S118fs/p.A1035V	739.34
3	Infantil tardio	Clássico	<i>NPCI</i>	p.Q117fs/p.Q117fs	
4	Infantil tardio	Clássico	<i>NPCI</i>	p.G1240R/p.G1240R	936.87
5	Infantil tardio	Clássico	<i>NPCI</i>	p.C177Y/IVS23+1G>A	1991.74
6	Juvenil	Clássico	<i>NPCI</i>	p.R1518W/ p.A1035V	100.62
7	Juvenil	Clássico	<i>NPCI</i>	p.A764A/ p.A1035V	87
8	Juvenil	Clássico	<i>NPCI</i>	p.A1035V p./R1518W	
9	Adulto	Intermédio	<i>NPCI</i>	p.A1035V/ p.P474A	
10	Adulto	Clássico	<i>NPCI</i>	p.A764A/p.N188fs	55.67
11	Adulto	Clássico	<i>NPCI</i>	p.1241*/ p.R1173G	83.02
12	Adulto	Clássico	<i>NPCI</i>	p.1241*/ p.R1173G	50.46
13	Juvenil	Variante	<i>NPCI</i>	p.A840V/?	187.94
14	Adulto	Variante	<i>NPCI</i>	p.S865L/?	
15	Adulto	Clássico	<i>NPCI</i>	p.V505G/?	54.05
16	Adulto	Variante	<i>NPCI</i>	p.R1518W/?	
17	Adulto	Variante	<i>NPCI</i>	p.R1518W/?	

Foram incluídas amostras de plasma de doentes com outras patologias que, pelo fenótipo clínico ou pela via metabólica onde se insere o seu bloqueio poderiam ser sugestivas de NPC. Assim, optou-se por incluir amostras de 10 doentes com ASMD, classificados clinicamente como pertencendo ao tipo B, forma visceral crónica. Adicionalmente foram ainda incluídas 20 amostras de outras esfingolipidoses [Gaucher (GD, n=6), Fabry (FD, n=8), Krabbe (KD, n=4) e gangliosidose GM1 (GM1, n=2)], de xantomatose cerebrotendinosa (CTX, n=2), deficiência em lipase ácida lisossomal (LAL, n=3) e doenças peroxissomais (n=7), incluindo adrenoleucodistrofia ligada ao cromossoma X (X-ALD, n=5), deficiência em acyl-CoA oxidase (ACOX, n=1) e doenças da biogénese peroxissomal (PBD, n=1). Todos os doentes apresentavam um diagnóstico definitivo, tendo por base estudos enzimáticos e/ou análise molecular. Foram também incluídos 13 portadores obrigatórios (heterozigóticos) de NPC e 5 de ASMD, com base em estudo molecular.

Todas as amostras estavam armazenadas a -20°C , não havendo, contudo, registo das condições de armazenamento.

As características de todos os indivíduos estudados encontram-se sumarizadas na tabela 3-5.

Tabela 3-5: Sumário das características dos indivíduos incluídos no estudo.

Amostras	Número de indivíduos, n	Género (M/F), n	Idade, anos
Controlos	64	(30/34)	35 (1-66)
Adultos	44	(15/29)	48 (18-66)
Crianças	20	(15/5)	3 (1-8)
Heterozigóticos <i>NPCI</i>	13	(5/7)	44 (28-54)
Heterozigóticos <i>SMPDI</i>	5	(3/2)	32 (30-35)
Suspeitas NPC	5	(2/3)	21 (13-31)
Doentes NPC	12	(7/5)	10 (2-27)
Esfingolipidoses	30	(16/13)	28 (1-77)
ASMD	10	(4/6)	20 (2-57)
Gaucher	6	(1/5)	38 (1-77)
Krabbe	4	(1/3)	3 (1-11)
Fabry	8	(8/0)	52 (5-73)
Gangliosidose GM1	2	(1/1)	5 (1-8)
CTX	2	(1/1)	33 (31-34)
LAL	3	(1/2)	30 (19-32)
Doenças peroxissomais	7	(5/2)	11 (1-44)
X-ALD	5	(5/0)	12 (7-44)
Outras*	2	(0/2)	1 (1)

*Inclui um doente com deficiência em Acyl-CoA oxidase (ACOX) e um com desordem da biogénese peroxissomal (PBD).

3.4. Preparação de amostras de plasma humano a analisar

A preparação das amostras iniciou-se com a adição de 50 μL de padrão interno, Lisolactosilceramida (LysoGb2 a 120 ng/mL) e 300 μL de reagente 3 a 200 μL de plasma/calibrador/QC. As amostras foram agitadas durante 30 segundos num *vortex*, e seguidamente centrifugadas durante 10 minutos a 11300 g. Os sobrenadantes resultantes

foram transferidos para *vials*, aos quais foram adicionados 200 μ L de reagente 4, seguindo-se uma nova agitação de 30 segundos no *vortex*.

3.5. Condições cromatográficas e de espectrometria de massas

As medições foram realizadas por cromatografia líquida de fase reversa usando um cromatógrafo líquido de ultra eficiência (UPLC) Acquity Ultra Performance LCTM (Waters) e uma coluna Mediterrânea Sea C18, 5 μ m 2.1x150 mm (Teknokroma). A detecção por espectrometria de massa em sequência (MS/MS) foi realizada usando um espectrômetro de massas TQ Detector (Waters) no modo ESI positivo.

Todos os parâmetros de UPLC e MS/MS utilizados encontram-se presentes na tabela 3-6 e 3-7, respetivamente. Os pares ião precursor-íão produto dos compostos analisados, assim como tensão do cone e energia de colisão encontram-se descritos na tabela 3-8.

Tabela 3-6: Parâmetros cromatográficos utilizados neste trabalho.

Parâmetros UPLC		
Coluna	C18, 5 μ m 2.1x150 mm (Teknokroma)	
Temperatura da coluna	Ambiente	
Gradiente	Tempo (min)	% A
	0.0	40
	6.0	0
	7.0	0
	7.1	40
	12.0	40
Fluxo	0.4 mL/min	
Volume de injeção	50 μ L	
Modo de injeção	<i>Partial loop with needle overfill</i>	
Tempo de corrida	12 min	
Temperatura do injetor automático	15°C	

Tabela 3-7: Parâmetros de massas utilizados neste trabalho.

Parâmetros MS/MS	
Modo de ionização	ESI +
Modo de operação/aquisição	MRM
Tensão capilar	3.5 KV

Tensão de extrator	3 V
Tensão de RF	0.1 V
Temperatura da fonte	140°C
Temperatura de dessolvatação	450°C
Fluxo do gás de cone	50 L/h
Fluxo do gás de dessolvatação	1100 L/h
Tempo de <i>dwell</i>	0.1 s
Resolução LM 1	10
Resolução HM 1	10
<i>Ion energy 1</i>	1
Entrada	1
Saída	2
Resolução LM 2	10
Resolução HM 2	10
<i>Ion energy 2</i>	1
<i>Multiplier</i>	650 V
Nível de vácuo	3 a 3.5 x 10 ⁻³ mbar

Tabela 3-8: Parâmetros de detecção dos compostos.

Compostos	Ião Precursor (m/z)	Ião Produto (m/z)	Tensão de cone (V)	Energia de colisão (V)
LysoSM	465.4	184	33	16
	465.4	86	33	12
LysoSM-509	509	184	33	16
	509	326	33	22
LysoGb2	624.5	282	35	29
	624.5	264	35	29

3.6. Análise estatística

A integração das áreas dos picos dos analitos foi realizada recorrendo ao software TargetLynx 4.1 (Waters, USA) e normalizada pela área do padrão interno.

A curva de calibração foi quadrática com $1/x$ *weighting function*, e a origem foi excluída.

A análise estatística foi realizada usando o software excel. Para todos os níveis de biomarcadores inferiores ao limite de quantificação (LoQ), estabelecido pela empresa como 4.3 nmol/L, foram substituídos por 0.5 x LoQ para permitir a análise estatística dos resultados obtidos.

Todos os valores obtidos para determinada patologia foram expressos como mediana e intervalo mínimo-máximo, não se optando pela distribuição dos percentis devido ao reduzido número de amostras para cada patologia.

$P < .05$ foi considerado para representar uma diferença estatisticamente significativa.

Capítulo IV

Resultados e discussão

4.1. Método analítico

O diagnóstico de NPC apresenta grandes desafios, tanto pela elevada heterogeneidade clínica como pela idade de início da doença, podendo originar um intervalo de tempo significativo até à confirmação do mesmo (Geberhiwot et al., 2018; Patterson et al., 2012). A busca de um biomarcador específico e sensível para a patologia intensificou-se nos últimos anos, com o intuito de facilitar o diagnóstico da patologia e também a monitorização da resposta terapêutica.

Os oxisteróis, mais concretamente C-triol e 7-KC, apareceram inicialmente como possíveis biomarcadores (Jiang et al., 2011), contudo apresentaram alguns problemas enumerados em diversos estudos, tais como a elevada sensibilidade à auto oxidação, o que impossibilita estudos retrospectivos, além de falta de especificidade (Björkhem et al., 2014; Boenzi et al., 2016; Jiang et al., 2011; Klinke et al., 2015; Lin et al., 2014; Pataj et al., 2016; Polo et al., 2016; Ribas et al., 2016; Romanello et al., 2016). Sendo este um estudo retrospectivo, em que iriam ser utilizadas amostras de plasma das quais não havia um registo das suas condições de armazenamento, e sabendo à partida da interferência de processos da auto oxidação do colesterol, optou-se por não se realizar ensaios de quantificação nem de C-triol nem de 7-KC nas amostras estudadas.

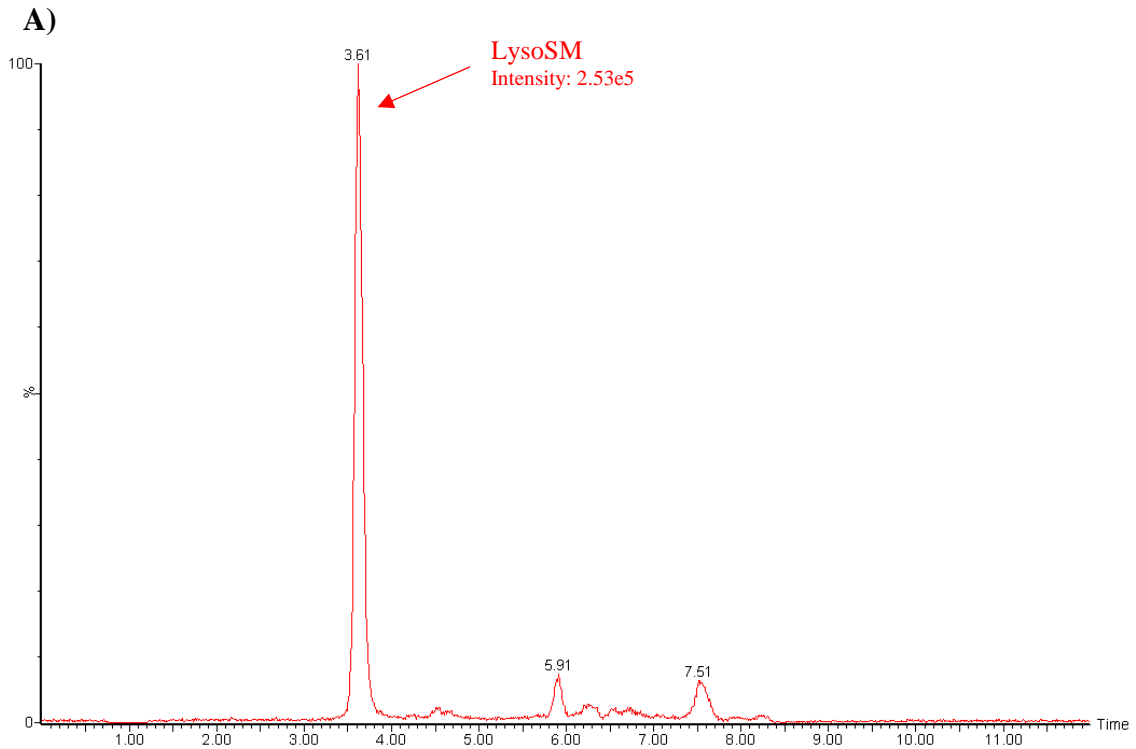
Além dos oxisteróis, nos últimos anos, foram reportados vários métodos de quantificação de LysoSM e da sua forma carboxilada, LysoSM-509 (Giese et al., 2015; Kuchar et al., 2017; Pettazzoni et al., 2017; Polo et al., 2017; Voorink-Moret et al., 2018). No entanto, a maioria dos métodos de preparação das amostras é demasiado laboriosa e bastante dispendiosa, seja por recorrer a técnicas de extração (Kuchar et al., 2017; Pettazzoni et al., 2017; Voorink-Moret et al., 2018) ou a processos de secagem sob corrente de azoto (Pettazzoni et al., 2017; Polo et al., 2017; Voorink-Moret et al., 2018).

Com vista a inovar a oferta de diagnóstico do laboratório, tornou-se pertinente a implementação de um método rápido e eficaz para o diagnóstico bioquímico da doença de NPC. O método de preparação da amostra recorre apenas a precipitação proteica, sem necessidade de recorrer a técnicas de extração ou secagem sob corrente de azoto. Em comparação com os estudos previamente efetuados, este é um método menos dispendioso e que consome menos tempo laboratorial.

A separação cromatográfica ocorre numa coluna C18 de fase reversa, conhecida pela sua versatilidade, com um tempo de corrida de 12 minutos.

A curva de calibração do método é composta por 7 calibradores com quantidades crescentes de LysoSM. Dada a indisponibilidade do padrão do composto LysoSM-509, para o seu doseamento é utilizado o declive da curva da LysoSM, com o cálculo a ser realizado no *software* de análise, e os resultados a serem expressos não por concentração, mas sim por expressão dos múltiplos da mediana (MOM) dos valores de referência, como já efetuado em outro estudo publicado de análise deste biomarcador (Polo et al., 2017). A LysoGb2 é utilizada como padrão interno, e tem como finalidade compensar possíveis efeitos de matriz e variações na medição.

Os picos de quantificação, com a sua intensidade, assim como o tempo de retenção de cada composto analisado encontram-se descritos na figura 4-1.



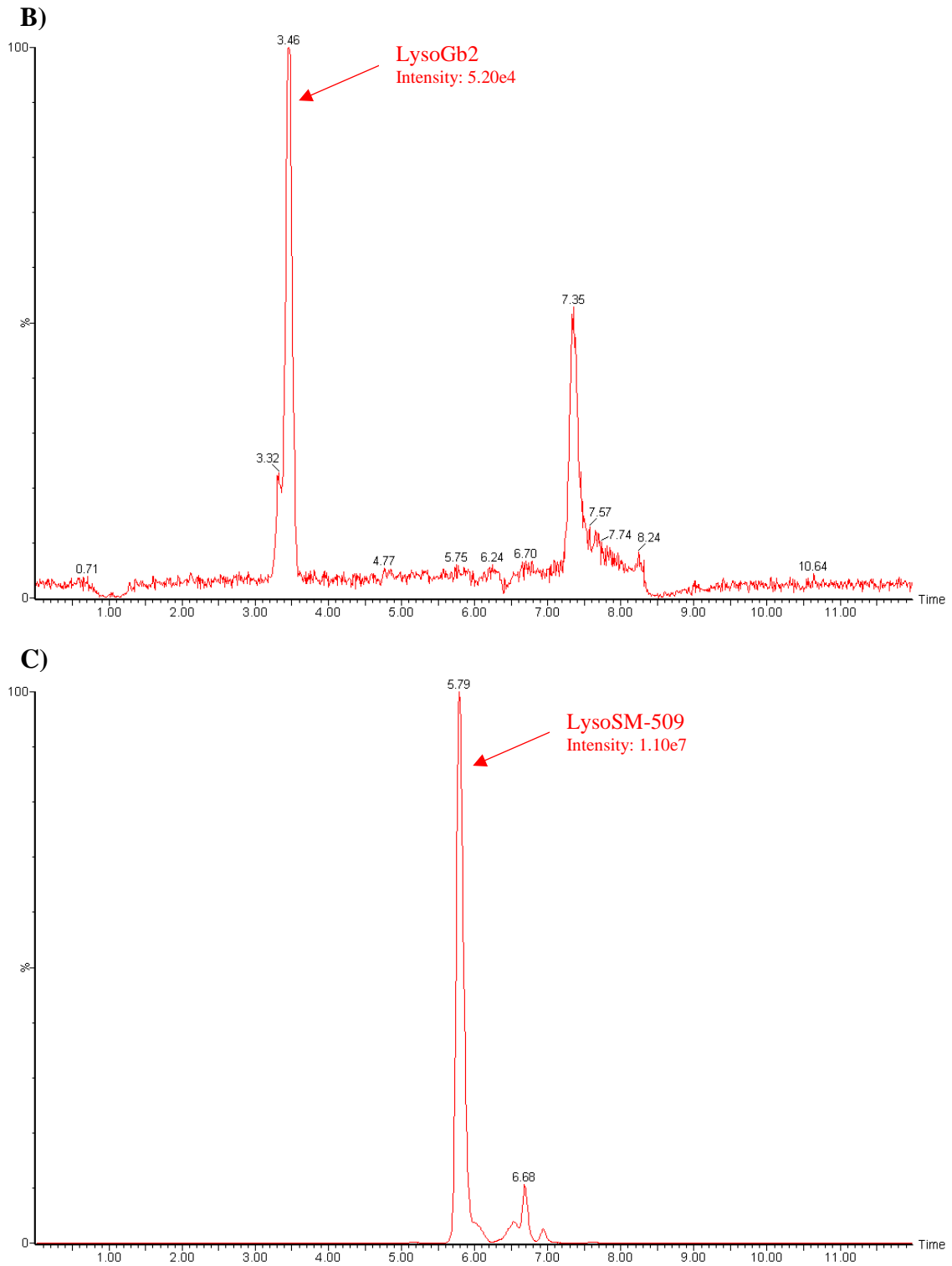


Figura 4-1: Separação cromatográfica dos compostos lisoesfingomielina (LysoSM), lisoesfingomielina-509 (LysoSM-509), e do padrão interno lisolactosilceramida (LysoGb2). LysoSM e LysoGb2 medidas no padrão de calibração 2 e a LysoSM-509 num controlo positivo (doente previamente diagnosticado). O tempo de retenção para a LysoSM é de 3.61 min. (A), para a LysoGb2 é de 3.46 min. (B) e para a LysoSM-509 de 5.79 min. (C)

4.2. Análise plasmática em amostras de plasma humano

4.2.1. População controlo / valores de referência

Os valores de referência foram estabelecidos pela análise dos níveis plasmáticos de LysoSM e LysoSM-509 em 64 amostras, das quais 44 provenientes de adultos saudáveis dadores de sangue e 20 de crianças referenciadas para investigação metabólica com exclusão de diagnóstico de LSD.

Das 64 amostras, 53 apresentaram concentrações de LysoSM inferiores ao limite de quantificação (LoQ), correspondente a 4.3 nmol/L. Para permitir a análise estatística, as concentrações inferiores ao LoQ foram substituídas por 0.5 x LoQ. As concentrações de LysoSM variaram entre <LoQ e 8.6 nmol/L e as de LysoSM-509 entre 0.27 e 3.93 MOM.

A utilização de uma ampla gama de idades, compreendida entre 1 e 66 anos de idade possibilitou testar a hipótese dos biomarcadores serem influenciados pela idade. Para ambos, foi encontrada uma correlação positiva com a idade (LysoSM, Pearson 0.383, $p < 0.01$; LysoSM-509, Pearson 0.545, $p < 0.001$).

Foi também avaliada a influência do género na concentração dos biomarcadores, no entanto, na amostra em estudo não foi encontrada qualquer correlação.

Apenas um estudo, conduzido por Polo (Polo et al., 2017), incluiu a influência da idade e do género nos dois biomarcadores, encontrando para a idade uma correlação positiva, não sendo, no entanto, tão significativa. Giese (Giese et al., 2015) avaliou a influência da idade nos níveis de LysoSM-509, encontrando também uma correlação positiva. Os resultados destes dois estudos dão ênfase aos obtidos no presente trabalho, possibilitando afirmar que as concentrações de LysoSM e LysoSM-509 aumentam concomitantemente com a idade, apresentando assim a população infantil valores inferiores da concentração dos dois biomarcadores face aos adultos.

4.2.2. Doentes e portadores de Niemann-Pick tipo C

Os doentes de NPC (n=12) apresentaram, quase todos, concentrações de LysoSM (15.5 nmol/L, intervalo 8.5-42.4), superiores às observadas nos controlos, enquanto que os valores de LysoSM-509 (182.3 MOM, intervalo 44.4-407.4) foram todos significativamente mais elevados, quando comparado com os controlos.

Os heterozigóticos de *NPC1* (n=13) apresentaram valores de LysoSM (5.9 nmol/L, intervalo 2.15-15.9) inferiores aos dos doentes, e valores de LysoSM-509 (3.4 MOM, intervalo 1.9-11.5) substancialmente inferiores.

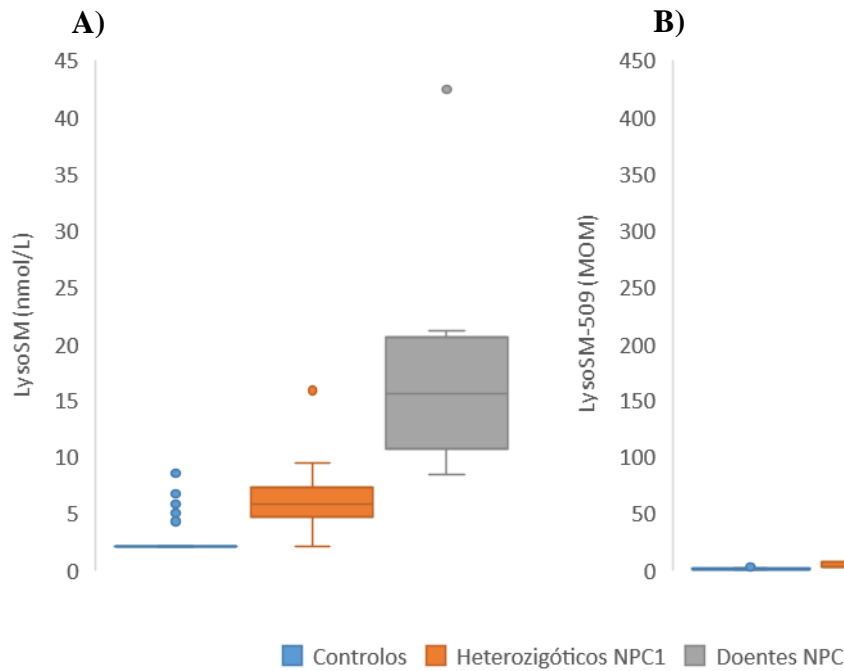


Figura 4-2: Caixa e Whisker de concentrações plasmáticas de LysoSM (A) e LysoSM-509 (B) em controles, heterozigóticos para o gene *NPC1*, e doentes Niemann-Pick tipo C (NPC). A linha representa a mediana, whiskers representam o mínimo e máximo, as bolas representam os valores atípicos.

Como se pode verificar na figura 4-2, ocorre uma ligeira sobreposição das concentrações de LysoSM nos controles, heterozigóticos de *NPC1* e doentes com NPC, no entanto, a concentração de LysoSM-509 nos doentes não apresenta nenhuma sobreposição com os heterozigóticos nem com a amostra de controles.

Um indivíduo heterozigótico *NPC1* apresentou uma concentração de LysoSM 3 vezes superior ao valor da mediana, e também apresentou a maior concentração de LysoSM-509, 11.5 MOM, no entanto esse valor é significativamente inferior à menor da concentração dos doentes com NPC (44.4 MOM)

Posteriormente, foi realizada uma divisão dos doentes de NPC em dois grupos, de modo a tentar estabelecer um padrão de relação entre o valor da concentração dos biomarcadores nas formas precoces e tardias (figura 4-3). A divisão teve em conta a idade dos doentes, com as formas precoces a englobarem os doentes até aos 9 anos de idade, e as tardias a partir dos 9, inclusive.

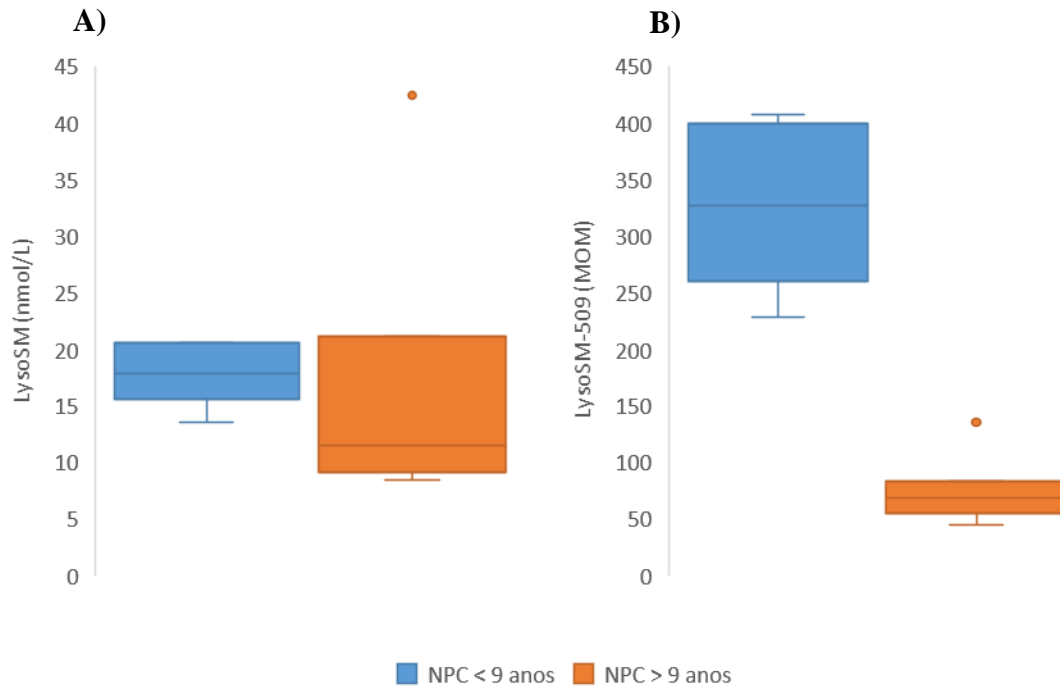


Figura 4-3: Caixa e Whisker de concentrações plasmáticas de LysoSM (A) e LysoSM-509 (B) em doentes NPC, divididos em dois grupos, crianças com idade inferior a 9 anos de idade (NPC < 9) e crianças com idade igual ou superior a 9 anos de idade (NPC > 9). A linha representa a mediana, whiskers representam o mínimo e máximo, as bolas representam os valores atípicos.

As formas precoces apresentaram uma mediana de 17.9 nmol/L (intervalo 13.5-20.6) para a LysoSM e 326.9 MOM (intervalo 228.8-407.4) para a LysoSM-509, enquanto que as formas tardias evidenciaram uma mediana de 11.6 nmol/L (intervalo 8.5-42.4) e 68.5 MOM (intervalo 44.4-135.8) de LysoSM e LysoSM-509, respetivamente.

Foi encontrada uma correlação negativa entre a concentração de LysoSM-509 nas formas precoces vs formas tardias (Pearson -0.935; $p < 0.001$). Para a LysoSM não foi encontrada qualquer correlação com o fenótipo clínico nem com o género.

Com base nestes resultados é possível verificar que todos os doentes de NPC apresentaram valores significativamente aumentados de LysoSM-509 face aos controlos e heterozigóticos, não interferindo na sua identificação enquanto doentes, mesmo quando comparados com o indivíduo heterozigótico de *NPCI* que apresentava uma concentração substancialmente mais elevada que os restantes.

Estes resultados aqui apresentados vão de encontro aos obtidos em outros estudos de quantificação de LysoSM-509 (Giese et al., 2015; Kuchar et al., 2017; Pettazzoni et al.,

2017; Polo et al., 2017; Voorink-Moret et al., 2018), nos quais os doentes de NPC apresentaram valores superiores face aos controlos.

Até à data apenas um estudo analisou os níveis de LysoSM-509 (Giese et al., 2015) nos heterozigóticos em *NPCI/NPC2*, os quais foram superiores aos da população controlo, resultados que corroboram os do presente trabalho. O aumento de LysoSM-509 em alguns heterozigóticos, face à população controlo, parece apontar para uma relação entre a existência de uma única variante patogénica num alelo do gene *NPCI/NPC2* e algum grau de acumulação do biomarcador, no entanto qualquer conclusão mais definitiva carece de um estudo mais alargado.

Dado que até à data, nenhum estudo quantificou a LysoSM nos heterozigóticos em *NPCI/NPC2*, pelo que não é possível fazer qualquer comparação com os resultados obtidos neste trabalho.

A comparação dos níveis plasmáticos de LysoSM e LysoSM-509 entre as formas precoces e tardias permitiu evidenciar ainda mais a diferença das diferentes formas clínicas. As formas precoces, consideradas mais severas, apresentaram níveis muito superiores de LysoSM-509 quando comparadas com as formas tardias, também consideradas mais atenuadas, o que já tinha sido observado por outros autores (Piraud et al., 2018).

4.2.2.1. Suspeitas clínicas de Niemann-Pick tipo C

Foram avaliados 5 casos, que além da suspeita clínica de NPC (tabela 4-1: doentes 13-17), havia sido identificada apenas uma variante patogénica no gene *NPCI*, e cujo resultado da coloração com filipina havia sido classificada como “variante” em 4 dos casos, e um outro como “clássica”.

Nos casos acima referidos, os valores das concentrações de LysoSM (6.9 nmol/L, intervalo 2.2-10.5) e de LysoSM-509 (4.3 MOM, intervalo 2.7-12.3) foram semelhantes aos dos heterozigóticos de *NPCI* (figura 4-4). Relativamente à quantificação de LysoSM-509, 2 deles apresentaram níveis sobreponíveis aos dos controlos, e os outros 3 casos embora apresentassem valores superiores aos dos controlos, eram da mesma ordem de grandeza do indivíduo heterozigótico de *NPCI* já referido anteriormente, cujo valor foi bastante superior à mediana. De igual modo também os valores destes casos se encontram muito distanciados dos obtidos para a população de doentes NPC estudada.

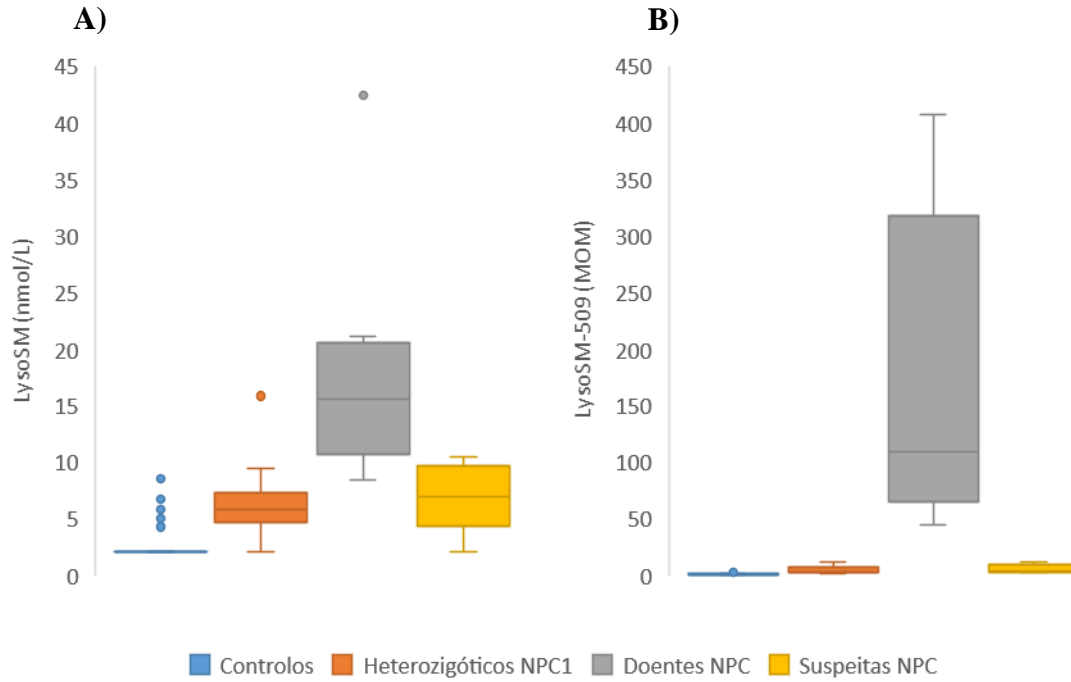


Figura 4-4: Caixa e Whisker de concentrações plasmáticas de LysoSM (A) e LysoSM-509 (B) em controlos, heterozigóticos para o gene *NPCI*, casos com apenas uma variante identificada (suspeitas NPC) e doentes Niemann-Pick tipo C (NPC). A linha representa a mediana, whiskers representam o mínimo e máximo, as bolas representam os valores atípicos.

Tendo em conta o já reportado por outros autores, e com a conjugação dos resultados obtidos para estes 5 casos, não é sugestiva de diagnóstico de NPC para estes doentes. No entanto, não se pode, à data, excluir a possibilidade de estarmos perante formas muito atenuadas ainda sem biomarcadores identificados.

4.2.2.2. Relação genótipo-quitotriosidase-filipina-biomarcadores

A tabela 4.1 resume os dados de fenótipos clínico e bioquímico, genótipo, atividade da enzima quitotriosidase, concentrações plasmáticas de LysoSM e LysoSM-509 nos diferentes doentes NPC, assim como dos indivíduos com suspeita clínica de NPC, nos quais apenas foi identificada uma variante patogénica.

Tabela 4-1 Comparação dos biomarcadores avaliados com os fenótipos, genótipo e atividade da quitotriosidase.

Doente	Fenótipo clínico	Fenótipo bioquímico	Genótipo	Quitotriosidase (nmol/ml/hora)	LysoSM (nmol/L)	LysoSM-509 (MOM)
1	Infantil precoce	Clássico	p.A1035V/ p.A1035V	25.8	17.6	228.8
2	Infantil precoce	Clássico	p.S118fs/ p.A1035V	739.3	20.6	326.9

Estudo de biomarcadores da doença de NPC

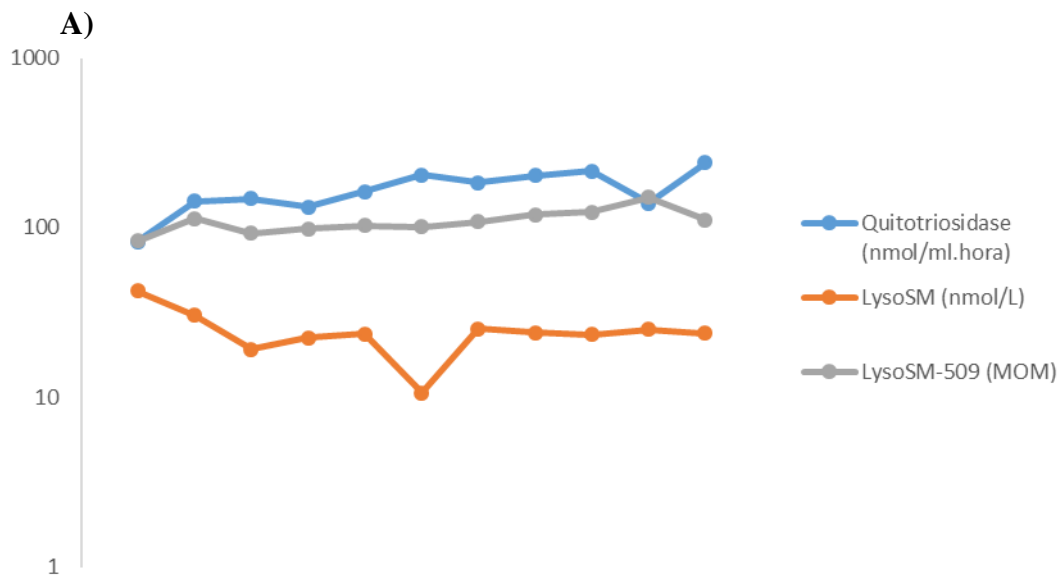
3	Infantil tardio	Clássico	p.Q117fs/ p.Q117fs		17.9	392.3
4	Infantil tardio	Clássico	p.G1240R/ p.G1240R	936.9	13.5	407.4
5	Infantil tardio	Clássico	p.C177Y/ IVS23+1G>A	1991.7	20.6	291.2
6	Juvenil	Clássico	p.R1518W/ p.A1035V	100.6	9.1	68.5
7	Juvenil	Clássico	p.A764A/ p.A1035V	87.0	10.5	54.5
8	Juvenil	Clássico	p.A1035V p./R1518W		8.5	68.5
9	Adulto	Intermédio	p.A1035V/ p.P474A		11.6	74.7
10	Adulto	Clássico	p.A764A/ p.N188fs	55.7	13.2	135.8
11	Adulto	Clássico	p.I241*/ p.R1173G	83.0	42.4	83.5
12	Adulto	Clássico	p.I241*/ p.R1173G	50.5	21.2	44.4
13	Juvenil	Variante	p.A840V/?	187.9	6.9	2.7
14	Adulto	Variante	p.S865L/?		10.5	7.5
15	Adulto	Clássico	p.V505G/?	54.1	2.2	12.4
16	Adulto	Variante	p.R1518W/?		8.8	4.3
17	Adulto	Variante	p.R1518W/?		6.6	3.2

Como já discutido em 4.2.2., as formas infantis, consideradas mais severas, apresentam concentrações mais elevadas de LysoSM-509 quando comparadas com as formas juvenis/adultas. A atividade enzimática da quitotriosidase não foi avaliada em todos os doentes, no entanto foi possível correlacionar a sua atividade com as formas infantis/tardias (Pearson -0.855, $p < 0.01$). É possível verificar que a mesma apresenta um padrão de correlação semelhante ao da LysoSM-509, encontrando-se substancialmente mais elevada nas formas precoces, com exceção de um único caso (doente 1), que por ser portador de uma deleção frequente no gene *CHIT1*, a atividade de quitotriosidase não pode ser utilizada como biomarcador da patologia.

A variante patogénica “pA1035V” encontra-se presente em 6 dos 12 casos diagnosticados com NPC. No doente 1, forma clínica infantil precoce, esta variante encontra-se em homozigotia. Nos restantes 5 doentes, encontra-se em heterozigotia, englobando a outra forma precoce, 3 formas juvenis e uma forma adulta, a qual apresenta uma filipina considerada “variante”. Com base nestas observações é possível concluir que esta variante patogénica, quando em heterozigotia, pode estar presente nas diversas formas clínicas e também bioquímicas.

4.2.2.3. Avaliação da utilidade de LysoSM e LysoSM-509 como biomarcadores para a monitorização terapêutica de doentes Niemann-Pick tipo C

Foram avaliados 2 doentes, 11 (A) e 12 (B), em 11 tempos diferentes, o tempo aquando do diagnóstico, e 10 tempos posteriores após início da terapêutica com Miglustat® (figura 4-5).



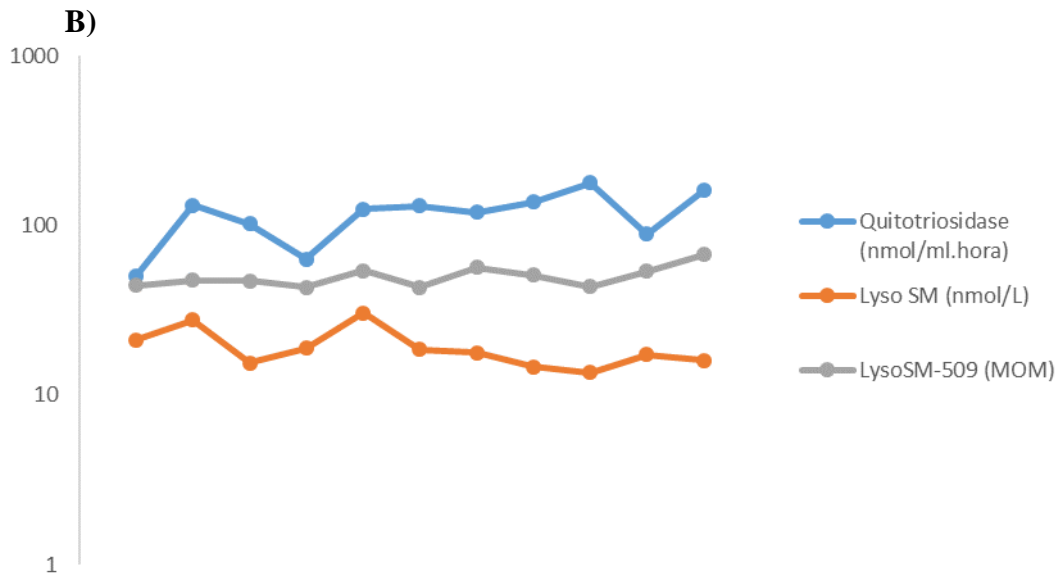


Figura 4-5: Correlação da atividade enzimática da quitotriosidase e dos níveis plasmáticos de LysoSM e LysoSM-509 em função do tempo, em tratamento com Miglustat®. A) doente 11, B) doente 12.

A quitotriosidase é o biomarcador utilizado para monitorizar a resposta terapêutica de doentes de NPC, assim como em algumas esfingolipidoses, como é o caso da doença de Gaucher. A já mencionada falta de sensibilidade e especificidade como parâmetro de avaliação terapêutica é evidente, contudo, quando a terapêutica é realmente eficaz, como é o caso da terapêutica de substituição enzimática para a doença de Gaucher, ocorre uma diminuição dos substratos acumulados e uma diminuição da atividade enzimática da quitotriosidase. Nos 2 casos analisados isso não se verificou, até pelo contrário, ocorreu um aumento, embora não uniforme, da atividade da enzima com o decorrer da terapêutica.

A quantificação da LysoSM e LysoSM-509 nestes doentes também não sofreu uma variação significativa, em função do tempo ou da terapêutica instituída. Ocorreu um ligeiro decréscimo da quantidade de LysoSM, embora não se possa considerar a LysoSM, *per se*, um biomarcador específico para a doença. No caso da LysoSM-509 verificou-se uma evolução semelhante à da atividade quitotriosidase, ocorrendo um aumento, não uniforme, da quantidade do substrato.

Os resultados dos biomarcadores, mais concretamente da LysoSM-509 e também da quitotriosidase podem estar diretamente relacionados com o fato da terapêutica utilizada, Miglustat®, não ser específica nem eficaz para NPC, não existindo consenso por parte da comunidade científica de que todos os doentes beneficiem desta terapia (Geberhiwot et al., 2018; Patterson et al., 2017).

Para avaliar melhor a utilidade da LysoSM e LysoSM-509 como biomarcadores específicos e sensíveis para a monitorização da resposta terapêutica, seria necessário transpor o estudo a uma amostra mais alargada, incluindo também doentes com formas clínicas distintas. Seria também pertinente avaliar casos submetidos a terapêuticas ainda em ensaios clínicos, como é o caso de preparações endovenosas de hidroxipropil- β -ciclodextrina (NCT 01747135) e Arimoclomol® oral (NCT 02612129) que aparentam ser mais específicas do que o Miglustat® para a terapêutica da doença de NPC.

4.2.3. Doentes e portadores de deficiência em esfingomielinase ácida

Foram avaliados 10 doentes previamente diagnosticados com ASMD, com recurso à atividade enzimática da ASM e sequenciação do gene *SMPD1*. Foram ainda avaliados 5 heterozigóticos, identificados por sequenciação do gene *SMPD1*.

Os doentes com ASMD apresentaram concentrações de 423.3 nmol/L (intervalo 268.3-546.8) de LysoSM e 279.3 MOM (intervalo 220.3-531.8) de LysoSM-509, enquanto que os heterozigóticos apresentaram concentrações de LysoSM de 5.6 nmol/L (intervalo 2.2-7.9) e 2.4 MOM (intervalo 1.2-3.9) de LysoSM-509 (figura 4-6).

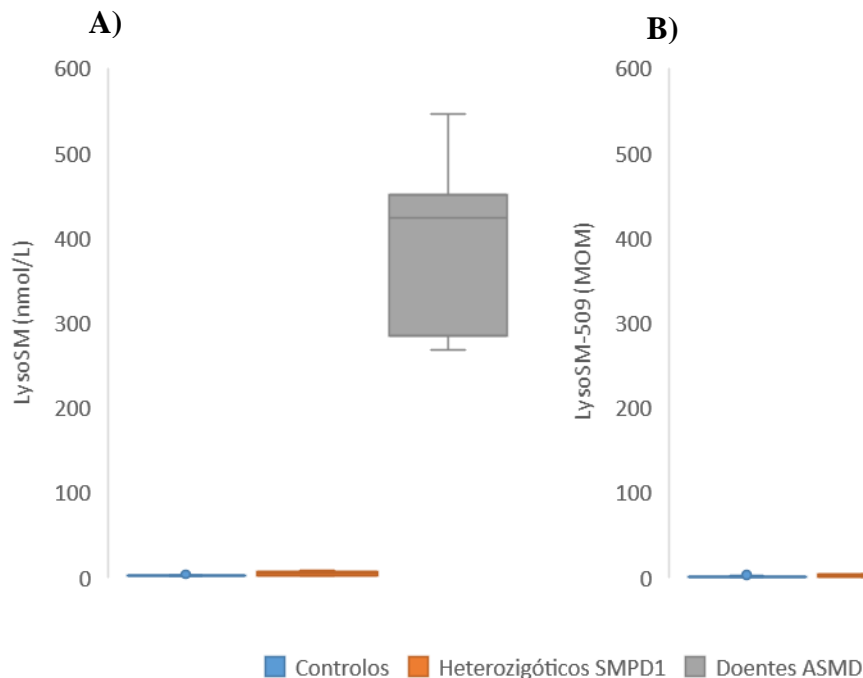


Figura 4-6: Caixa e Whisker de concentrações plasmáticas de LysoSM (A) e LysoSM-509 (B) em controlos, heterozigóticos para o gene *SMPD1* e doentes com deficiência em esfingomielinase ácida (ASMD). A linha representa a mediana, whiskers representam o mínimo e máximo, as bolas representam os valores atípicos.

Foi encontrada uma correlação entre a idade e os níveis plasmáticos de LysoSM-509 (Pearson -0.718, $p < 0.05$). Não foi encontrada qualquer correlação entre a LysoSM e a idade nem entre os biomarcadores e o género.

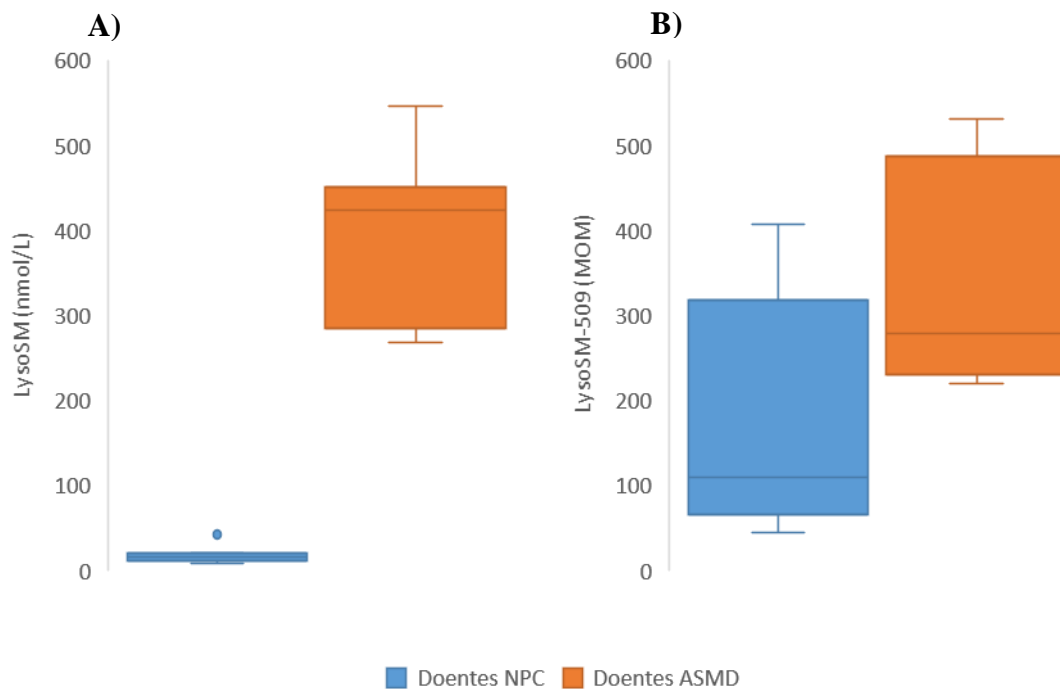


Figura 4-7: Caixa e Whisker de concentrações plasmáticas de LysoSM (A) e LysoSM-509 (B) em doentes doentes com deficiência em esfingomielinase ácida (ASMD) e doentes Niemann-Pick tipo C (NPC). A linha representa a mediana, whiskers representam o mínimo e máximo.

Apesar de serem patologias distintas, a ASMD, mais concretamente a forma mais severa da doença, historicamente conhecida como Niemann-Pick tipo A, e NPC apresentam semelhanças fenotípicas, principalmente na fase inicial da doença. O conhecimento prévio do aumento destes biomarcadores na ASMD, tornou pertinente a inclusão destes doentes no presente estudo.

Conforme possível verificar na figura 4-6, no grupo de doentes ASMD estudados, todos apresentaram valores significativamente aumentados de LysoSM e LysoSM-509 face aos controlos e heterozigóticos para *SMPDI*, não interferindo na sua identificação enquanto doentes. Em comparação com os doentes de NPC, principalmente as formas infantis (mais severas) ocorreu uma sobreposição dos valores da LysoSM-509, no entanto, a LysoSM encontrou-se significativamente mais elevada nos doentes com ASMD, permitindo uma clara distinção entre as duas patologias.

Em todos os estudos publicados, os níveis plasmáticos de LysoSM nos doentes com ASMD encontraram-se elevados, com exceção de um único caso, identificado por Kuchar

et al., de um doente com 63 anos, com uma forma muito atenuada da patologia que apresentava níveis plasmáticos de LysoSM considerados normais.

Tendo em conta o resultado deste estudo, os doentes com ASMD podem ser identificados apenas com recurso à quantificação de LysoSM, mas a LysoSM-509 constitui também uma mais valia. A correlação entre os dois biomarcadores parece ser um excelente teste de diagnóstico para estas duas patologias (figura 4-8).

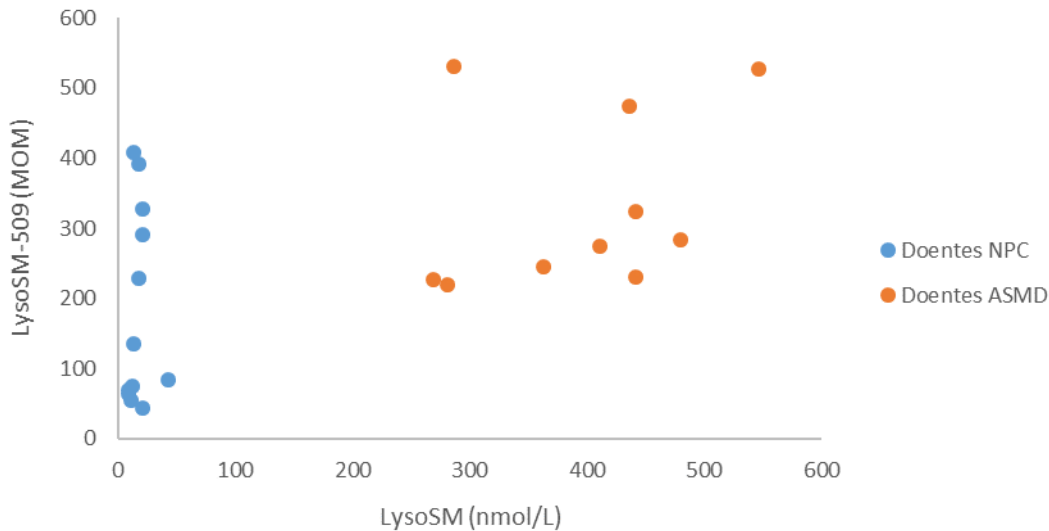


Tabela 4-2: Concentrações plasmáticas de LysoSM e LysoSM-509 em casa patologia, representadas pela mediana, mínimo e máximo.

	Número de indivíduos, n	LysoSM (nmol/L)	LysoSM-509 (MOM)
Controlos	64	<LoQ (<LoQ-8.6)	(0.3-3.9)
Adultos	44	<LoQ (<LoQ-8.6)	1.2 (0.5-3.9)
Crianças	20	<LoQ	0.6 (0.3-1.5)
Heterozigóticos NPC1	13	5.9 (<LoQ-15.9)	3.4 (1.9-11.5)
Heterozigóticos SMPDI	5	5.6 (<LoQ-7.9)	2.4 (1.2-3.9)
Suspeitas NPC	5	6.9 (<LoQ-10.5)	4.3 (2.7-12.3)
Doentes NPC	12	15.5 (8.5-42.4)	182.3 (44.4-407.4)
ASMD	10	423.3 (268.3-546.8)	279.3 (220.3-531.8)
Outras esfingolipidoses	20	<LoQ (<LoQ-32.0)	1.5 (0.4-5.1)
Gaucher	6	11.5 (<LoQ-32.0)	3.0 (1.5-5.1)
Krabbe	4	<LoQ	1.5 (0.7-2.3)
Fabry	8	<LoQ	1.0 (0.4-1.7)
Gangliosidose GM1	2	9.1 (6.2-12.0)	1.9 (1.1-2.6)
CTX	2	7.5 (4.5-10.5)	4.1 (2.0-6.3)
LAL	3	<LoQ	5.0 (2.3-5.3)
Doenças peroxissomais	7	<LoQ	0.6 (0.4-3.6)

Como é possível verificar na tabela, com exceção dos doentes de Gaucher, Gangliosidose GM1 e CTX, todos os doentes das restantes patologias apresentaram concentrações de LysoSM inferiores ao LoQ, enquadrando-se no intervalo de referência estabelecido para os controlos (< 8.6 nmol/L). Das 32 amostras analisadas, apenas 6 apresentaram níveis plasmáticos de LysoSM superiores ao intervalo de referência, um doente com CTX (10.5 nmol/L), um Gangliosidose GM1 (12.0 nmol/L) e 4 com doença de Gaucher (9.6; 13.4; 16.7, 32.0 nmol/L). Para a LysoSM-509, apenas 4 das amostras apresentaram níveis superiores ao intervalo de referência (0.3-3.9 MOM), um doente com CTX (6.3 MOM), o qual já tinha apresentado um nível de LysoSM superior ao intervalo de referência, um doente de Gaucher (5.1 MOM) que também tinha apresentado um nível de LysoSM superior ao intervalo de referência, e 2 doentes com deficiência em LAL (5.0 e 5.3 nmol/L).

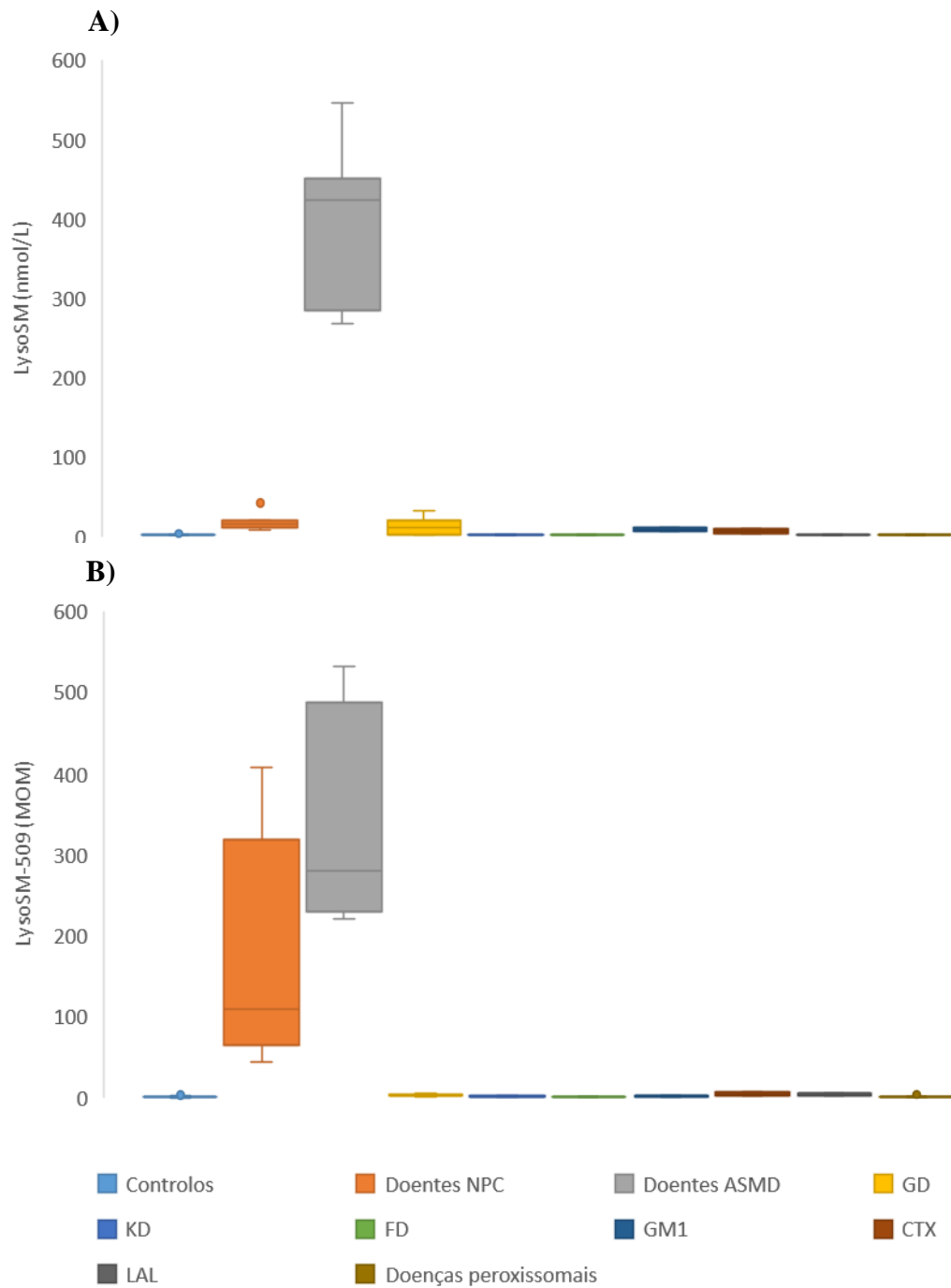


Figura 4-9: Caixa e Whisker de concentrações plasmáticas de LysoSM (A) e LysoSM-509 (B) em controlos, doentes Niemann-Pick C (NPC), deficiência em Esfingomielinase Ácida (ASMD), Gaucher (GD), Krabbe (KD), Fabry (FD), gangliosidose GM1 (GM1), xantomatose cerebrotendinosa (CTX), deficiência em lípase ácida lisossomal (LAL) e doenças peroxissomais. A linha representa a mediana, whiskers representam o mínimo e máximo, as bolas representam os valores atípicos.

Quando os valores obtidos nestes doentes são comparados com os de ASMD é óbvio que não são passíveis de levantar qualquer interferência no diagnóstico dessa patologia. No caso de NPC, diversas patologias, incluindo doença de Gaucher, Gangliosidose GM1 e CTX apresentaram valores similares de LysoSM aos dos doentes, no entanto no que diz

respeito à LysoSM-509 a diferença dos níveis dos doentes de NPC para as restantes patologias é suficientemente distinto para não interferir no diagnóstico (figura 4-9).

Conforme se pode constatar, com base no estudo de diferentes amostras de várias patologias e a conjugação dos dois biomarcadores, LysoSM e LysoSM-509, é possível diferenciar os doentes NPC e ASMD, não havendo sobreposição das concentrações plasmáticas com outras patologias que eventualmente pudessem levantar dificuldades à utilização destes biomarcadores no diagnóstico.

Concluindo, um doente de NPC tem uma elevada concentração de LysoSM-509 associada a uma concentração normal ou ligeiramente aumentada de LysoSM. Um doente com ASMD pode ser identificado pelo facto de ambos os biomarcadores se encontrarem muito elevados.

Informação adicional

De salientar que apesar de este ser um estudo retrospectivo, após aplicação no diagnóstico laboratorial de rotina, foi identificado um doente com forma infantil precoce de NPC unicamente com recurso aos biomarcadores LysoSM e LysoSM-509. A confirmação foi efetuada através do estudo de sequenciação dos genes *NPC1* e *NPC2*, tendo sido identificadas as duas variantes patogénicas no gene *NPC2*.

Conclusões e perspectivas futuras

O trabalho desenvolvido possibilitou a implementação de um teste rápido, sensível e robusto que permite a quantificação de LysoSM e LysoSM-509 em amostra de plasma humano. Permitiu a quantificação da LysoSM-509 através de método semi-quantitativo, apesar da indisponibilidade de composto sintético. Espera-se num futuro próximo a comercialização de um padrão de referência deste composto com o intuito de tornar o método quantitativo.

Esta metodologia permite discriminar entre doentes de NPC e ASMD, e passou a ser utilizada como método de rastreio de primeira linha para estas duas patologias, ultrapassando essencialmente as limitações dos tradicionais testes de diagnóstico, reduzindo o tempo de intervenção do operador, além do custo e tempo de resposta.

A identificação de um doente de NPC, após a introdução na rotina laboratorial do método desenvolvido, sem ser necessário o recurso ao tradicional teste de coloração com filipina veio dar ênfase à atualidade e pertinência do trabalho desenvolvido, reforçando a especificidade e sensibilidade dos biomarcadores.

Como perspectivas futuras espera-se: i) colaborar com outros centros para um estudo mais aprofundado e elaborado, de forma a incluir um maior número de amostras; ii) realizar um rastreio de LysoSM e LysoSM-509 em adultos referenciados em alas psiquiátricas de forma a tentar identificar formas tardias que são de mais difícil diagnóstico; iii) incorporar outros esfingolípidos de modo a que numa só interação seja possível o diagnóstico de outras esfingolipidoses maximizando o custo-eficiência do teste.

Referências Bibliográficas

- Al-Jasmi, F. A., Tawfig, N., Berniah, A., Ali, B. R., Taleb, M., Hertecant, J. L., ... Souid, A.-K. (2012). Prevalence and Novel Mutations of Lysosomal Storage Disorders in United Arab Emirates. Em *JIMD Reports - Volume 10* (pp. 1–9). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/8904_2012_182
- Applegarth, D. A., Toone, J. R., & Lowry, R. B. (2000). Incidence of inborn errors of metabolism in British Columbia, 1969-1996. *Pediatrics*, *105*(1), e10.
- Arenas, F., Garcia-Ruiz, C., & Fernandez-Checa, J. C. (2017). Intracellular Cholesterol Trafficking and Impact in Neurodegeneration. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00382>
- Bellettato, C. M., Hubert, L., Scarpa, M., & Wangler, M. F. (2018). Inborn Errors of Metabolism Involving Complex Molecules: Lysosomal and Peroxisomal Storage Diseases. *Pediatric Clinics of North America*, *65*(2), 353–373. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2017.11.011>
- Björkhem, I., Diczfalusy, U., Lövgren-Sandblom, A., Starck, L., Jonsson, M., Tallman, K., ... Guengerich, F. P. (2014). On the formation of 7-ketocholesterol from 7-dehydrocholesterol in patients with CTX and SLO. *Journal of Lipid Research*, *55*(6), 1165–1172. <https://doi.org/10.1194/jlr.P048603>
- Boenzi, S., Deodato, F., Taurisano, R., Goffredo, B. M., Rizzo, C., & Dionisi-Vici, C. (2016). Evaluation of plasma cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol and 7-ketocholesterol in inherited disorders related to cholesterol metabolism. *Journal of Lipid Research*, *57*(3), 361–367. <https://doi.org/10.1194/jlr.M061978>
- Boenzi, S., Deodato, F., Taurisano, R., Martinelli, D., Verrigni, D., Carrozzo, R., ... Johnson, D. W. (2014). A new simple and rapid LC-ESI-MS/MS method for quantification of plasma oxysterols as dimethylaminobutyrate esters. Its successful use for the diagnosis of Niemann-Pick type C disease. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, *437*, 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.07.010>
- Bonnot, O., Klünemann, H. H., Sedel, F., Tordjman, S., Cohen, D., & Walterfang, M. (2014). Diagnostic and treatment implications of psychosis secondary to treatable metabolic disorders in adults: a systematic review. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, *9*, 65. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-9-65>
- Butler, J. D., Comly, M. E., Kruth, H. S., Vanier, M., Filling-Katz, M., Fink, J., ... Tokoro, T. (1987). Niemann-pick variant disorders: comparison of errors of cellular cholesterol homeostasis in group D and group C fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *84*(2), 556–560.

- Carstea, E. D., Morris, J. A., Coleman, K. G., Loftus, S. K., Zhang, D., Cummings, C., ... Tagle, D. A. (1997). Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science (New York, N.Y.)*, 277(5323), 228–231.
- Crocker, A. C. (1961). The cerebral defect in Tay-Sachs disease and Niemann-Pick disease. *Journal of Neurochemistry*, 7, 69–80.
- Crocker, A. C., & Farber, S. (1958). Niemann-Pick disease: a review of eighteen patients. *Medicine*, 37(1), 1–95.
- Czaplicki, S. (2013). Chromatography in Bioactivity Analysis of Compounds. *Column Chromatography*. <https://doi.org/10.5772/55620>
- da Veiga Pereira, L., Desnick, R. J., Adler, D. A., Disteché, C. M., & Schuchman, E. H. (1991). Regional assignment of the human acid sphingomyelinase gene (SMPD1) by PCR analysis of somatic cell hybrids and in situ hybridization to 11p15.1---p15.4. *Genomics*, 9(2), 229–234.
- Domon, B., & Aebersold, R. (2006). Mass Spectrometry and Protein Analysis. *Science*, 312(5771), 212–217. <https://doi.org/10.1126/science.1124619>
- Elleder, M. (1989). Niemann-Pick disease. *Pathology, Research and Practice*, 185(3), 293–328. [https://doi.org/10.1016/S0344-0338\(89\)80006-8](https://doi.org/10.1016/S0344-0338(89)80006-8)
- Evans, W. R. H., & Hendriksz, C. J. (2017). Niemann-Pick type C disease - the tip of the iceberg? A review of neuropsychiatric presentation, diagnosis and treatment. *BJPsych Bulletin*, 41(2), 109–114. <https://doi.org/10.1192/pb.bp.116.054072>
- Ferreira, C. R., & Gahl, W. A. (2017). Lysosomal storage diseases. *Translational Science of Rare Diseases*, 2(1–2), 1–71. <https://doi.org/10.3233/TRD-160005>
- Friedland, N., Liou, H.-L., Lobel, P., & Stock, A. M. (2003). Structure of a cholesterol-binding protein deficient in Niemann-Pick type C2 disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(5), 2512–2517. <https://doi.org/10.1073/pnas.0437840100>
- Fu, R., Yanjanin, N. M., Bianconi, S., Pavan, W. J., & Porter, F. D. (2010). Oxidative Stress in Niemann-Pick Disease, Type C. *Molecular genetics and metabolism*, 101(2–3), 214–218. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2010.06.018>
- Geberhiwot, T., Moro, A., Dardis, A., Ramaswami, U., Sirrs, S., Marfa, M. P., ... International Niemann-Pick Disease Registry (INPDR). (2018). Consensus clinical management guidelines for Niemann-Pick disease type C. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 13(1), 50. <https://doi.org/10.1186/s13023-018-0785-7>
- Giese, A.-K., Mascher, H., Grittner, U., Eichler, S., Kramp, G., Lukas, J., ... Rolfs, A. (2015). A novel, highly sensitive and specific biomarker for Niemann-Pick type C1 disease. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 10, 78. <https://doi.org/10.1186/s13023-015-0274-1>

- Hammerschmidt, T. G., de Oliveira Schmitt Ribas, G., Saraiva-Pereira, M. L., Bonatto, M. P., Kessler, R. G., Souza, F. T. S., ... Vargas, C. R. (2018). Molecular and biochemical biomarkers for diagnosis and therapy monitorization of Niemann-Pick type C patients. *International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 66, 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2017.11.007>
- Hollak, C. E., van Weely, S., van Oers, M. H., & Aerts, J. M. (1994). Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease. *Journal of Clinical Investigation*, 93(3), 1288–1292.
- Jiang, X., Sidhu, R., Porter, F. D., Yanjanin, N. M., Speak, A. O., te Vruchte, D. T., ... Ory, D. S. (2011). A sensitive and specific LC-MS/MS method for rapid diagnosis of Niemann-Pick C1 disease from human plasma. *Journal of Lipid Research*, 52(7), 1435–1445. <https://doi.org/10.1194/jlr.D015735>
- Kampine, J. P., Bardy, R. O., Kanfer, J. N., Feld, M., & Shapiro, D. (1967). Diagnosis of Gaucher's Disease and Niemann-Pick Disease with Small Samples of Venous Blood. *Science*, 155(3758), 86–88. <https://doi.org/10.1126/science.155.3758.86>
- Kannenbergh, F., Nofer, J.-R., Schulte, E., Reunert, J., Marquardt, T., & Fobker, M. (2017). Determination of serum cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol by gas chromatography-mass spectrometry for identification of Niemann-Pick type C (NPC) disease. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 169, 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.02.030>
- Klinke, G., Rohrbach, M., Giugliani, R., Burda, P., Baumgartner, M. R., Tran, C., ... Hersberger, M. (2015). LC-MS/MS based assay and reference intervals in children and adolescents for oxysterols elevated in Niemann-Pick diseases. *Clinical Biochemistry*, 48(9), 596–602. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.03.007>
- Kruth, H. S., Comly, M. E., Butler, J. D., Vanier, M. T., Fink, J. K., Wenger, D. A., ... Pentchev, P. G. (1986). Type C Niemann-Pick disease. Abnormal metabolism of low density lipoprotein in homozygous and heterozygous fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry*, 261(35), 16769–16774.
- Kuchar, L., Sikora, J., Gulinello, M. E., Poupetova, H., Lugowska, A., Malinova, V., ... Ledvinova, J. (2017). Quantitation of plasmatic lysosphingomyelin and lysosphingomyelin-509 for differential screening of Niemann-Pick A/B and C diseases. *Analytical Biochemistry*, 525, 73–77. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.02.019>
- Kwon, H. J., Abi-Mosleh, L., Wang, M. L., Deisenhofer, J., Goldstein, J. L., Brown, M. S., & Infante, R. E. (2009). Structure of N-terminal domain of NPC1 reveals distinct subdomains for binding and transfer of cholesterol. *Cell*, 137(7), 1213–1224. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.049>

- Lin, N., Zhang, H., Qiu, W., Ye, J., Han, L., Wang, Y., & Gu, X. (2014). Determination of 7-ketocholesterol in plasma by LC-MS for rapid diagnosis of acid SMase-deficient Niemann-Pick disease. *Journal of Lipid Research*, *55*(2), 338–343. <https://doi.org/10.1194/jlr.D044024>
- McGovern, M. M., Dionisi-Vici, C., Giugliani, R., Hwu, P., Lidove, O., Lukacs, Z., ... Wasserstein, M. P. (2017). Consensus recommendation for a diagnostic guideline for acid sphingomyelinase deficiency. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, *19*(9), 967–974. <https://doi.org/10.1038/gim.2017.7>
- McGovern, M. M., Wasserstein, M. P., Giugliani, R., Bembi, B., Vanier, M. T., Mengel, E., ... Cox, G. F. (2008). A Prospective, Cross-sectional Survey Study of the Natural History of Niemann-Pick Disease Type B. *Pediatrics*, *122*(2), e341–e349. <https://doi.org/10.1542/peds.2007-3016>
- Meikle, P. J., Hopwood, J. J., Clague, A. E., & Carey, W. F. (1999). Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA*, *281*(3), 249–254.
- Naureckiene, S., Sleat, D. E., Lackland, H., Fensom, A., Vanier, M. T., Wattiaux, R., ... Lobel, P. (2000). Identification of HE1 as the Second Gene of Niemann-Pick C Disease. *Science*, *290*(5500), 2298–2301. <https://doi.org/10.1126/science.290.5500.2298>
- Neufeld, E. B., Wastney, M., Patel, S., Suresh, S., Cooney, A. M., Dwyer, N. K., ... Blanchette-Mackie, E. J. (1999). The Niemann-Pick C1 protein resides in a vesicular compartment linked to retrograde transport of multiple lysosomal cargo. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*(14), 9627–9635.
- Pajares, S., Arias, A., García-Villoria, J., Macías-Vidal, J., Ros, E., de las Heras, J., ... Ribes, A. (2015). Cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol: high levels in Niemann-Pick type C, cerebrotendinous xanthomatosis, and lysosomal acid lipase deficiency. *Journal of Lipid Research*, *56*(10), 1926–1935. <https://doi.org/10.1194/jlr.M060343>
- Pataj, Z., Liebisch, G., Schmitz, G., & Matysik, S. (2016). Quantification of oxysterols in human plasma and red blood cells by liquid chromatography high-resolution tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography. A*, *1439*, 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.11.015>
- Patterson, M. C., Clayton, P., Gissen, P., Anheim, M., Bauer, P., Bonnot, O., ... Marquardt, T. (2017). Recommendations for the detection and diagnosis of Niemann-Pick disease type C: An update. *Neurology. Clinical Practice*, *7*(6), 499–511. <https://doi.org/10.1212/CPJ.0000000000000399>
- Patterson, M. C., Hendriksz, C. J., Walterfang, M., Sedel, F., Vanier, M. T., Wijburg, F., & NP-C Guidelines Working Group. (2012). Recommendations for the diagnosis and management of Niemann-Pick disease type C: an update. *Molecular Genetics and Metabolism*, *106*(3), 330–344. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.03.012>

- Pavlů-Pereira, H., Asfaw, B., Poupctová, H., Ledvinová, J., Sikora, J., Vanier, M. T., ... Elleder, M. (2005). Acid sphingomyelinase deficiency. Phenotype variability with prevalence of intermediate phenotype in a series of twenty-five Czech and Slovak patients. A multi-approach study. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 28(2), 203–227. <https://doi.org/10.1007/s10545-005-5671-5>
- Peake, K. B., & Vance, J. E. (2010). Defective cholesterol trafficking in Niemann-Pick C-deficient cells. *FEBS Letters*, 584(13), 2731–2739. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.047>
- Pentchev, P. G., Comly, M. E., Kruth, H. S., Tokoro, T., Butler, J., Sokol, J., ... Patel, S. (1987). Group C Niemann-Pick disease: faulty regulation of low-density lipoprotein uptake and cholesterol storage in cultured fibroblasts. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 1(1), 40–45.
- Pettazzoni, M., Froissart, R., Pagan, C., Vanier, M. T., Ruet, S., Latour, P., ... Cheillan, D. (2017). LC-MS/MS multiplex analysis of lysosphingolipids in plasma and amniotic fluid: A novel tool for the screening of sphingolipidoses and Niemann-Pick type C disease. *PLoS One*, 12(7), e0181700. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181700>
- Pinto, R., Caseiro, C., Lemos, M., Lopes, L., Fontes, A., Ribeiro, H., ... Sá Miranda, M. C. (2004). Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal. *European Journal of Human Genetics: EJHG*, 12(2), 87–92. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201044>
- Piraud, M., Pettazzoni, M., Lavoie, P., Ruet, S., Pagan, C., Cheillan, D., ... Froissart, R. (2018). Contribution of tandem mass spectrometry to the diagnosis of lysosomal storage disorders. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 41(3), 457–477. <https://doi.org/10.1007/s10545-017-0126-3>
- Polo, G., Burlina, A., Furlan, F., Kolamunnage, T., Cananzi, M., Giordano, L., ... Burlina, A. (2016). High level of oxysterols in neonatal cholestasis: a pitfall in analysis of biochemical markers for Niemann-Pick type C disease. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 54(7), 1221–1229. <https://doi.org/10.1515/cclm-2015-0669>
- Polo, G., Burlina, A. P., Kolamunnage, T. B., Zampieri, M., Dionisi-Vici, C., Strisciuglio, P., ... Burlina, A. B. (2017). Diagnosis of sphingolipidoses: a new simultaneous measurement of lysosphingolipids by LC-MS/MS. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 55(3), 403–414. <https://doi.org/10.1515/cclm-2016-0340>
- Poorthuis, B. J., Wevers, R. A., Kleijer, W. J., Groener, J. E., de Jong, J. G., van Weely, S., ... van Diggelen, O. P. (1999). The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. *Human Genetics*, 105(1–2), 151–156.
- Porter, F. D., Scherrer, D. E., Lanier, M. H., Langmade, S. J., Molugu, V., Gale, S. E., ... Ory, D. S. (2010). Cholesterol oxidation products are sensitive and specific blood-based

- biomarkers for Niemann-Pick C1 disease. *Science Translational Medicine*, 2(56), 56ra81. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001417>
- Poupětová, H., Ledvinová, J., Berná, L., Dvořáková, L., Kožich, V., & Elleder, M. (2010). The birth prevalence of lysosomal storage disorders in the Czech Republic: comparison with data in different populations. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 33(4), 387–396. <https://doi.org/10.1007/s10545-010-9093-7>
- Ribas, G. S., Souza, H. M., de Mari, J., Deon, M., Mescka, C., Saraiva-Pereira, M. L., ... Giugliani, R. (2016). Selective screening of Niemann-Pick type C Brazilian patients by cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol and chitotriosidase measurements followed by filipin staining and NPC1/NPC2 gene analysis. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 459, 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2016.05.015>
- Romanello, M., Zampieri, S., Bortolotti, N., Deroma, L., Sechi, A., Fiumara, A., ... Dardis, A. (2016). Comprehensive Evaluation of Plasma 7-Ketocholesterol and Cholestan-3 β ,5 α ,6 β -Triol in an Italian Cohort of Patients Affected by Niemann-Pick Disease due to NPC1 and SMPD1 Mutations. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 455, 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2016.01.003>
- Saftig, P. (2006). Physiology of the lysosome. Em A. Mehta, M. Beck, & G. Sunder-Plassmann (Eds.), *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS*. Oxford: Oxford PharmaGenesis. Obtido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11604/>
- Saudubray, Jean-Marie, & Garcia-Cazorla, À. (2018). Inborn Errors of Metabolism Overview: Pathophysiology, Manifestations, Evaluation, and Management. *Pediatric Clinics of North America*, 65(2), 179–208. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2017.11.002>
- Saudubray, J.-M., & Sedel, F. (2009). [Inborn errors of metabolism in adults]. *Annales D'endocrinologie*, 70(1), 14–24. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2008.12.004>
- Saudubray, J.-M., Sedel, F., & Walter, J. H. (2006). Clinical approach to treatable inborn metabolic diseases: an introduction. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 29(2–3), 261–274. <https://doi.org/10.1007/s10545-006-0358-0>
- Schuchman, E. H., Levran, O., Pereira, L. V., & Desnick, R. J. (1992). Structural organization and complete nucleotide sequence of the gene encoding human acid sphingomyelinase (SMPD1). *Genomics*, 12(2), 197–205.
- Schuchman, Edward H., & Desnick, R. J. (2017). Types A and B Niemann-Pick disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, 120(1–2), 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2016.12.008>
- Sedel, F., Barnerias, C., Dubourg, O., Desguerres, I., Lyon-Caen, O., & Saudubray, J.-M. (2007). Peripheral neuropathy and inborn errors of metabolism in adults. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 30(5), 642–653. <https://doi.org/10.1007/s10545-007-0684-x>

- Sleat, D. E., Wiseman, J. A., El-Banna, M., Price, S. M., Verot, L., Shen, M. M., ... Lobel, P. (2004). Genetic evidence for nonredundant functional cooperativity between NPC1 and NPC2 in lipid transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(16), 5886–5891. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308456101>
- Vairamani, M. (2003). Chemistry Nobel prize 2002. *Resonance*, *8*(4), 69–76. <https://doi.org/10.1007/BF02883538>
- Vance, J. E. (2012). Dysregulation of cholesterol balance in the brain: contribution to neurodegenerative diseases. *Disease Models & Mechanisms*, *5*(6), 746–755. <https://doi.org/10.1242/dmm.010124>
- Vance, J. E., & Karten, B. (2014). Niemann-Pick C disease and mobilization of lysosomal cholesterol by cyclodextrin. *Journal of Lipid Research*, *55*(8), 1609–1621. <https://doi.org/10.1194/jlr.R047837>
- Vanier, M. T., Rodriguez-Lafrasse, C., Rousson, R., Gazzah, N., Juge, M. C., Pentchev, P. G., ... Louisot, P. (1991). Type C Niemann-Pick disease: spectrum of phenotypic variation in disruption of intracellular LDL-derived cholesterol processing. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1096*(4), 328–337.
- Vanier, Marie T. (2010). Niemann-Pick disease type C. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, *5*, 16. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-5-16>
- Vanier, Marie T. (2015). Complex lipid trafficking in Niemann-Pick disease type C. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *38*(1), 187–199. <https://doi.org/10.1007/s10545-014-9794-4>
- Vanier, Marie T., Gissen, P., Bauer, P., Coll, M. J., Burlina, A., Hendriksz, C. J., ... Kolb, S. A. (2016). Diagnostic tests for Niemann-Pick disease type C (NP-C): A critical review. *Molecular Genetics and Metabolism*, *118*(4), 244–254. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2016.06.004>
- Voorink-Moret, M., Goorden, S. M. I., van Kuilenburg, A. B. P., Wijburg, F. A., Ghauharali-van der Vlugt, J. M. M., Beers-Stet, F. S., ... Vaz, F. M. (2018). Rapid screening for lipid storage disorders using biochemical markers. Expert center data and review of the literature. *Molecular Genetics and Metabolism*, *123*(2), 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2017.12.431>
- Wasserstein, M. P., & Schuchman, E. H. (1993). Acid Sphingomyelinase Deficiency. Em M. P. Adam, H. H. Ardinger, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. Bean, K. Stephens, & A. Amemiya (Eds.), *GeneReviews®*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle. Obtido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1370/>
- Welford, R. W. D., Garzotti, M., Marques Lourenço, C., Mengel, E., Marquardt, T., Reunert, J., ... Groenen, P. (2014). Plasma lysosphingomyelin demonstrates great potential as a

- diagnostic biomarker for Niemann-Pick disease type C in a retrospective study. *PloS One*, 9(12), e114669. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114669>
- Wraith, J. E. (2011). Lysosomal disorders. *Paediatrics and Child Health*, 21(2), 76–79. <https://doi.org/10.1016/j.paed.2010.08.012>
- Zampieri, S., Mellon, S. H., Butters, T. D., Nevyjel, M., Covey, D. F., Bembi, B., & Dardis, A. (2009). Oxidative stress in NPC1 deficient cells: protective effect of allopregnanolone. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(9B), 3786–3796. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00493.x>
- Zhang, H., Wang, Y., Lin, N., Yang, R., Qiu, W., Han, L., ... Gu, X. (2014). Diagnosis of Niemann-Pick disease type C with 7-ketocholesterol screening followed by NPC1/NPC2 gene mutation confirmation in Chinese patients. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 9, 82. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-9-82>