

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS: BIOQUÍMICA

**EFEITO DA CRIOPRESERVAÇÃO DE LINFÓCITOS B
TRANSFORMADOS PELO VÍRUS EPSTEIN-BARR SOBRE A
ATIVIDADE DE HIDROLASES LISOSSÔMICAS**

Alexandre Silva de Mello

Tese de Doutorado

Porto Alegre, 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS: BIOQUÍMICA

**EFEITO DA CRIOPRESERVAÇÃO DE LINFÓCITOS B
TRANSFORMADOS PELO VÍRUS EPSTEIN-BARR SOBRE A
ATIVIDADE DE HIDROLASES LISOSSÔMICAS**

Alexandre Silva de Mello

Orientador: Prof. Dra. Janice Carneiro Coelho

Porto Alegre, 2010

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas –
Bioquímica, como requisito para a obtenção do grau de DOUTOR EM
BIOQUÍMICA

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Juares e Marilene Mello, pelo exemplo de caráter, pela educação e incentivo para conclusão de mais esse objetivo.

À minha orientadora Prof^ª. Dra. Janice Carneiro Coelho, pela confiança, cumplicidade, incentivo, paciência e por acreditar que esse projeto seria possível.

Ao Banco de Sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelas amostras.

A minha bolsista, Franciane B. Mendes, pelo auxílio nas diversas etapas deste trabalho.

Aos meus colegas do Centro de Neurologia e Biologia Celular da Universidade de Coimbra e amigos que fiz em Portugal, pelo apoio, companheirismo, amizade e transmissão de conhecimentos. Em especial aos colegas do Laboratório Infection Phagocytosis and Pathogens.

A Prof. Dra. Maria Otilia Vitoriana Vieira, pela disponibilidade, ensino e cumplicidade.

A colega Michelle Viegas, pelas idéias, sugestões, paciência e pela parceria nas conversas sobre Porto Alegre, para matar a saudade, no laboratório em Coimbra, Portugal.

Aos amigos que fiz em meu laboratório durante esse período, Prof^ª. Dr^ª. Vera Maria Treis Trindade, MSc.Cristina Castilhos, Jamila Mezzalira, Ana, Tarik e o Fernando.

Ao pessoal do Serviço de Genética Médica, pela parceria, nas dosagens enzimáticas. Especialmente as minhas ex-colegas Fernanda Timm e Rejane Kessler, pela amizade.

Ao pessoal do laboratório 21, Francieli, Silvia, Léo pelo apoio e companheirismo.

Ao Centro de Terapia Gênica, do Centro de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela parceria nos experimentos e pelas idéias compartilhadas ao longo destes últimos anos.

À Bióloga Moema Queiroz Vieira do Centro de Microscopia da UFRGS, pelo auxílio e paciência.

Ao pessoal do laboratório 38, pela tentativa e pela perspectiva futura na parte experimental deste projeto.

Aos membros da banca, Prof. Dra. Fátima Guma, Prof. Dr. Moisés Bauer e Prof. Dra. Melissa Camazola.

A Sra. Cléia, da secretaria da pós-graduação, pela ajuda no preparo do processo para obtenção de bolsa para doutorado sanduíche, de última hora.

Aos meus irmãos, Cristiano e Denise, pela força durante minha viagem.

A minha filha, a quem prometo ser bem mais presente.

Ao CNPq, CAPES e ao GPPG/HCPA, pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	iii
PARTE I.....	6
RESUMO.....	7
I. INTRODUÇÃO.....	9
I.1 A Biologia do vírus.....	10
I.2 Transformação dos Linfócitos B.....	13
I.3 Erros Inatos do Metabolismo.....	15
I.3.1 Sinais Clínicos e Laboratoriais.....	17
I.3.2 Tratamento.....	20
I.4 Hidrolases lisossômicas.....	21
I.5 Avaliação da Transformação Celular.....	23
II. OBJETIVOS.....	27
PARTE II.....	28
III. MÉTODOS E RESULTADOS.....	29
III.1 CAPÍTULO 1.....	29
Feasibility of using cryopreserved lymphoblastoid cells to diagnose some lysosomal storage diseases.....	29
III.2 CAPÍTULO 2.....	36
Ultrastructural Analysis as a Tool in Avaliation of Lymphoblastoid Cell Lines Transformation to Lysosomal Acid Hydrolases Diagnosis.....	36
PARTE III.....	59
IV. DISCUSSÃO.....	60
V. CONCLUSÕES.....	67
Objetivo 1.....	67
Conclusões.....	67
Objetivo 2.....	68
Conclusões.....	68
Objetivo 3.....	69
Conclusão.....	69
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
VII. ANEXOS.....	76
VII.1 RESULTADOS COMPLEMENTARES.....	76
Medida da Atividade de Hidrolases Lisossômicas de Linfócitos B Transformados com EBV e Criopreservados por Longo Tempo.....	76
VII.2 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	88
VII.3 LISTA DE ABREVIATURAS.....	90
VII.4 LISTA DE FIGURAS.....	91
VII.5 LISTA DE TABELAS.....	92

PARTE I

RESUMO

A presente tese aborda os principais aspectos da biologia do vírus Epstein-Barr (EBV), suas relações com doenças, seu potencial uso como ferramenta para a biologia celular e a reprodutibilidade desta célula para o auxílio no diagnóstico de Erros Inatos do Metabolismo (EIM) através da medida de atividades de hidrolases lisossômicas. Os objetivos deste trabalho foram investigar as alterações celulares e morfológicas nos linfócitos B infectados com EBV, afim de confirmar a transformação celular nos 12 dias de cultura, para certificação do protocolo empregado; determinar a atividade, no momento da coleta (12 dias de cultivo) e imediatamente após 180, 365 e 730 dias de criopreservação em nitrogênio líquido, das enzimas β -galactosidase, β -glicosidase, α -galactosidase, α -glicosidase e α -iduronidase em Linhagens Celulares Linfoblastóides (LCL) transformados com EBV de indivíduos normais e determinar a atividade, no momento da coleta (12 dias de cultivo) e imediatamente após 180 dias de criopreservação das enzimas β -glicosidase, α -galactosidase e α -iduronidase em LCLs transformados com EBV de pacientes com doenças de Gaucher e Fabry e Mucopolissacaridose tipo I. Este trabalho mostrou que o protocolo empregado foi eficiente na transformação de linfócitos B pelo EBV através das 3 ferramentas utilizadas: imunohistoquímica, microscopia eletrônica de transmissão e microscopia confocal. Foram observados, através destes instrumentos, o aparecimento de clusters celulares, vacúolos citoplasmáticos, binucleação e aumento no conteúdo de organelas, o que é esperado em células infectadas por EBV. Foi observado também que as células cultivadas por 12 dias com EBV apresentavam a atividade da β -glicosidase e da α -iduronidase diferente significativamente daquela de linfócitos não infectados. Após 6 meses, 1 e 2 anos de criopreservação das células transformadas com EBV, em nitrogênio líquido, as enzimas β -galactosidase, β -glicosidase, α -galactosidase, α -glicosidase e α -iduronidase mantiveram suas atividades semelhantes aquelas após 12 dias de cultivo celular. O mesmo ocorreu quando utilizamos amostras de pacientes com doença de Gaucher, Fabry e Mucopolissacaridose tipo I após 6 meses de criopreservação. Este trabalho mostrou que o protocolo empregado foi eficiente na transformação de linfócitos B pelo vírus Epstein Barr e que uma vez congeladas até pelo menos 1 ano em nitrogênio líquido, todas as enzimas analisadas mantêm suas atividades semelhantes aquelas após 12 dias de cultivo celular.

ABSTRACT

The present study addresses the main aspects of the biology of the Epstein-Barr virus (EBV) and its relationships with diseases, its potentials as a tool in cell biology, and the reproducibility of EBV-infected cells to assist in the diagnosis of Inborn errors of metabolism (IEM) using a measure of the activities of lysosomal hydrolases. The objectives of this study were (i) to investigate the cellular and morphological changes in B-lymphocytes infected with EBV to confirm cell transformation within the 12-day culturing period in order to verify the applicability of the method; (ii) to determine the activity of the enzymes β -galactosidase, β -glucosidase, α -iduronidase, α -galactosidase and α -glucosidase in lymphoblastoid cell lines at the moment of collection (12-day culturing) and immediately after 180, 365 and 730 days in lymphoblastoid cell lines (LCLs) transformed with EBV of normal individuals frozen in liquid nitrogen and (iii) to determine the activities of the enzymes β -glucosidase, α -galactosidase and α -iduronidase at the moment of collection (12 days of culturing) and immediately after 180 days in LCLs transformed by the EBV of patients with Gaucher and Fabry diseases and with mucopolysaccharidosis type I frozen in liquid nitrogen. The results showed that the protocol was efficient to transform B-lymphocytes by EBV using three tools: immunohistochemistry, transmission electron microscopy and confocal microscopy. The technique afforded to observe the emergence of clusters, cytoplasm vacuoles, binucleation and increased organelle contents, which are expected in EBV-infected cells. Also, it was observed that cells cultured with EBV for 12 days presented β -glucosidase and α -iduronidase significantly different from that of non-infected lymphocytes. Activity of the enzymes β -galactosidase, β -glucosidase, α -galactosidase, α -glucosidase and α -iduronidase measured after 180, 365 and 730 days in cryopreservation of EBV-transformed cells in liquid nitrogen were similar to that of samples after 12-day culturing of cells. The same was observed when we used samples from patients with Gaucher, Fabry and mucopolysaccharidosis type I after a 6-month cryopreservation period. This study shows that the protocol was efficient in transforming B-lymphocytes by EBV and that the activities of all enzymes frozen for at least one year in liquid nitrogen remained similar to that of samples collected after 12-day culturing.

I. INTRODUÇÃO

O vírus Epstein-Barr (EBV) foi descoberto em 1964 na cultura de tecido de um paciente com linfoma de Burkitt (Epstein *et al.*, 1964). Esse vírus é considerado um dos mais bem sucedidos em distribuição na superfície terrestre, pois contamina mais de 90% dos seres humanos, podendo persistir no seu hospedeiro pela vida toda (Cohen *et al.*, 2009). Além disso, já foi relatada a existência do EBV em primatas não humanos (Cohen, 2000).

O EBV infecta os linfócitos B humanos, através do receptor CD21, sendo o agente etiológico da mononucleose infecciosa. A infecção inicial estimula a rápida proliferação no sangue periférico dos linfócitos B, levando a uma leucocitose na 1ª semana e declinando entre a terceira e a quarta semana (Ascherio e Munger, 2010). Após a resolução clínica da infecção inicial, a longo prazo, o EBV também está associado com a formação de tumores, no hospedeiro (Davies *et al.*, 2010).

Devido a sua capacidade de transformação de linfócitos B o EBV vem sendo utilizado como ferramenta para o estudo da biologia celular (Minami *et al.*, 1977). O linfócito B sofre uma série de alterações morfológicas durante o processo de transformação, que incluem a formação de vacúolos citoplasmáticos ricos em lisossomos (Maret *et al.*, 1985). Por esta razão, estudos utilizam linfócitos B transformados por EBV como ferramenta para

avaliação de hidrolases lisossômicas humanas (Negre *et al.*, 1986). A presente introdução aborda os principais aspectos da biologia do EBV e as suas relações com doenças (1), o potencial uso como ferramenta para a biologia celular (2) e a reprodutibilidade desta célula para o auxílio no diagnóstico de Erros Inatos do Metabolismo (EIM) através da medida de atividades de hidrolases lisossômicas (3).

1.1 A Biologia do vírus

O EBV é um membro da família Herpesviridae, sub-família Gammaherpesvirinae, do gênero *Lymphocryptovirus* sp (Przybylski *et al.*, 2010). O genoma viral é constituído de DNA de dupla fita linear de 100 milhões de daltons (Fleisher, 1991), com 170.000 nucleotídeos (Takacs *et al.*, 2010). Esse vírus apresenta uma glicoproteína de envelope chamada gp350 que se liga ao receptor viral CD21, localizado na superfície do linfócito B (Takacs *et al.*, 2010). O CD21 é na verdade o receptor para o componente C3d do complemento que, juntamente com o CD19 e o CD81, formam um complexo de transdução de sinais (Goldsby, 2002). O CD21 é expresso abundantemente na célula B de memória (Schuster e Muschen, 2003), sendo o alvo primário para infecção do EBV em indivíduos saudáveis (Babcock *et al.*, 1998). Outros fatores também são importantes para o sucesso dessa infecção, como o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II (Cohen, 2000).

Após sua entrada na célula hospedeira, dois tipos de RNA são transcritos, seis proteínas nucleares e duas proteínas de membrana são expressas na infecção latente (Cohen, 2000).

Entre as proteínas nucleares, temos a proteína de antígeno nuclear do EBV 1 (EBNA) liga-se ao DNA viral fazendo com que o genoma do EBV passe da forma linear para a forma circular. Já o antígeno nuclear do EBV-2 (EBNA-2) regula a expressão das duas proteínas de membrana de fase latente (LMP 1 e 2), assim como as proteínas celulares que controlam o crescimento e a transformação das células B. A proteína EBNA-3 regula a expressão de genes celulares (Fleisher, 1991; Cohen, 2000; Gorzer *et al.*, 2006).

A LMP-1 induz a expressão das moléculas de adesão na superfície dos linfócitos B. O alto nível de expressão destas moléculas é responsável pela formação dos grumos de linfócitos B infectados pelo EBV *in vitro* (Katano *et al.*, 2004).

A proteína LMP-1 age como uma oncoproteína, uma vez que tem a capacidade de transformar células normais em células cancerosas, induzindo o linfócito B a uma forma ativa mimetizando a molécula de superfície CD40. Essa atividade resulta na ativação do fator nuclear κ -B (NF- κ B) que é um fator de transcrição, tanto *in vivo* como *in vitro*, causando a ativação do *c-jun* que regula moléculas de adesão celular, produção de citocinas e a proliferação de célula B (Cohen, 2000; Wensing e Farrell, 2000).

A LMP-2 previne a reativação das células infectadas pelo EBV em estado de latência pelo bloqueio da fosforilação das tirosina-quinases Lyn e Syk (Cohen, 2000; Wensing e Farrell, 2000), além de bloquear a transdução de sinal a partir de imunoglobulinas de superfície, afetando assim, o fluxo de cálcio (Wensing e Farrell, 2000).

O vírus EBV estabelece uma relação infecciosa de longo prazo com os linfócitos B do seu hospedeiro. Este período de latência depende da capacidade das células B humanas driblarem o antígeno da célula T específica, através da expressão de genes virais, homólogos aos genes humanos encarregados de promover a ativação, sobrevivência, transformação e posterior imortalização do linfócito B (Fleisher, 1991).

Aproximadamente 100 genes são expressos durante a replicação do vírus, *in vitro*, mas somente 10 genes são expressos durante o período de latência da célula B infectada (Cohen, 2000). No entanto, a transcrição desses genes resulta em seis antígenos EBNA latentes. Essa transcrição pode ser iniciada por um ou dois promotores (Cp e Wp). Em qualquer linhagem celular clonal apenas um desses promotores é ativado, sendo o Cp utilizado preferencialmente (Takacs *et al.*, 2010).

O EBV exibe um padrão de expressão próprio que codifica genes que não são interpretados pelos antígenos das células T citotóxicas, evitando assim uma resposta imune ao organismo invasor (Schuster e Muschen, 2003).

A infecção pelo EBV em humanos resulta em respostas humoral e celular. Embora estudos indiquem que os anticorpos que agem contra proteínas estruturais virais e os EBNA são importantes para o diagnóstico da infecção, a resposta imune celular é a mais importante ferramenta no controle da infecção pelo EBV. O controle da proliferação dos linfócitos B infectados pelo EBV é feito pelas células natural killer (NK) e células T citotóxicas (CD8+) durante a infecção primária. Na Mononucleose Infecciosa, mais de 40% das células T CD8+ são alvo de uma seqüência de proteína de replicação do EBV e

2% são alvo de proteína de latência do EBV. Depois de uma re-infecção celular com o EBV, os linfócitos saem de seu estado de latência por um novo contato com o vírus. Muitas células T citotóxicas reagem contra as proteínas latentes que são alvo da EBNA-3, que é uma proteína essencial no crescimento da transformação dos linfócitos B (Cohen, 2000; Wensing e Farrell, 2000).

A habilidade do EBV em persistir, driblando a potente resposta imune efetora contra ele, indica que o vírus criou uma estratégia evolutiva para enganar o sistema imune. O EBV codifica uma citocina e um receptor de citocina que talvez sejam importantes na modulação do sistema imune permitindo que a infecção persista (Cohen, 2000).

1.2 Transformação dos Linfócitos B

Já a infecção pelo EBV *in vitro* transforma facilmente os linfócitos B do sangue periférico humano, que proliferam ativamente linhagens celulares linfoblastóides (LCLs) (Takahashi *et al.*, 2003), com uma melhor resposta *in vitro*, quando complementadas com ciclosporina A (CSA) que parece deletar ou inativar a funcionalidade da célula T, induzindo ao rápido crescimento dos LCLs transformados pelo EBV (Chen *et al.*, 2009).

De uma maneira geral, *in vitro*, aproximadamente 24 horas após a adição do EBV, os LCLs apresentam dois aspectos diferentes indicando a transformação da célula B: (a) blastogênese, que torna-se evidente pelo aumento no tamanho do linfócito e (b) aumento no desenvolvimento de agregados de proliferação dos linfoblastos (*clusters*) (Neitzel, 1986). Os LCLs possuem também inúmeros vacúolos citoplasmáticos envolvidos por uma única

membrana (*Figura 1*), apresentando uma grande quantidade de material fibrillogranular que caracteriza um acúmulo lisossomal claramente visível com microscopia adequada (Maret *et al.*, 1985; Negre *et al.*, 1986).

Embora os receptores do EBV estejam presentes em todas as células B, apenas algumas células são infectadas pelo vírus (10-30%). *In vitro* existe uma relação direta entre a indução do EBNA, a síntese do DNA celular e a secreção das imunoglobulinas (Ig) em células B infectadas pelo EBV (Bird *et al.*, 1981).

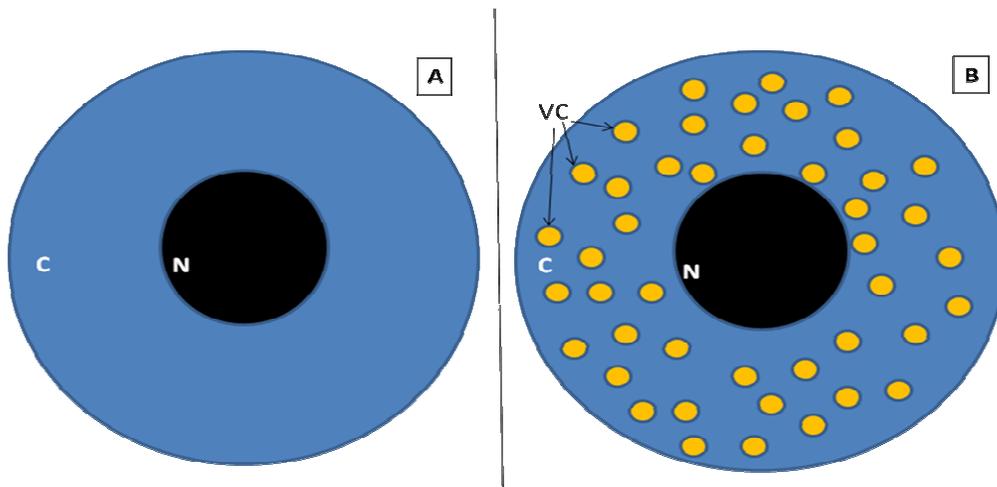


FIGURA 1 – Esquema de uma célula normal e uma célula infectada pelo vírus EBV. A: Linfócitos B e B: Linfócitos B Infectados. C: citoplasma; N: núcleo e VC: vacúolo citoplasmático.

Em situações de cultura de linfócitos, *in vitro*, o termo transformação é corretamente empregado, e não imortalização, quando ocorrem menos de 160 duplicações celulares (*population doubling levels*, PDLs), o que traria como consequência direta uma baixa atividade da telomerase. Para considerarmos

corretamente o termo imortalização, teríamos que ter mais de 160 PDLs e uma alta atividade de telomerase (Sugimoto *et al.*, 1999a). Essa imortalização acarreta, na célula B, uma morfologia imunoblástica e também a expressão dos antígenos nucleares do EBV (EBNAs) e as proteínas de membrana de fase latente (LMPs) (Sugimoto *et al.*, 1999b).

Foi descrito, através da análise de cromossomos, que após a imortalização dos linfócitos pelo EBV parte dos cromossomos fica alterada ou anormal, contrastando com amostras que sofreram apenas o processo de transformação, onde os cromossomos se mantêm normais ou inalterados (Sugimoto *et al.*, 1999a; Sugimoto *et al.*, 1999b). Porém, na maioria das linhagens celulares transformadas o genoma do EBV permanece inalterado (Neitzel, 1986).

1.3 Erros Inatos do Metabolismo

O termo erros inatos do metabolismo (EIM) foi proposto em 1908 por Sir Archibald Garrod, referindo-se a quatro doenças: alcaptonúria, cistinúria, pentosúria e albinismo. Esses distúrbios bioquímicos humanos são alterações que se manifestam pela diminuição ou mesmo ausência da função de uma proteína geralmente enzimática. As alterações resultam em bloqueio de rotas metabólicas, podendo ocorrer tanto o acúmulo de metabólicos tóxicos, como a falta de produtos essenciais ou o desvio do substrato para uma rota metabólica alternativa (*Figura 2*), acarretando em doença subsequente (Bickel, 1987).

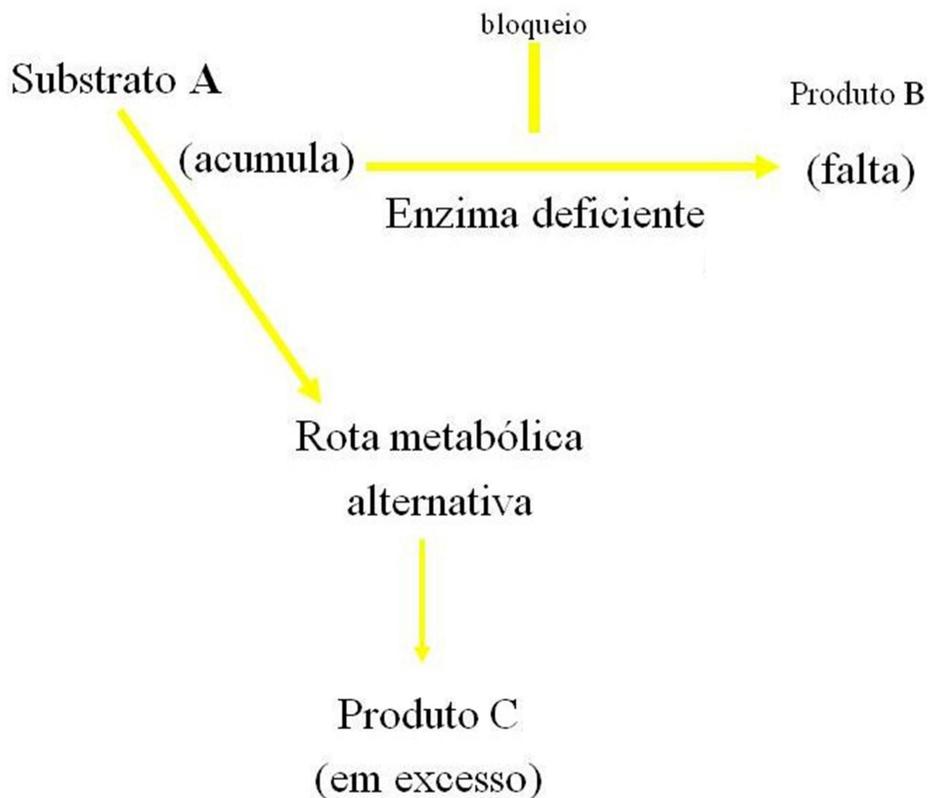


FIGURA 2 - Representação esquemática e simplificada dos processos envolvidos em um erro inato do metabolismo. Baseado em COELHO *et al.*, 1997.

De acordo com a literatura (Stambury *et al.*, 1983), todos os processos bioquímicos no organismo estão sob controle gênico e estão sujeitos a serem realizados de forma deficiente sempre que uma mutação gênica alterar a função de uma proteína.

Até o momento foram descritos mais de 500 EIM (Scriver, 2001), a maioria deles envolvendo processos de síntese, degradação, transporte ou armazenamento de moléculas no organismo (Benson, 1985). Os EIM causam um grande número de defeitos, com quadros clínicos variados, podendo ser desde assintomáticos até tão graves que levem à morte neonatal. Os EIM

graves geralmente se manifestam na infância, sendo que os sinais e os sintomas encontrados são semelhantes aos de muitas doenças infantis (Nowacki *et al.*, 1997).

Apesar de raros quando considerados individualmente, os EIM são relativamente frequentes em seu conjunto, podendo ocorrer aproximadamente um em cada mil recém-nascidos vivos (Nowacki *et al.*, 1997). As técnicas de investigação bioquímica têm colaborado para a descoberta de novos EIM, esclarecendo cada vez mais os já conhecidos.

Dentre os vários grupos de doenças que compõem os EIM, encontram-se as Doenças Lisossômicas de Depósito (DLD). Estas se caracterizam pela deficiência de hidrolases lisossômicas, levando ao acúmulo de substratos dentro dos lisossomos das células. As DLD mais freqüentes no sul do Brasil são aquelas relacionadas à deficiência das enzimas β -galactosidase, β -glicosidase e α -iduronidase (Coelho *et al.*, 1997; Severini *et al.*, 1999). Estas e outras DLD freqüentes estão relacionadas na *Tabela 1*.

1.3.1 Sinais Clínicos e Laboratoriais

Embora a sintomatologia dos EIM dependa do grau de deficiência enzimática e dos tecidos afetados, alguns sinais e sintomas aparecem com maior freqüência nesses distúrbios (Burton *et al.*, 1988).

As principais manifestações clínicas são deficiência de crescimento, dificuldade alimentar, vômitos, diarréia, letargia ou coma, hipotonicidade ou hipertonicidade, convulsões, dificuldade respiratória e apnéia, icterícia, hepatomegalia, fascies grosseira, dismorfias, odor anormal na pele e na urina, anormalidades oculares, cabelos anormais e macroglossia, atraso no

desenvolvimento psicomotor e, principalmente, retardo mental progressivo (Karam *et al.*, 2001).

Tabela 1 – Características clínicas de alguns EIM e as enzimas relacionadas (Coelho *et al.*, 1997; Karam *et al.*, 2001).

ENZIMA	ERROS INATOS DO METABOLISMO	SINTOMAS
β -glicosidase	Doença de Gaucher	Hipotonia, convulsões, espasticidade e oftalmoplegia
β -galactosidase	Gangliosidose GM1	Degeneração cerebral, hepatoesplenomegalia, hipotonia e retardo no desenvolvimento neuropsicomotor
α -iduronidase	Mucopolissacaridoses- MPS	Baixa estatura, perímetro cefálico aumentado e cardiopatia
α -glicosidase	Doença de Pompe	Cãibras, intolerância ao exercício, cardiomegalia e hipotonia muscular
α -galactosidase	Doença de Fabry	Dor e parestesias nos membros, hipoidrose, angioqueratomas e opacidade córnea

As culturas de fibroblastos obtidos de biópsias de pele são, até o momento, as únicas ferramentas para investigação e/ou confirmação destas doenças genéticas. Este material pode ser armazenado por longos períodos de tempo sem perda da atividade enzimática. Porém, o desconforto da coleta, o desconhecimento do procedimento correto por alguns laboratórios e um transtorno ainda maior nos casos de necessidade de recoleta de material, torna

a utilização de fibroblastos a de pele um método limitado (Coelho e Giuliani, 2000).

Além das culturas de fibroblastos, os leucócitos, o soro, a urina e o plasma também são indicados para a investigação de DLDs, mas esses espécimes biológicos apresentam degeneração ao longo do tempo, comprometendo os ensaios enzimáticos.

Linhagens celulares linfoblastóides originadas de linfócitos B estabelecidos através do sangue periférico incubado com o EBV possuem algumas vantagens sobre linhagens primárias de fibroblastos de pele, como: (a) obtenção mais rápida do material; (b) menor variação citogenética; (c) rápida proliferação celular sem senescência; (d) crescimento em suspensão; (e) maciça proliferação do material celular; (f) congelamento e posterior restabelecimento da cultura com maior sucesso em comparação com fibroblastos e (g) realização do ensaio com apenas 2-3 ml, ou menos, de sangue periférico (Minami *et al.*, 1977; Minami *et al.*, 1978; Tohda *et al.*, 1978; Negre *et al.*, 1986; Ventura *et al.*, 1988; Elliot, 1991; Louie e King, 1991; Pressman e Rotter, 1991).

Contudo, até o momento, nenhum estudo mostrou o resultado da comparação entre as medidas das atividades enzimáticas de β -galactosidase, β -glicosidase, α -iduronidase α -glicosidase, e α -galactosidase nos LCLs infectados com EBV, logo após a infecção e após longos períodos de congelamento. Esta comparação torna-se de fundamental importância para a introdução desta técnica na rotina de um laboratório; já que muitas vezes, é necessária a realização de exames para complementação de diagnósticos,

após longos períodos de congelamento em banco de células ou mesmo estudos em amostras de indivíduos já falecidos.

1.3.2 Tratamento

O tratamento dessas doenças será mais bem sucedido quanto mais precoce for o seu diagnóstico e pode ser conduzido de diversas maneiras:

- Limitando a entrada do precursor (como na fenilcetonúria, evitando a ingestão de fenilalanina);
- Suplementando o metabólito ausente (como no hipotireoidismo, administrando a tiroxina);
- Inibindo a formação da substância acumulada (como na gota, administrando alopurinol para inibir a xantina oxidase);
- Inibindo o acúmulo de determinada substância (como na Doença de Wilson, impedindo a formação de cobre com o uso de drogas);
- Controlando fatores desencadeantes (evitando o uso de alguns fármacos);
- Aumentando a atividade enzimática (como na homocistinúria, aumentando as doses do cofator, a piroxina);
- Suplementando a proteína não enzimática deficiente (como na hemofilia, administrando o fator VIII);
- Suplementando a enzima deficiente (como em algumas DLDs).

No grupo das DLDs o tratamento, por reposição da enzima deficiente por uma enzima sintetizada por recombinação de DNA, é restrito a algumas doenças como Pompe (deficiência de α -glicosidase), Gaucher (deficiência de

β -glicosidase), MPS I (deficiência de α -iduronidase) e Fabry (deficiência α -galactosidase) (Angelini e Semplicini, 2010; Koskenvuo e Kantola, 2010; Pastores, 2010).

Quanto mais cedo é instituído este tratamento, mais efetivo ele pode ser, com isto, métodos de diagnóstico eficientes e rápidos são essenciais. Neste quesito, a análise enzimática em linfócitos B transformados por EBV, é muito importante, pois além da cultura de células ser rápida, uma vez diagnosticado, este material poderia ser armazenado para estudos futuros, em casos não conclusivos.

1.4 Hidrolases lisossômicas

As hidrolases lisossômicas ou enzimas lisossômicas são aquelas que apresentam a capacidade de degradar, dentro dos lisossomas, macromoléculas como esfingolipídios, glicoproteínas, glicosaminoglicanos, etc. Quando existe algum defeito nessas enzimas, em seu transporte ou em proteínas que modulam sua atividade, produz-se um acúmulo lisossomal de macromoléculas, conhecido como Doença Lissossômica de Depósito (DLD) (Watanabe e Minami, 1981).

Nesse grupo de doenças, a inativação de uma enzima envolvida na degradação de macromoléculas leva ao acúmulo progressivo de seu substrato, o qual pode ser tóxico e desorganizar generalizadamente os componentes celulares (Chon, 1983; Mueller, 2001).

Em 1978, MINAMI e colaboradores determinaram a atividade de enzimas lisossômicas em linhagens celulares linfoblastóides de homocigotos e heterocigotos para seis DLDs: Síndrome de Hurler e Scheie, Gangliosidose GM1 tipo 1 e 2, Tay-Sachs e I Cell Disease. Os dados demonstraram que as enzimas deficientes nas respectivas doenças eram detectáveis em linhagens celulares de indivíduos normais e quase indetectáveis (muito baixas) em células linfoblastóides de pacientes.

Para o diagnóstico de DLD utilizam-se estudos bioquímicos e moleculares. Esses estudos geralmente são feitos em amostras de plasma, leucócitos ou fibroblastos. Os dois primeiros tipos de amostra apresentam como vantagem à facilidade de coleta, no entanto, não permitem uma boa reprodutibilidade após longos períodos de tempo devido a senescência. Os fibroblastos podem ser armazenados por mais tempo, mas apresentam como inconveniente a coleta dolorosa. Existem, no entanto, trabalhos que investigam a utilização de linfócitos B transformados com EBV como amostras alternativas para a medida de atividade de enzimas lisossômicas (Minami *et al.*, 1978; Maret *et al.*, 1987).

Para a medida da atividade de hidrolases lisossômicas, a maioria dos estudos relatam que as células transformadas com EBV poderiam ser congeladas até, no máximo, 30 dias a -70°C ou -80°C ((Minami *et al.*, 1978; Dreyfus *et al.*, 1980; Watanabe e Minami, 1981; Maret *et al.*, 1985; Levade *et al.*, 1986; Negre *et al.*, 1986; Maret *et al.*, 1987), ou seja, sem o armazenamento do material em nitrogênio líquido. Não há comparações entre a atividade enzimática inicial (no momento do congelamento) e após o congelamento.

1.5 Avaliação da Transformação Celular

Em 1931, na Alemanha, Knoll e Ruska desenvolveram o primeiro microscópio eletrônico, com base no experimento de Bush (1926) que provou que era possível focalizar um feixe de elétrons utilizando uma lente eletromagnética circular. Em 1938 a Siemens Corporation construiu o primeiro modelo comercial do Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET), o qual exerceu, em meados do século XX, uma imensa influência sobre a biologia e a ciência, ao permitir estudos das ultra-estruturas dos materiais (<http://www.zeiss.de>)

O MET possui sistemas de iluminação e vácuo que produz feixes de elétrons de alta energia (energia cinética), que ao incidir sobre uma amostra de tecido ultrafina (nanômetro), fornece imagens planas, imensamente ampliadas, possuindo a capacidade de aumento útil de até um milhão de vezes e assim permitindo a visualização de moléculas orgânicas, como o DNA, RNA, algumas proteínas, etc. O sistema de vácuo remove o ar e outras moléculas de gás da coluna do microscópio, evitando assim que ocorra erosão do filamento e propiciando a formação de uma imagem com excelente qualidade e contraste (Muller *et al.*, 2008).

A imagem é projetada em um anteparo fluorescente, que poderá ser redirecionada para uma chapa fotográfica para registro, ou ainda a imagem pode ser captada por um sistema computadorizado de captação de imagens e armazenada em CD-Rom para futura análise (Muller *et al.*, 2008).

Para verificar as diferenças entre células de pacientes com EIM e indivíduos normais infectadas com EBV, diversos autores utilizaram a avaliação da transformação celular através da MET (Harcout e Ashton, 1973; Bes *et. al.*, 1984; Maret *et. al.*, 1985; Levade *et. al.*, 1986; Maret *et. al.*, 1987). Estes autores não só encontraram diferenças morfológicas como estruturais, pois as células apresentaram uma alteração nuclear significativa e a inclusão de corpos mielinóides e vacúolos citoplasmáticos.

Já o termo imunohistoquímica (IHQ) surgiu das palavras: imunologia, histologia e química. A imunologia estuda o sistema imunológico, a histologia estuda tecidos e órgãos, após a sua coloração, utilizando-se o microscópio. Para facilitar a observação, diversos tipos de colorações podem ser usados para identificar diferentes partes de um tecido. O processo de identificar antígenos nos tecidos com anticorpos, através de secção corada é definido como imunohistoquímica (Dabbs, 2006).

As técnicas de IHQ detectam moléculas (antígenos) teciduais, sendo de grande valor nos diagnósticos anátomo-patológicos e na investigação científica. O mecanismo básico é o reconhecimento do antígeno por um anticorpo (Ac primário) associado a diversos tipos de processos de visualização (Dabbs, 2006).

A técnica de IHQ mais usada é a indireta, associada ao complexo avidina-biotina-enzima. O complexo é formado pela ligação de uma molécula de (strept) avidina com várias de biotina associadas a uma enzima (peroxidase ou fosfatase alcalina), que tem como função a conversão de um cromógeno incolor em um produto final que pode conferir diversas cores aos antígenos teciduais marcados. As cores mais comuns são a castanha (peroxidase+

diaminobenzidina-DAB) e a vermelha (fosfatase alcalina + fast red) (Dabbs, 2006).

O uso da IHQ para demonstrar apoptose de linfócitos pré e pós imortalização das células com EBV, já foi observado (Satoh *et al.*, 2003). Observa-se, por esta técnica, uma alteração tanto na forma como no tamanho das células. Também através do uso da IHQ, foi possível verificar-se a presença da coloração acastanhada em linfócitos infectados por EBV como consequência da síntese da proteína LMP-1 pelo linfócito B após transformação (Caputo *et al.*, 1991; Xu *et al.*, 2008).

Um passo relativamente recente e importante na trajetória de evolução dos microscópios foi a introdução da microscopia digital de alta resolução, que inclui o microscópio confocal (MC) por varredura laser que, associada ao emprego de compostos químicos denominados fluoróforos, levou a grandes avanços na pesquisa de organismos vivos. Essa combinação de princípios da óptica e da físico-química tornou finalmente possível “olhar de perto” variados tipos de células vivas e medir fenômenos biológicos em tempo e espaço reais. Com a nova técnica ampliou-se rapidamente, em áreas diferentes da biologia, como biofísica, bioquímica, biologia celular, microbiologia, fisiologia, farmacologia e outras, o conhecimento de elementos e organismos fundamentais (Pawley, 1995).

A presença de vacúolos citoplasmáticos em células infectadas pelo vírus EBV, já foi observada (Taylor *et al.*, 2004). Estes autores, utilizando microscopia confocal, verificaram que células dendríticas infectadas pelo vírus EBV apresentavam a membrana plasmática extremamente marcada como resposta à proteína LMP-2 e o citoplasma altamente vacuolizado em resposta

às proteínas EEA1 e LAMP1. A marcação simultânea destas proteínas expressas pelo vírus foi observada ao microscópio confocal como “buracos” na membrana plasmática da célula infectada.

Neste estudo cultivamos linfócitos B na presença de EBV durante 12 dias. Após este período as células foram colhidas e armazenadas em nitrogênio líquido por seis meses, um e dois anos. Com isso, nós nos propusemos a testar se a atividade de cinco hidrolases lisossômicas (α -glicosidase, β -glicosidase, α -iduronidase β -galactosidase e α -galactosidase) seria alterada após o congelamento. Caso as atividades se mantivessem sem alteração, o uso do EBV para transformar linfócitos B e mantê-los vivos por longos períodos de tempo poderia auxiliar no diagnóstico das cinco doenças relacionadas às enzimas acima.

Junto a isso, também testamos a eficiência da transformação dos linfócitos B pelo EBV através de 3 instrumentos: IHQ (Mello *et. al.*, 2010), MET e MC.

Em outro trabalho de nosso grupo, já havíamos confirmado a transformação de LCLs pelo EBV, aos 12 dias de cultivo, através de citometria de fluxo, outra técnica de observação da transformação celular (Mello *et. al.*, 2006).

II. OBJETIVOS

Considerando que os linfócitos B infectados com EBV: são eficientes para o estudo de Hidrolases Lisossômicas (i), são células potencialmente promissoras para a investigação de Erros Inatos do Metabolismo após um longo prazo de criopreservação (ii) e que num curto período, doze dias, já obtemos a esperada transformação celular necessária para a estabilização do maquinário celular sem senescência (iii), o presente estudo teve como objetivos:

- Investigar as alterações celulares e morfológicas nos linfócitos B infectados com EBV, a fim de confirmar a transformação celular nos 12 dias de cultura, para certificação do protocolo.
- Determinar a atividade das enzimas β -galactosidase, β -glicosidase, α -galactosidase, α -glicosidase e α -iduronidase em Linhagens Celulares Linfoblastóides (LCL) transformados com EBV de indivíduos normais; logo após a transformação (12 dias de cultivo) e após congelamento em nitrogênio líquido por 180, 365 e 730 dias.
- Determinar a atividade das enzimas β -glicosidase, α -galactosidase e α -iduronidase em Linhagens Celulares Linfoblastóides (LCL) transformados com EBV de pacientes com doenças de Gaucher e Fabry e Mucopolissacaridose tipo I; logo após a transformação (12 dias de cultivo) e após congelamento em nitrogênio líquido por 180 dias.

PARTE II

III. MÉTODOS E RESULTADOS

III.1 *CAPÍTULO 1*

Feasibility of using cryopreserved lymphoblastoid cells to diagnose some lysosomal storage diseases

Alexandre Silva de Mello, Francieli Provin, Kristiane Michelin-Tireli, Marli
Viapiana Camelier e Janice Carneiro Coelho

Cell Proliferation, **43**:164-169, 2010

doi: 10.1111/j.1365-2184.2010.00660.x

**Ultrastructural Analysis as a Tool in Avaliation of Lymphoblastoid Cell
Lines Transformation to Lysosomal Acid Hydrolases Diagnosis**

Alexandre Silva de Mello, Franciane Brackmann Mendes, Kristiane Michelin-
Tireli, Marli Viapiana Camelier e Janice Carneiro Coelho

Biology of the Cell

Artigo Submetido

PARTE III

IV. DISCUSSÃO

Neste trabalho analisamos a transformação de linfócitos infectados com EBV através de ferramentas como microscopia e imunohistoquímica. Após a transformação, 12 dias de cultura em meio contendo EBV, os linfócitos foram congelados e criopreservados em nitrogênio líquido. As culturas re-estabelecidas depois de 180, 365 e 730 dias. Neste momento as células foram colhidas e as atividades das enzimas β -galactosidase, α -iduronidase, α -galactosidase, α -glicosidase e β -glicosidase foram medidas.

A transformação celular foi avaliada através de imunohistoquímica (IHQ), microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia confocal (MC). Neste estudo foram utilizados LCLs obtidos da transformação com EBV de linfócitos de 25 indivíduos normais e 13 pacientes com DLD (Doença de Gaucher, Fabry e MPS I), provenientes do banco de sangue do HCPA.

A eficiência na transformação dos linfócitos B foi checada a cada 4 dias pela observação da formação e aumentos dos clusters e quantidade de células. O aumento dos clusters e o sucesso na infecção foram observados através da técnica de IHQ. Esse sucesso na transformação esta de acordo com trabalho prévio de nosso grupo (Mello *et al.*, 2006).

A técnica de IHQ é utilizada para localizar proteínas numa população de células e tem como fundamento a utilização de anticorpos específicos (geralmente IgGs, mas também IgMs) contra a proteína que se pretende identificar e localizar. A proteína em questão funciona assim como antígeno, que é reconhecido por um anticorpo. Neste trabalho utilizamos como anticorpo o complexo avidina-estreptidina que ao entrar em contato com o antígeno

produzido pelo EBV (LMP-1) junto com um cromógeno (DAB) produz uma cor castanha que é observado em microscópio invertido (Ramalho *et al.*, 2003) .

Como esperado, nos linfócitos B não infectados não foi observada a coloração castanha, pois os mesmos não estavam produzindo a proteína LMP-1, contrariamente aos linfócitos B infectados. Estes achados estão de acordo com os trabalho de Caputo e colaboradores (1991) e Xu e colaboradores (2008). Nestes, também foi observada, por IHQ, uma coloração acastanhada, bem como um aumento no tamanho das células infectadas, indicando o sucesso na transformação celular.

Utilizamos também para avaliar a transformação celular o MET, onde nosso estudo observou que os linfócitos antes da transformação celular apresentavam um núcleo bem definido, mitocôndrias íntegras, retículo endoplasmático, ribossomos e complexo de Golgi, mostrando estruturas muito bem organizadas no citoplasma. Porém, após a infecção observou-se um número muito maior de organelas celulares, além de alterações morfológicas significativas, como: mitocôndrias maiores com cristas desorganizadas, estruturas eletro-lúcidas (com material em seu interior) e inúmeros lisossomos, células binucleadas e corpos de mielina. Não há, na literatura, trabalhos comparando linfócitos infectados por EBV com aqueles não infectados e a observação dos mesmos por MET, de modo a compararmos o tamanho e o número das organelas celulares. É encontrado somente trabalhos com linfócitos de pacientes com DLDs infectados e nestes verifica-se a presença de organelas celulares de tamanho aumentado (Bes *et al.*,1984; Maret *et al.*, 1985) .

Outro instrumento utilizado em nosso trabalho para avaliação da transformação celular foi o Microscópio Confocal de fluorescência por varredura laser, chamado popularmente de Microscópio Confocal (MC), que utiliza a fluorescência para a aquisição das imagens. A fluorescência é um tipo de luminescência (emissão de luz) em que um corpo absorve luz e após um curto intervalo de tempo re-emite essa luz. Esse é o princípio da microscopia de fluorescência, na qual compostos químicos chamados fluoróforos são usados para produzir a fluorescência do material em estudo. Os fluoróforos são utilizados, por exemplo, quando se quer localizar uma área específica da amostra, como uma proteína. (Pawley, 1995).

A proteína a ser localizada em nosso estudo foi a Lysosomal-Associated Membrane Protein 2 (LAMP-2). A LAMP-2 é uma proteína encontrada em linfócitos B e para entender sua função em nosso estudo, necessitamos explicar a formação do lisossomo e a relação com suas hidrolases.

O lisossomo é uma organela da célula animal. A formação do lisossomo representa a intersecção entre a via secretória, através da qual as proteínas lisossomais são processadas, e a via endocítica, através da qual as moléculas extracelulares são adquiridas na membrana celular. Durante a endocitose, materiais extracelulares são internalizados através de vesículas endocíticas revestidos por clatrina, que se desprendem da membrana plasmática e depois se fundem com o endossomo precoce (early endosome). Os componentes membranosos são então reciclados e o endossomo precoce gradualmente amadurece para um endossomo maduro (late endosome) que é o precursor do lisossomo. Uma das mudanças mais significativas desse amadurecimento é a diminuição do pH para aproximadamente 5,5, que desempenha um papel vital

na entrega das hidrolases ácidas lisossomais pela rede Trans-Golgi ao endossomo maduro (Hasilik *et al.*, 2009).

As hidrolases ácidas são direcionadas para o lisossomo através de resíduos de manose-6-fosfato, que são reconhecidos pelos receptores de manose-6-fosfato da rede Trans-Golgi e empacotados em vesículas revestidas por clatrina. Após a remoção desse revestimento de clatrina, a vesícula transportadora se funde com o endossomo maduro e o pH ácido interno faz com que as hidrolases ácidas se desprendam do receptor de manose-6-fosfato. As hidrolases então são liberadas no lúmen do endossomo, enquanto os receptores permanecem na membrana e são eventualmente reciclados no Golgi. Os endossomos maduros então se transformam em lisossomos ao adquirirem um conjunto de hidrolases ácidas que começam a digerir as macromoléculas originalmente incorporadas ao endossomo pela endocitose (Brooks, 2009).

A LAMP-2 é uma proteína encontrada no endossomo maduro. Uma vez infectado com o EBV o linfócito forma os vacúolos citoplasmáticos, que nada mais são que depósitos de hidrolases ácidas lisossomais, que ficarão visíveis após a adição de um anticorpo monoclonal primário (H4B4) que ligar-se-á com a LAMP-2. Após a adição do anticorpo secundário (Cy3), a célula tornar-se-á fluorescente (Gonzalez-Polo *et al.*, 2005).

Após a adição de Cy3 os linfócitos B sem EBV não apresentaram vacúolos citoplasmáticos e, como era esperado, as células transformadas pelo EBV apresentaram um grande número destas estruturas. Flanagan e colaboradores (2003) também haviam observado resultados semelhantes, o que vem de encontro ao nosso trabalho.

Uma vez que a transformação das células pelo EBV foi confirmada, foi possível medir as atividades das hidrolases lisossômicas e verificar se estas enzimas permanecem inalteradas após 6 meses, 1 ano e 2 anos de criopreservação. A comparação com amostras de linfócitos recém coletadas de indivíduos normais ou pacientes afetados, não submetidos a tratamento com EBV, mostrou que as atividades das cinco enzimas estudadas estão de acordo com aquelas descritas na literatura (Salvayre *et al.*, 1981; Salvayre *et al.*, 1983; Negre *et al.*, 1984; Maret *et al.*, 1985; Maret *et al.*, 1987).

Após o período de 12 dias de cultivo e 6 meses de congelamento, os linfócitos das células normais submetidos à transformação por EBV, apresentaram uma alteração significativa nas atividades da β -glicosidase e α -iduronidase, quando comparados com linfócitos frescos, isto é, não cultivados, enquanto as atividades das outras enzimas mantiveram-se inalteradas. Já a atividade de α -galactosidase apresentou uma mudança significativa somente após 6 meses de congelamento, quando comparada com aquela dos linfócitos não cultivados.

A atividade enzimática pode ter sido alterada pela impureza da amostra (por exemplo, a presença de células não monocíticas) e / ou composição (mistura de monócitos, células B e células T) de linfócitos em diferentes fases de preparação (recém preparado, isolado, transformado, cultivadas e congelados). Diferenças na atividade enzimática entre os linfócitos, leucócitos e LCLS também foram observados em outras investigações (Minami *et al.*, 1977; Dreyfus *et al.*, 1980).

Isto demonstra que, a transformação dos linfócitos pelo EBV pode influenciar a atividade de algumas enzimas, quando comparado com linfócitos

in natura, o que torna necessário o estabelecimento de valores de referência da atividade enzimática das células cultivadas e imortalizadas pelo vírus.

É importante ressaltar que todas as atividades enzimáticas medidas após a transformação das células não foram diferentes, ou seja, após 6 meses de congelamento dos LCLs em nitrogênio líquido as atividades enzimáticas permaneceram as mesmas que imediatamente após a infecção.

Embora o EBV, quando introduzido na cultura tenha alterado a atividade de algumas enzimas em relação aos linfócitos não cultivados, esta mudança não foi suficiente para prejudicar o diagnóstico da doença de Gaucher, Mucopolissacaridose tipo I e da doença de Fabry. Mesmo um aumento na atividade como obtidos no presente estudo, após 180 dias de criopreservação, não seria capaz de mascarar o diagnóstico. Caso as atividades destas três enzimas nos pacientes, forem de 5% a 10% daquela dos indivíduos normais, como esperado, um diagnóstico seguro e confiável é possível.

Após 1 e 2 anos de criopreservação não observamos alterações estatisticamente significativas nas atividades enzimáticas quando comparadas com aquelas após a transformação celular.

Por um problema no armazenamento das amostras após coletadas, não foi possível medirmos as atividades das enzimas β -galactosidase e α -iduronidase no material obtido após 2 anos de criopreservação.

Nossos resultados deixam claro que algumas enzimas analisadas têm suas atividades alteradas após a transformação das células pelo EBV, o que indica que devemos estabelecer valores de referência para as atividades enzimáticas após incubação das células com o vírus. Mas uma vez estabelecidos estes valores, estas células são passíveis de utilização para o

diagnóstico das doenças de Gaucher, Fabry e Pompe, para a Mucopolissacaridose tipo I e para a Gangliosidose GM1.

Outro aspecto importante deste estudo é que uma vez transformados, os linfócitos podem ser armazenados por até dois anos sem perda ou aumento da atividade de pelo menos 3 das 5 enzimas analisadas.

O protocolo aqui desenvolvido mostrou ser de grande importância para o diagnóstico de algumas DLDs, já que com ele, conseguiríamos confirmar as suspeitas dos médicos em um período reduzido de 12 dias diminuindo a angústia dos pais e outras pessoas envolvidas com esse quadro preocupante de suspeita de diagnóstico positivo.

V. CONCLUSÕES

Objetivo 1

Investigar as alterações celulares e morfológicas nos linfócitos B infectados com EBV, a fim de confirmar a transformação celular nos 12 dias de cultura.

Conclusões

1. Após os 12 dias de cultivo dos linfócitos B em estufa de CO₂ foi possível verificar, através de IHQ, a incidência de muitas células com coloração castanha em antígenos marcados com peroxidase+ diaminobenzidina-DAB, mostrando o sucesso na transformação destas células.
2. Através de MET foi possível verificar que após a adição do EBV ocorreram alterações morfológicas significativas como: binucleação, invaginação nuclear, desorganização das estruturas do citoplasma e formação dos vacúolos citoplasmáticos.
3. Através da MC, observou-se a formação de vacúolos na membrana da célula após os 12 dias de cultivo, ao contrário dos controles (células não infectadas) que se mantiveram íntegros depois do mesmo período.

Objetivo 2

Determinar a atividade das enzimas β -galactosidase, β -glicosidase, α -galactosidase, α -glicosidase e α -iduronidase em Linhagens Celulares Linfoblastóides (LCL) transformados com EBV de indivíduos normais; logo após a transformação (12 dias de cultivo) e após congelamento em nitrogênio líquido por 180, 365 e 730 dias.

Conclusões

1. Após a transformação celular, a atividade das enzimas β -glicosidase e α -iduronidase aumentou significativamente em relação aquela dos linfócitos não cultivados, o que indica que devemos ter valores de referência próprios para as atividades enzimáticas de linfócitos transformados pelo EBV.
2. Após 6 meses e 1 ano de criopreservação dos LCLs em nitrogênio líquido não houve diferença significativa na atividade das enzimas β -glicosidase, α -iduronidase, α -galactosidase, α -glicosidase e β -galactosidase quando comparadas com aquelas imediatamente após a transformação celular.
3. Após 2 anos de criopreservação dos linfócitos transformados, não houve diferença significativa na atividade das 3 enzimas analisadas: β -glicosidase, α -galactosidase, α -glicosidase quando comparadas com aquelas imediatamente após a transformação celular.

Objetivo 3

Determinar a atividade das enzimas β -glicosidase, α -galactosidase e α -iduronidase em Linhagens Celulares Linfoblastóides (LCL) transformados com EBV de pacientes com doenças de Gaucher e Fabry e Mucopolissacaridose tipo I; logo após a transformação (12 dias de cultivo) e após congelamento em nitrogênio líquido por congeladas em nitrogênio líquido por 180 dias.

Conclusão

- As atividades das enzimas β -glicosidase, α -iduronidase e α -galactosidase em linfócitos transformados com EBV de pacientes com doença de Gaucher, MPS I e doença de Fabry, respectivamente, foram significativamente menores que aquelas de LCLs de indivíduos normais. Isto garante um diagnóstico correto destas patologias.

Este trabalho mostrou que o protocolo empregado foi eficiente na transformação de linfócitos B pelo vírus Epstein-Barr e que uma vez congeladas até pelo menos 1 ano em nitrogênio líquido, todas as enzimas analisadas mantêm suas atividades semelhantes aquelas após 12 dias de cultivo celular.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Angelini, C., Semplicini, C. Metabolic myopathies: the challenge of new treatments. Current Opinion in Pharmacology, v.10, p.1-8. 2010.
- Ascherio, A. e Munger, K.L. Epstein-Barr Virus Infection and Multiple Sclerosis: A Review. J Neuroimmune Pharmacol, Apr 6. 2010.
- Babcock, G.J., Decker, L.L. *et al.* EBV persistence in memory B cells in vivo. Immunity, v.9, n.3, Sep, p.395-404. 1998.
- Benson, P. F., Fenson, A.H. Genetic Biochemical Disorders. Oxford: Oxford University Press. 1985.
- Bes, J.C., Salvayre, R. *et al.* Ultrastructural investigations on two lymphoid cell lines from Niemann-Pick disease type B. Biol Cell, v.50, n.3, p.299-302. 1984.
- Bickel, H. Early diagnosis and treatment of inborn errors of metabolism. Enzyme, v.38, n.1-4, p.14-26. 1987.
- Bird, A.G., Britton, S. *et al.* Characteristics of Epstein-Barr virus activation of human B lymphocytes. J Exp Med, v.154, n.3, Sep 1, p.832-9. 1981.
- Brooks, D.A. The endosomal network. Int J Clin Pharmacol Ther, v.47 Suppl 1, p.S9-17. 2009.
- Burton, N.R., Smith, D.A., Stone, T.W. A quantitative pharmacological analysis of some excitatory amino acid receptors in the mouse neocortex in vitro. Br J Pharmacol, v.93, n.3, Mar, p.693-701. 1988.
- Caputo, J.L., Thompson, A. *et al.* An effective method for establishing human b lymphoblastic cell lines using Epstein-Barr Virus. J Tiss Cult Meth, v.13, p.39-44, 1991.
- Chen, C., Johnston, T.D. *et al.* Cyclosporine promotes epstein-barr virus-infected human B-cell transformation assayed by three correlated assay methods. Transplant Proc, v.41, n.1, Jan-Feb, p.366-70. 2009.
- Chon, R.M., Roth, K.S. Metabolic diseases. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 1983.
- Coelho, J.C., Giuliani, R. Fibroblasts from skin biopsies as a tool for the investigation of genetic diseases: technical recommendations. Genetics and Molecular Biology, v.23, n.2, p.269-271. 2000.

- Coelho, J.C., Wajner, M. *et al.* Selective screening of 10,000 high-risk Brazilian patients for the detection of inborn errors of metabolism. Eur J Pediatr, v.156, n.8, Aug, p.650-4. 1997.
- Cohen, J.I. Epstein-Barr virus infection. N Engl J Med, v.343, n.7, Aug 17, p.481-92. 2000.
- Cohen, J.I., Kimura, H. *et al.* Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disease in non-immunocompromised hosts: a status report and summary of an international meeting, 8-9 September 2008. Ann Oncol, v.20, n.9, Sep, p.1472-82. 2009.
- Dabbs, D. Diagnostic Immunohistochemistry Philadelphia: Churchill Livingstone. 2006.
- Davies, M. L., Xu, S. *et al.* Cellular factors associated with latency and spontaneous Epstein-Barr virus reactivation in B-lymphoblastoid cell lines. Virology, v.400, n.1, Apr 25, p.53-67. 2010.
- Dreyfus, J.C., Poenaru, L., Lenoir, G. Lysosomal hydrolases in established lymphoid cell lines. Biomedicine, v.33, n.3, May, p.78-80. 1980.
- Elliot, J., Coulter-Mackie, M.B. A Method for transforming lymphocytes from very small blood volumes suitable for paediatric samples. Human Genetics, v.86, p.615-6. 1991.
- Epstein, M.A., Achong, B.G., Barr, Y.M. Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. Lancet, v.1, n.7335, Mar 28, p.702-3. 1964.
- Flanagan, J., Middeldorp, J., Sculley, T. Localization of the Epstein-Barr virus protein LMP 1 to exosomes. Journal of General Virology, v.84, p.1871-79. 2003.
- Fleisher, G.R. Epstein-Barr. In: R. B. Belshe (Ed.). Textbook of Human Virology St. Louis: PSG Publishing Company, Inc., 1991.
- Goldsby, R.A E. Antígenos CD: Kuby Imunologia. 2002.
- González-Polo, R.A., Boya, P. *et al.* The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death. Journal of Cell Science, v.118, n.14, p. 3091-102.
- Gorzer, I., Niesters, H.G. *et al.* Characterization of Epstein-Barr virus Type I variants based on linked polymorphism among EBNA3A, -3B, and -3C genes. Virus Res, v.118, n.1-2, Jun, p.105-14. 2006.
- Harcout, B., Ashton, N. Ultrastructure of the optic nerve in Krabbe's leucodystrophy. Brit. J. Ophthal., v. 57, p.885-91. 1973.

Hasilik, A., Wrocklage, C., Schroder, B. Intracellular trafficking of lysosomal proteins and lysosomes. Int J Clin Pharmacol Ther, v.47 Suppl 1, p.S18-33. 2009.

Karam, S.M., Pires, R.F., Matte, U. Esfingolipidoses. In: G. Carakushansky (Ed.). Doenças Genéticas em Pediatria. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.176-179. 2001.

Karam, S.M., Schwartz, I.V.D., Giugliani, R. Erros inatos do metabolismo. In: G. Carakushansky (Ed.). Doenças Genéticas em Pediatria. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. p.153-158. 2001.

Katano, H., Pesnicak, L., Cohen, J.L. Simvastatin induces apoptosis of Epstein-Barr virus (EBV)-transformed lymphoblastoid cell lines and delays development of EBV lymphomas. Proc Natl Acad Sci U S A, v.101, n.14, Apr 6, p.4960-5. 2004.

Koskenvuo, J.W., Kantola, I.M. Evaluating enzyme replacement therapy in fabry disease. Arch Intern Med, v.170, n.6, p.573-574. 2010.

Levade, T., Maret, A. *et al.* Biochemical and ultrastructural studies on an Epstein-Barr virus-transformed lymphoid cell line from a Niemann-Pick disease type C patient. Biochim Biophys Acta, v.877, n.3, Jul 18, p.415-22. 1986.

Louie, L.G., King, M.C. A novel approach to establishing permanent lymphoblastoid cell lines: Epstein-Barr virus transformation of cryopreserved lymphocytes. Am J Hum Genet, v.48, n.3, Mar, p.637-8. 1991.

Maret, A., Salvayre, R. *et al.* Biochemical and ultrastructural findings in Epstein-Barr virus-transformed lymphoid cell lines from type 1 Gaucher disease. Biol Cell, v.59, n.1, p.101-4. 1987.

Maret, A., Salvayre, R. *et al.* Epstein-Barr virus transformed lymphoid cell lines as a new model system in culture for the study of GM2-gangliosidoses: Tay-Sachs and Sandhoff diseases. Biol Cell, v.53, n.3, p.293-6. 1985.

Mello, A.S., Burin, M.G. *et al.* Epstein-Barr virus-induced transformation of B cells for the diagnosis of genetic metabolic disorders--enumerative conditions for cryopreservation. Cell Prolif, v.39, n.1, Feb, p.29-36. 2006.

Mello, A.S., Provin, F. *et al.* Feasibility of using cryopreserved lymphoblastoid cells to diagnose some lysosomal storage diseases. Cell Prolif, v.43, p. 164-169. 2010.

Minami, R., Suzuki, M. *et al.* Alpha-L-Iduronidase activity in established lymphoblastoid cells from patients with Hurler and Scheie syndromes transformed by Epstein-Barr virus. Tohoku J Exp Med, v.122, n.4, Aug, p.393-6. 1977.

Minami, R., Watanabe, Y. *et al.* Lysosomal acid hydrolases in established lymphoblastoid cell lines, transformed by Epstein-Barr virus, from patients with genetic lysosomal storage diseases. Hum Genet, v.44, n.1, Oct 19, p.79-87. 1978.

Mueller, R.F., Young, I.D. Biochemical genetics. In: Emery's Elements of Medical Genetics, 11^a ed., New York, Churchill Livingstone. 2001.

Muller, S.A., Aebi, U., Engel, A. What transmission electron microscopes can visualize now and in the future. J Struct Biol, v.163, n.3, Sep, p.235-45. 2008.

Negre, A., Salvayre, R. *et al.* Enzyme studies on Epstein-Barr virus-transformed lymphoid cell lines from Wolman's disease. Lipases, cholesterol esterase and 4-methylumbelliferyl acyl ester hydrolases. Biochim Biophys Acta, v.794, n.1, Jun 6, p.89-95. 1984.

Negre, A., Salvayre, R. *et al.* Lymphoid cell lines as a model system for the study of Wolman's disease: enzymatic, metabolic and ultrastructural investigations. J Inherit Metab Dis, v.9, n.2, p.193-201. 1986.

Neitzel, H. A routine method for the establishment of permanent growing lymphoblastoid cell lines. Hum Genet, v.73, n.4, Aug, p.320-6. 1986.

Nowacki, P., Byck, S. *et al.* The PAH mutation analysis consortium database: update 1996. Nucleic Acids Res, v.25, n.1, Jan 1, p.139-42. 1997.

Oh H.M., Oh J.M. *et al.* An efficient method for the rapid establishment of Epstein-Barr virus immortalization of human B lymphocytes. Cell Prolif 36, 191–197. 2003.

Pastores, G.M. Velaglucerase alfa, a human recombinant glucocerebrosidase enzyme replacement therapy for type 1 Gaucher disease. Curr Opin Investig Drugs, v.11, n.4, Apr, p.472-8. 2010.

Pawley, J.B. Handbook of Biological Confocal Microscopy. New York: Springer Science Business Media, Inc. 672 p. 1995.

Pressman, S., Rotter, J.I. Epstein-Barr virus transformation of cryopreserved lymphocytes: prolonged experience with technique. Am J Hum Genet, v.49, n.2, Aug, p.467. 1991.

Przybylski, M., Dzieciatkowski, T. *et al.* Microbiological Findings and Treatment of EBV-Associated Hemophagocytic Lymphohistiocytosis: A Case Report. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), Apr 13. 2010.

Ramalho, S., Moreno, C.R. *et al.* Confocal imaging of structural molecules in mammalian gametes. In: Gardner, D.K., Lane, M. (Ed.). A Laboratory Guide of the Mammalian Embryo Oxford University Press, p.165-183, 2003.

Salvayre, R., Maret, A. *et al.* [Lymphoblastoid cell lines transformed by the Epstein-Barr virus. Cellular model in culture for the study of lysosomal enzyme disorders]. Ann Biol Clin (Paris), v.41, n.5, p.299-309. 1983.

Salvayre, R., Negre, A. *et al.* Separation and properties of molecular forms of alpha-galactosidase and alpha-N-acetylgalactosaminidase from blood lymphocytes and lymphoid cell lines transformed by Epstein-Barr virus. Biochim Biophys Acta, v.659, n.2, Jun 15, p.445-56. 1981.

Satoh, M., Yasuda, T. *et al.* Innate Apoptosis of Human B Lymphoblasts Transformed by Epstein-Barr Virus: Modulation by Cellular Immortalization and Senescence. Cell Structure and Function, v.28, p.61-70. 2003.

Schuster, V.H. e Muschen, M. Epstein-Barr virus and the B cell: a secret romance. Trends Microbiol, v.11, n.6, Jun, p.243-5. 2003.

Scriver, C.R., Beaudet, A.L. *et al.* The metabolic and molecular basis of inherited disease New York: McGraw Hill Inc. 2001.

Severini, M.H., Silva, C.D. *et al.* High frequency of type 1 GM1 gangliosidosis in southern Brazil. Clin Genet, v.56, n.2, Aug, p.168-9. 1999.

Stambury, J.B., Wyngaarden, J.B. *et al.* Inborn errors of metabolism in the 1980's. In: Scriver, C.R., Baudet, A.L. *et al.* (Ed.). The metabolic basis of inherited diseases. New York: McGraw Hill, p.3-59, 1983.

Sugimoto, M., Furuichi, Y. *et al.* Incorrect use of "immortalization" for B-lymphoblastoid cell lines transformed by Epstein-Barr virus. J Virol, v.73, n.11, Nov, p.9690-1. 1999a.

Sugimoto, M., Ide, T. *et al.* Reconsideration of senescence, immortalization and telomere maintenance of Epstein-Barr virus-transformed human B-lymphoblastoid cell lines. Mech Ageing Dev, v.107, n.1, Feb 1, p.51-60. 1999b.

Takacs, M., Banati, F. *et al.* Epigenetic regulation of latent Epstein-Barr virus promoters. Biochim Biophys Acta, v.1799, n.3-4, March - April, p.228-235. 2010.

Takahashi, T., Kawabe, T. *et al.* In vitro establishment of tumorigenic human B-lymphoblastoid cell lines transformed by Epstein-Barr virus. DNA Cell Biol, v.22, n.11, Nov, p.727-35. 2003.

Taylor, G.S., Haigh, T.A. *et al.* Dual Stimulation of Epstein-Barr Virus (EBV)-Specific CD4⁺- and CD8⁺-T-Cell Responses by a Chimeric Antigen Construct: Potential Therapeutic Vaccine for EBV-Positive Nasopharyngeal Carcinoma. Journal of virology, v.78, n.2, Jan, p.768-78, 2004.

Tohda, H., Oikawa, A. *et al.* A greatly simplified method of establishing B-lymphoblastoid cell lines. Cancer Res, v.38, n.10, Oct, p.3560-2. 1978.

Ventura, M., Gibaud, A. *et al.* Use of a simple method for the Epstein-Barr virus transformation of lymphocytes from members of large families of Reunion Island. Hum Hered, v.38, n.1, p.36-43. 1988.

Watanabe, Y., Minami, R. Lymphoblastoid cell lines, transformed by Epstein-Barr virus, in the enzymatic study of hereditary lysosomal storage diseases. Tohoku J Exp Med, v.134, n.3, Jul, p.229-43. 1981.

Wensing, B., Farrell, P.J. Regulation of cell growth and death by Epstein-Barr virus. Microbes Infect, v.2, n.1, Jan, p.77-84. 2000.

Xu, D., Zhao, L. Interferon regulatory factor 4 is involved in Epstein-Barr virus-mediated transformation of human B lymphocytes. Journal of Virology, v.82, n.13, Jul, p.6251-6258. 2008.

<<http://www.zeiss.de>>, acessado em 09/09/2009.

VII. ANEXOS

VII.1 **RESULTADOS COMPLEMENTARES**

Medida da Atividade de Hidrolases Lisossômicas de Linfócitos B Transformados com EBV e Criopreservados por Longo Tempo

Alexandre Silva de Mello, Franciane Brackmann Mendes, Kristiane Michelin-Tireli, Marli Viapiana Camelier e Janice Carneiro Coelho

Journal of Biomedicine and Biotechnology

Artigo a Ser Submetido

Este capítulo contém os métodos e resultados de todas as medidas das atividades das hidrolases lisossômicas após 2 anos de criopreservação dos LCLs, bem como a avaliação da transformação celular através de microscopia confocal. Estes métodos e resultados farão parte de um artigo que será escrito e submetido ao Journal of Biomedicine and Biotechnology. Estes resultados foram discutidos na Parte III desta Tese, no item Discussão.

Medida da Atividade de Hidrolases Lisossômicas de Linfócitos B Transformados com EBV e Criopreservados por Longo Tempo

Mello AS¹, Mendes FB¹, Michelin-Tireli K², Camelier MV², Daitx, VV¹, Vieira MOV³, Coelho JC¹.

Post Graduate Program in Biological Sciences – Biochemistry, Department of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil¹,

Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil², Centro de Neurociências e Biologia Celular, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal³

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta de sangue

Foram extraídos de 25 indivíduos saudáveis, 20mL de sangue periférico em tubos com heparina para posterior obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs). Estas células foram obtidas através de separação por gradiente em centrifugação com Fycoll-Histopaque (Sigma, St. Louis, MO, USA). O protocolo foi aprovado pelo comitê de ética e pesquisa (Hospital de Clínicas de Porto Alegre, HCPA, Porto Alegre, Brasil), e o termo de consentimento informado foi obtido de todos os indivíduos.

Manutenção das linhagens B-95'8 e obtenção do meio condicionado contendo as partículas virais

As células B-95'8 foram adquiridas no Banco de Células do Rio de Janeiro da Universidade Federal do Rio de Janeiro e congeladas em nitrogênio líquido até o momento da necessidade de uso. Essas células foram então cultivadas até o volume necessário com meio RPMI-1640 adicionado de 20%

de soro bovino fetal, quando então foram submetidas à falta de CO₂, pelo fechamento da garrafa de cultura. Permaneceram assim por um período entre 5-7 dias. Após as células foram coletadas usando-se Cell Scraper (Corning, New York, NY, USA) e a suspensão celular filtrada (Millipore, Bedford, MA, USA).

Cultivo das células mononucleares

Após a separação das PBMCs, elas foram contadas em câmara de Neubauer e ajustadas a uma concentração de 9×10^6 células por garrafa de cultura. A essas células foram adicionadas 2 µg/mL de Ciclosporina A (CyA) (Sandimmun, Sandoz, East Hanover, NJ, USA) e 1 mL de meio condicionado por partículas virais, obtida da linhagem B-95'8. O meio foi trocado no 4º e 8º dia sempre por meio RPMI-1640 contendo 1 µg/mL de CyA. No 12º dia procedeu-se à coleta destas células após a centrifugação (400g, 10min) e lavagem com PBS. Uma parte das células coletadas foi usada para a medida da atividade enzimática e outra parte foi submetida a congelamento em nitrogênio líquido por até dois anos.

Congelamento e descongelamento de amostras

As células foram congeladas em soro bovino fetal suplementado com 10% de DMSO, através de um congelamento gradual em container de congelamento contendo álcool isopropílico (Nalgene Nunc Int., Rochester, NY, USA), ficando as amostras por 24 horas no freezer -80°C e depois criopreservadas em nitrogênio líquido até o momento das análises.

Microscopia Confocal

Estes experimentos foram realizados no Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra em Portugal.

Após a transformação com EBV, as células foram lavadas com PBS, fixadas em metanol, novamente lavadas com PBS e então bloqueadas com Gelatin Skin Fish (Sigma). Após 3 lavagens com PBS adicionou-se o anticorpo primário H4B4 anti-LAMP-2 (Sigma, St. Louis, MO, USA). As amostras ficaram agitando por 1 hora e após novas 3 lavagens com PBS, o anticorpo secundário CY3 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) foi incluído e a amostra agitada novamente por mais 1 hora. Quando finalmente, depois de mais 2 lavagens com PBS e uma vez com água destilada, as amostras foram então ressuspendidas com Mowiol (Calbiochem) e adicionadas a uma lâmina que, coberta pela lamínula, foi armazenada em câmara escura por 24 horas. Finalmente esta foi congelada a -20°C , a fim de evitar a perda de fluorescência até a visualização no MC.

Medida das atividades das hidrolases lisossômicas

A medida das atividades das hidrolases lisossômicas humanas foi realizada nos LCLs no 12^o dia de cultivo e após 730 dias de criopreservação das células em nitrogênio líquido. A atividade da enzima β -glicosidase foi medida de acordo com o método de Peters et al. (1976) que utilize o 4-methylumbelliferyl- β -D-glucoside (Sigma) como substrato artificial, junto com taurocholate de sódio (Sigma), sob condições padrões (pH 5.5 and 37°C). A

atividade da α -galactosidase foi avaliada de acordo com o método classic de Desnick et al (1973) que utiliza 4-methylumbelliferyl- α -D-galactoside (Sigma) como substrato sintético junto com citrato fosfato (Sigma), sob condições padrões (pH 4.8 and 37°C). A enzima α -glicosidase teve sua atividade medida de acordo com o método de Li et al. (2004) adaptado, o qual utiliza 4-methylumbelliferyl- α -D-glucoside (Sigma) como substrato sintético, junto com acetate (Sigma) em condições padrões (pH 4.0 and 37°C). A fluorescência produzida foi medida em espectrofluorímetro Hitachi (450 and 365 nm). As atividades foram expressas como nmol/h/mg de proteína (Lowry et al., 1951).

Análise Estatística

Os dados foram expressos com média \pm SD. As atividades das cinco enzimas após 12 dias de cultivo e imediatamente após 760 dias de congelamento foram comparadas por Teste *t* de Student pareado ($P \leq 0,05$) utilizando o programa GraphPad Prism 5.

RESULTADOS

Avaliação da Transformação Celular

Tivemos uma efetividade de 100% na transformação celular, pois obtivemos sucesso na transformação do material de todos os 25 indivíduos (dados não mostrados).

Através da Microscopia Confocal verificou-se a formação de uma granulosidade no linfócito B após a transformação com vírus o Epstein-Barr. Após uma análise mais criteriosa percebeu-se que esta granulosidade eram vacúolos no citoplasma do linfócito (Figura 1A e B). Com a marcação com LAMP-2, tanto as células infectadas como as não infectadas (Figura 1C e D)

apresentaram ótima fluorescência, embora somente as células infectadas tenham apresentado estes vacúolos ao longo de toda a membrana, o que confirma o sucesso na infecção e posterior transformação das células.

Medida da atividade das hidrolases lisossômicas

Conforme podemos visualizar na Tabela 1, não foram observadas alterações estatisticamente significativas nos dois tempos de análises estudados. Após 2 anos de criopreservação das amostras, a atividade da enzima α -galactosidase ($47,4 \pm 21,3$) foi semelhante aquela após 12 dias de cultivo ($47,4 \pm 16,3$). O mesmo ocorreu com as demais enzimas: β -glicosidase ($27,5 \pm 16,4$ X $30 \pm 11,8$) e α -glicosidase ($4,4 \pm 1,8$ X $4,3 \pm 1,8$).

Referências

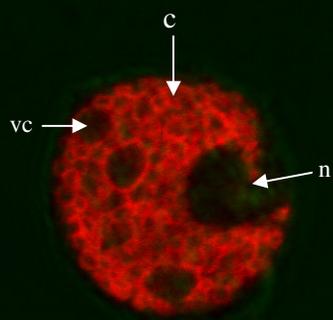
1. Peters, S.P., P. Coyle, and R.H. Glew, *Differentiation of beta-glucocerebrosidase from beta-glucosidase in human tissues using sodium taurocholate*. Arch Biochem Biophys, 1976. **175**(2): p. 569-82.
2. Desnick, R.J., et al., *Fabry's disease: enzymatic diagnosis of hemizygotes and heterozygotes. Alpha-galactosidase activities in plasma, serum, urine, and leukocytes*. J Lab Clin Med, 1973. **81**(2): p. 157-71.
3. Li, Y., et al., *Direct multiplex assay of lysosomal enzymes in dried blood spots for newborn screening*. Clin Chem, 2004. **50**(10): p. 1785-96.
4. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.

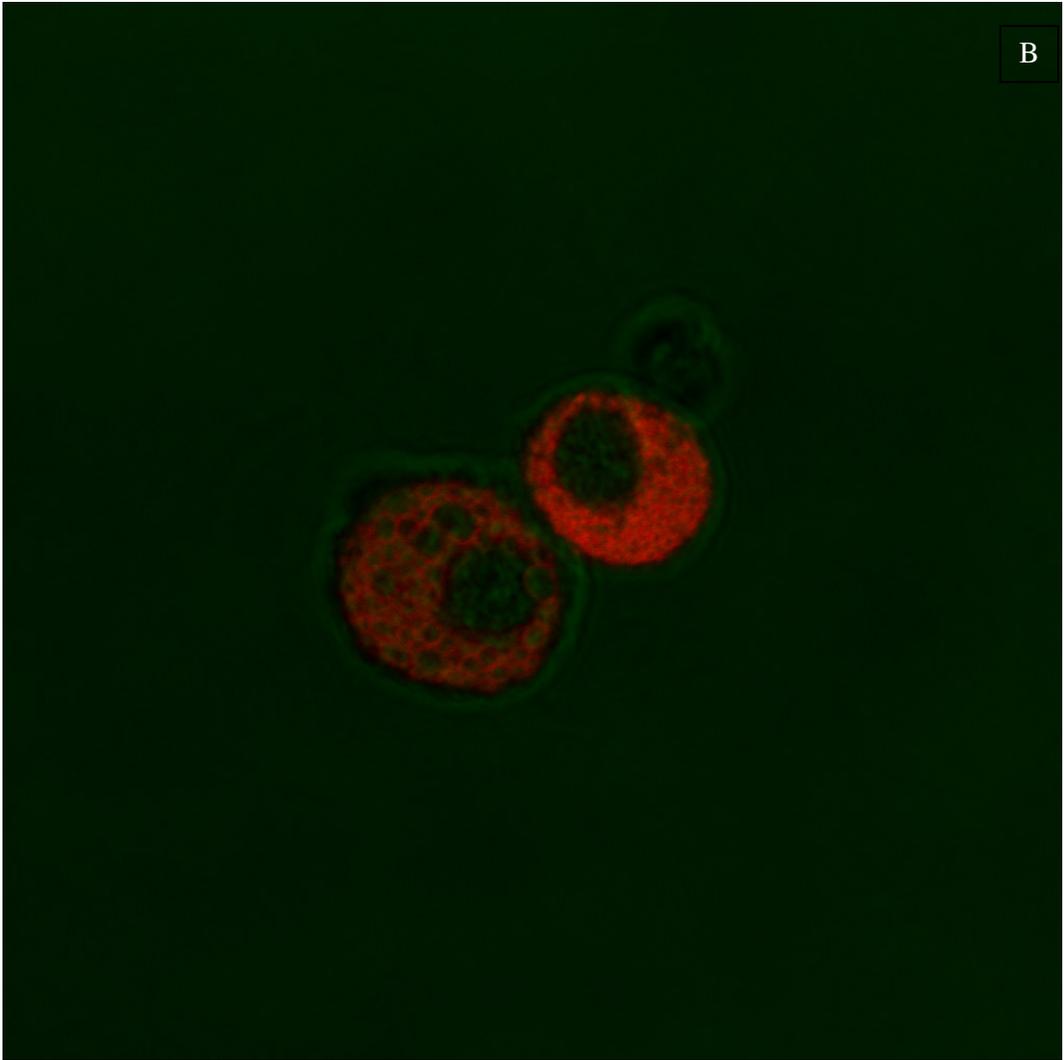
Legendas da Figura

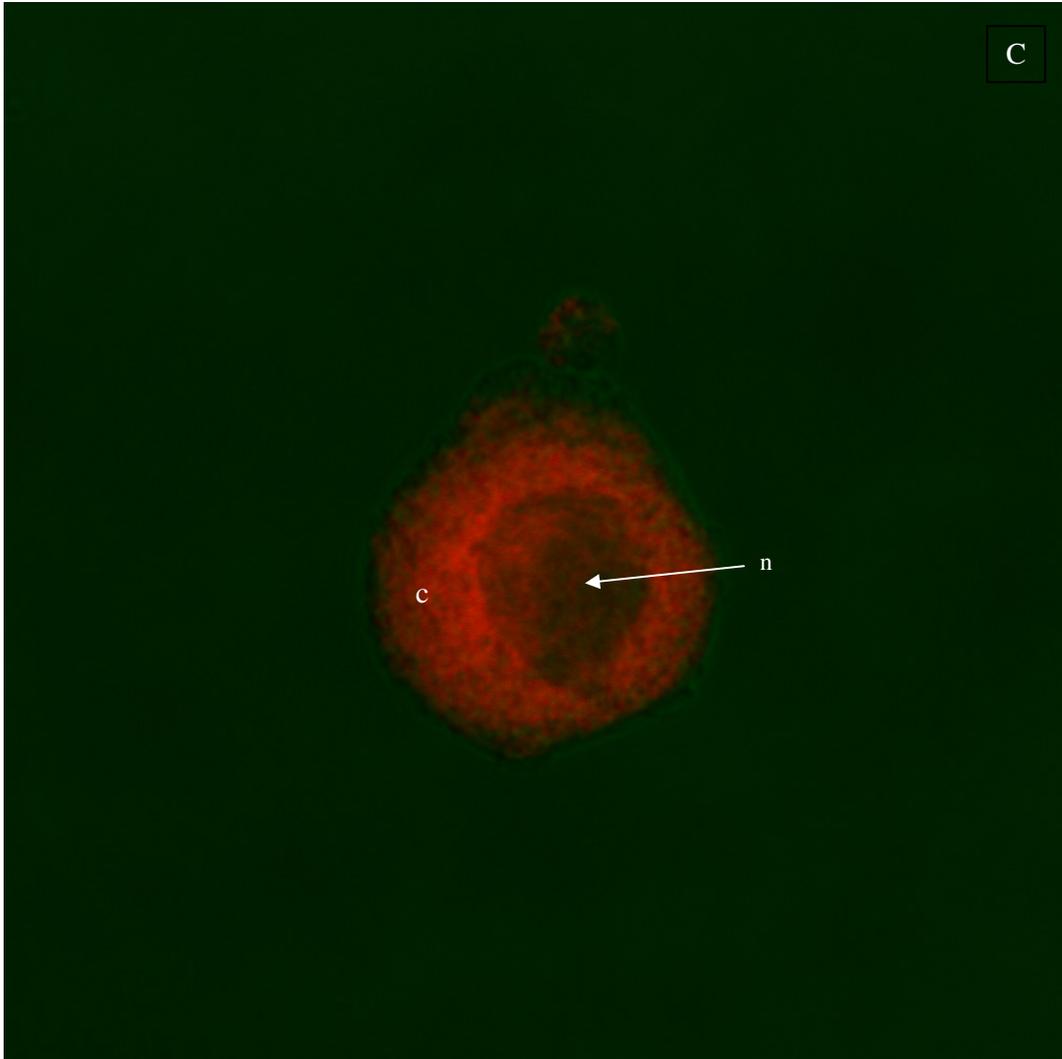
Figura 1: Visualização de linfócitos B infectados (A e B) por EBV e não infectados (C e D) através de microscopia confocal. Foi utilizado o microscópio ZEISS LSM 510, com objetiva e resolução: Plan-Apochromat 63x1.40 Oil DIC M27

Legenda: c = citoplasma, n = núcleo e vc = vacúolos citoplasmáticos.

A







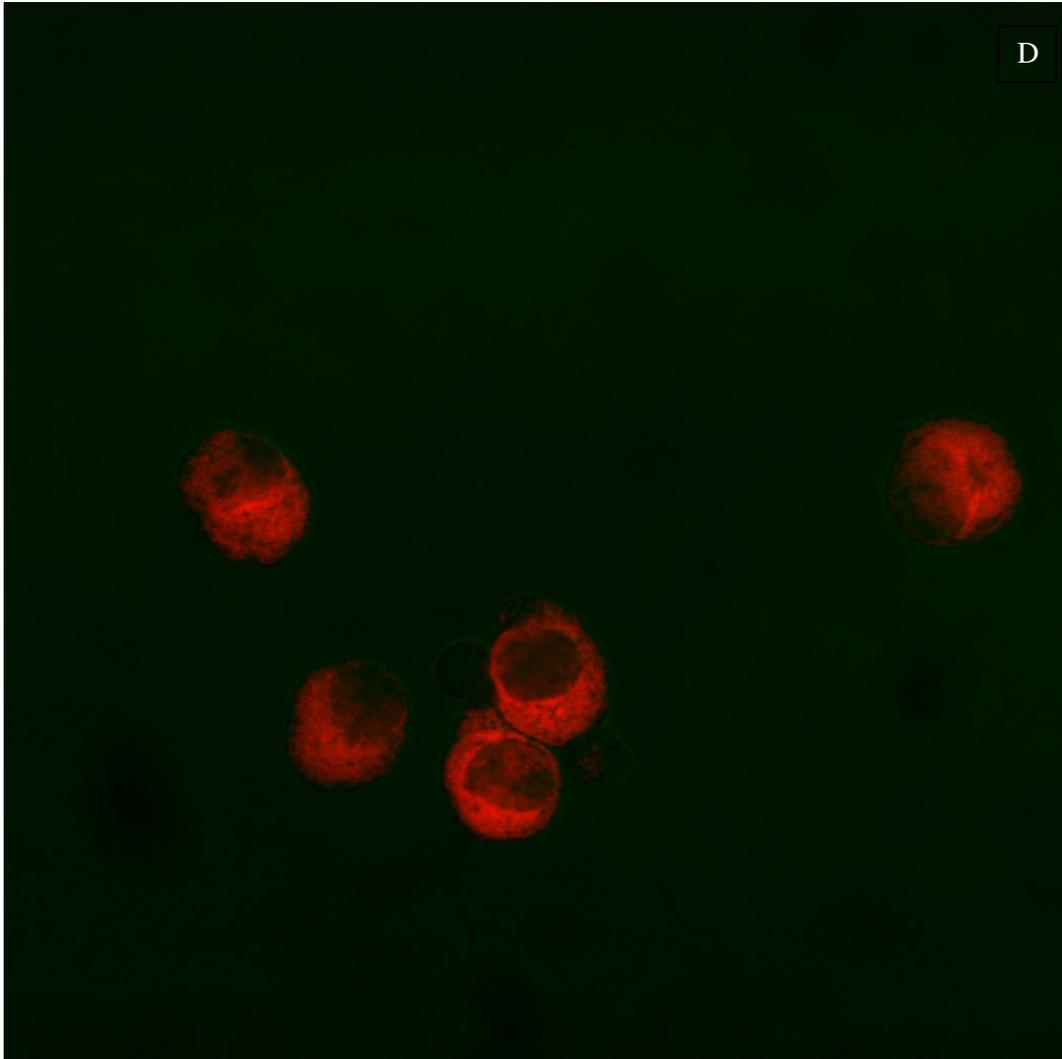


Tabela 1: Atividade das hidrolases lisossômicas (nmol/h/mg de proteínas) em LCLs após 12 dias de cultivo e depois de 730 dias de criopreservação em nitrogênio líquido.

Enzimas	Antes do Congelamento	Depois do Congelamento
α-galactosidase	47.4 \pm 16.3	47,4 \pm 21,3
α-glicosidase	27,5 \pm 16,4	27,5 \pm 16,4
β-glicosidase	4,4 \pm 1,8	4,3 \pm 1,8

VII.2 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Voluntário Nº _____

Título da pesquisa: EFEITO DO VÍRUS EPSTEIN BARR SOBRE A ATIVIDADE DE HIDROLASES LISSÔMICAS DE LINFÓCITOS: COMPARAÇÃO ANTES E APÓS CONGELAMENTO DAS CÉLULAS

Vimos por meio desta, convidá-lo a participar de uma pesquisa que estamos realizando aqui no Serviço de Genética Médica do HCPA.

O objetivo desta pesquisa é comparar os valores enzimáticos em linfócitos não transformadas com aqueles em linfócitos transformados com EBV, assim como, estabelecer culturas de linfócitos B transformados com vírus Epstein-Barr (EBV) no Laboratório de Cultura de Células do Serviço de Genética Médica.

Justificativa:

Para o diagnóstico de algumas doenças, utilizam-se amostras de plasma, leucócitos ou fibroblastos. Os dois primeiros tipos de amostra apresentam vantagem à facilidade de coleta, no entanto, não permitem uma boa reprodutibilidade por longo período devido a senescência. Os fibroblastos podem ser armazenados por mais tempo, mas apresentam como inconveniente à coleta dolorosa. Existem, no entanto, diversos trabalhos que investigam a utilização de linfócitos B transformados com vírus EBV como amostras alternativas para o diagnóstico de doenças genéticas.

Procedimentos a serem utilizados:

O meio que vamos usar para realizar este trabalho se dá através da coleta de amostras de 20 ml de sangue periférico. O material obtido será em seguida colocado em cultura no laboratório e após descartado. Para a coleta de sangue, o Sr.(a) sentirá um leve desconforto com a punção, com possibilidade de um leve hematoma (mancha roxa).

Confidencialidade:

Os seus dados serão utilizados de uma forma anônima e a divulgação dos resultados será no meio científico.

Portanto, fui informado dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada. Recebi informação a respeito da coleta a ser feita e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim eu o desejar. O pesquisador responsável certificou-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais e terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa, em face destas informações. Declaro, outrossim, que recebi cópia deste consentimento, de que todos os dados sobre a minha pessoa serão confidenciais e mantidos em sigilo.

Assinatura do voluntário

Nome

Data

Assinatura do pesquisador

Nome

Data

Nome do pesquisador para contato: Dra. Janice Carneiro Coelho

Telefone: (51) 21018011

Contato: MSc. Alexandre Silva de Mello

Telefone: (51) 96622626

VII.3**LISTA DE ABREVIATURAS**

CyA	Ciclosporina A
DLD	Doença Lisossômica de Depósito
EBNA 1	Antígeno Nuclear do EBV 1
EBNA 2	Antígeno Nuclear do EBV 2
EBNA 3	Antígeno Nuclear do EBV 3
EBV	Vírus Epstein-Barr
EIM	Erros Inatos do Metabolismo
H4B4	Anticorpo Monoclonal Primário, Anti-LAMP2
IHQ	Imunohistoquímica
LAMP2	Proteína de Membrana Associada ao Lisossomo 2
LCL	Linhagens Celulares Linfoblásticas
LMP1	Proteína de Membrana de Fase Latente 1
LMP2	Proteína de Membrana de Fase Latente 2
MC	Microscopia Confocal
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MPS I	Mucopolissacaridose tipo I
NF- κ B	Fator Nuclear Kappa Potenciador de Células B Ativadas
NK	Célula Natural Killer
PBMCs	Células Mononucleares do Sangue Periférico
PDLs	Níveis de Duplicação na População de Células

VII.4 LISTA DE FIGURAS

Fig.1 – Esquema de uma célula normal e uma célula infectada pelo vírus EBV.....11

Fig.2 - Representação esquemática e simplificada dos processos envolvidos em um erro inato do metabolismo.....13

VII.5 *LISTA DE TABELAS*

Tab.1 - Características clínicas de alguns EIM e as enzimas relacionadas.....15