

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS  
MÉDICAS**

**DIAGNÓSTICO DE MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO IVA EM  
AMOSTRAS DE SANGUE IMPREGNADO EM PAPEL FILTRO**

**MARLI VIAPIANA CAMELIER**

**Orientador: Prof. Dr. Roberto Giugliani**

**Dissertação de Mestrado**

**2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS  
MÉDICAS**

**DIAGNÓSTICO DE MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO IVA EM  
AMOSTRAS DE SANGUE IMPREGNADO EM PAPEL FILTRO**

**MARLI VIAPIANA CAMELIER**

**Orientador: Prof. Dr. Roberto Giugliani**

A apresentação desta dissertação é requisito do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para a obtenção do título de mestre.

**Dissertação de Mestrado**

**2011**

## DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

Responsável: Biblioteca Faculdade de Medicina da UFRGS

C287d

Camelier, Marli Viapiana

Diagnóstico de mucopolissacaridose tipo IVA em sangue impregnado em papel filtro / Marli Camelier Viapiana. – Porto Alegre, 2011.  
96 f. : il.

Orientador: Roberto Giugliani

Dissertação (Mestrado em Medicina) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, 2011.

1. Mucopolissacaridose. 2. Síndrome de Morquio. I. Giugliani, Roberto. II. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas. IV. Título.

CDU: 61

Para meus pais, Ulisses Viapiana e Lída Spagnolo  
Viapiana. (*In memoriam*)

## **AGRADECIMENTOS**

Muitas pessoas foram importantes para a realização deste projeto. Agradeço a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para que este trabalho fosse realizado e em especial:

Ao Roberto, por ter-me proporcionado esta oportunidade, pela confiança, pelo apoio e pelo estímulo necessário à realização deste projeto e por acreditar na minha capacidade, incentivando-me a alcançar meus objetivos.

À Maira Burin, pelo apoio, com quem aprendi as diversas técnicas enzimáticas, que me proporcionou a experiência, necessária e indispensável, para a realização deste trabalho.

À colega Jurema De Mari, por ter-me auxiliado na coleta dos controles e realização das dosagens de proteína das amostras, pela amizade e apoio, tanto na realização deste trabalho, como na vida pessoal.

A Giórgia Marasca, pela colaboração na separação das amostras de leucócitos e auxílio nos programas de computador.

A todos os colegas do laboratório de erros inatos do metabolismo, pelos bons momentos de convívio e pelo fundamental apoio e parceria em todos os momentos, em especial ao Régis Guidobono, pelo auxílio no laboratório e à Marilda, pelo seu bom humor, fundamental em muitos momentos de trabalho e pela sua responsabilidade com a limpeza do material utilizado nos experimentos.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, instituição que devo imensa gratidão, por toda minha formação acadêmica e pela oportunidade em obter este título.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, por fazerem parte desta jornada tão importante em minha vida.

A todos os colegas da equipe de trabalho do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela colaboração com a coleta dos controles.

À equipe da secretaria do Serviço de Genética Médica do HCPA, em especial à Zeniara Lompa, pelo auxílio na solicitação dos materiais do orçamento do projeto.

À equipe de pesquisa clínica do Serviço de Genética Médica do HCPA, em especial ao Fernando Machado da Costa, pelo auxílio em receber e encaminhar os pacientes e à Taiane Vieira, pela colaboração em contactar os pacientes de MPS IVA e auxílio na realização das coletas destes.

À equipe do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) e ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA), pelo auxílio financeiro.

Agradeço, em especial, aos pacientes, que apesar das inúmeras dificuldades, concordaram em participar deste estudo.

Aos meus amigos, pelo incentivo, tão importante neste momento de minha vida.

Ao Fernando, por estar ao meu lado e ter-me incentivado, pelo seu carinho e compreensão, principalmente nas horas mais difíceis.

Ao meu filho Lucas, que representa tudo em minha vida, pelo carinho e por ter sido tão compreensivo durante este período.

“Lembre-se que as pessoas podem tirar tudo de você, menos o seu conhecimento. É o seu bem mais precioso. Explore; viaje; descubra, conheça.” (Albert Einstein)

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** As mucopolissacaridoses (MPS) são doenças de depósito lisossômico, caracterizadas pela deficiência de enzimas lisossômicas envolvidas na degradação dos glicosaminoglicanos (GAGs). O acúmulo anormal dessas macromoléculas no interior dos lisossomos provoca alterações estruturais e funcionais, de caráter multissistêmico e progressivo. Os GAGs acumulados também são excretados na urina, onde podem ser identificados através de diversos métodos bioquímicos. Estas doenças estão presentes em todos os grupos étnicos e a incidência conjunta das MPS, é estimada entre 1:10.000 a 1:25.000 nascidos vivos. (Baehner, 2005). A causa das MPS é a deficiência de uma enzima específica na rota de degradação dos GAGs. As MPS são classificadas segundo o tipo de substrato (GAGs) acumulado e a enzima específica deficiente. Na síndrome de Morquio A, ou mucopolissacaridose tipo IVA (MPS IVA), o substrato acumulado é o queratan sulfato e a enzima deficiente é a N-acetilgalactosamina-6-sulfatase. (GALNS). Os pacientes afetados por MPS IVA apresentam baixa estatura, disostose múltipla, opacidade de córnea, entre outros sinais e sintomas. O desenvolvimento psicomotor e mental é normal. O método de detecção inicial das MPS baseia-se na identificação dos GAGs, que são excretados em excesso na urina destes pacientes. A presença de queratan sulfato na eletroforese ou a detecção de níveis aumentados na dosagem quantitativa, direciona a investigação laboratorial para a MPS IV. O diagnóstico definitivo se estabelece através da medida da atividade enzimática em leucócitos ou fibroblastos, onde se constata a deficiência enzimática.

**OBJETIVOS:** Este estudo teve como objetivo principal, tornar disponível um novo método, mais simples, rápido e acessível, para o diagnóstico bioquímico de mucopolissacaridose tipo IVA, utilizando amostras de sangue impregnadas em papel filtro (SIPF).

**MATERIAIS E MÉTODOS:** Amostras de SIPF e leucócitos de 35 pacientes de ambos os sexos, com idade entre 3 e 47 anos, com diagnóstico previamente estabelecido de MPS IVA, pelo método convencional, em leucócitos e /ou fibroblastos, foram

analisadas. Para o estabelecimento dos valores de referência, foram estudadas amostras de leucócitos e de SIPF de 54 indivíduos saudáveis (18-50 anos), de ambos os sexos. Após assinatura do termo de consentimento, amostras de sangue periférico de pacientes e controles, foram coletadas, para a obtenção de leucócitos e sangue impregnado em papel filtro.(SIPF). Os ensaios enzimáticos foram realizados nas amostras de leucócitos e SIPF, simultaneamente, para comparar os resultados.

**RESULTADOS:** Os resultados obtidos nos ensaios enzimáticos de todos os pacientes apresentando MPS IVA, confirmaram a deficiência da atividade enzimática em ambos materiais (leucócitos e SIPF) com uma diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. (Mann-Witney U test,  $p < 0,001$ ). Neste estudo, a medida de GALNS em amostras de SIPF permitiu a identificação dos pacientes com MPS IVA, com sensibilidade de 100 %. Os testes de estabilidade realizados nas amostras de SIPF indicaram que amostras coletadas para a medida da atividade de GALNS devem ser mantidas a 4°C sempre que possível, sendo estáveis nesta temperatura por mais de 30 dias.

**CONCLUSÕES:** Nas condições utilizadas, amostras de SIPF se mostraram adequadas para a identificação segura de pacientes com MPS tipo IVA. O método que utiliza amostras de SIPF é mais acessível e rápido, simplificando a etapa de coleta e transporte, podendo ser utilizado para detectar pacientes afetados, especialmente em áreas de difícil acesso para a coleta e transporte de amostras líquidas.

**Palavras-chave:** Mucopolissacaridose, Síndrome de Morquio, glicosaminoglicanos, queratan sulfato, diagnóstico, sangue em papel filtro.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Mucopolysaccharidosis (MPS) are lysosomal deposit diseases characterized by lysosomal enzymes deficiency involved in the degradation of glycosaminoglycans (GAGs). The abnormal accumulation of these macromolecules inside the lysosomes provokes structural and functional alterations multi-systemically and progressively. The accumulated GAGs are also excreted in the urine, where they may be identified through many different biochemical methods. These diseases occur among all ethnical groups and the combined incidence of MPS is estimated at 1:10.000 to 1:25.000 live births. (Baehner, 2005). The MPS' cause is the deficiency of a specific enzyme in the GAGs degradation route. The MPS are classified according to a type of substrate accumulated (GAGs) and the deficiency of a specific enzyme. In Morquio syndrome A or Mucopolysaccharidosis type IVA (MPS IVA), the accumulated substrate is the keratan sulfate and the deficient enzyme is the N-acetylgalactosamine-6-sulfatase (GALNS). The patients affected by MPS IVA present short stature, dysostosis multiplex, corneal opacity, among others signs and symptoms. The cognitive and mental developments are normal. The MPS initial detection method is based on the identification of the GAGs which are excreted in the patients' urine. The presence of the keratan sulphate in the electrophoresis or the detection of the increased levels in the quantitative dosage directs the laboratory investigation to MPS IV. The definitive diagnosis is established through measuring the enzymatic activity in leukocytes or fibroblasts, in which the enzymatic deficiency is proved.

**OBJECTIVE:** This study's main purpose is to offer an original, simpler, faster and more accessible method for biochemical diagnosis of Mucopolysaccharidosis type IVA using dried blood samples (DBS).

**MATERIALS AND METHODS:** DBS and leukocytes from 35 patients from both sexes between 3 and 47 years of age with previously established diagnosis of MPS IVA through the conventional method in leukocytes and/or fibroblasts were analyzed. In order to establish reference values DBS and leukocytes samples from 54 healthy people

(18-50 years of age) from both sexes were studied. After signing a paper consent form, peripheral blood samples from patients and controls were collected for obtaining leukocytes and dried blood samples (DBS). To validate the method, we made a simultaneous GALNS assay in leukocytes and DBS.

**RESULTS:** The results obtained in the enzymatic assays from all patients presenting MPS IVA confirmed the deficiency of enzymatic activity in both materials (leukocytes and DBS) with a significant statistical difference in relation to the control group. (Mann-Witney U tes,  $p < 0,001$ ). In this study, the quantity of GALNS in DBS allowed the identification of patients with MPS IVA with sensibility of 100%. The stability tests indicate that DBS samples collected for measuring the activity of GALNS must be kept at 4°C whenever possible, being stable in this temperature for more than 30 days.

**CONCLUSION:** In the used conditions, DBS were adequate for a safe identification of patients with MPS type IVA. The method which utilizes DBS is cheaper and faster, what simplifies the collection and transportation stage and can be used to detect affected patients especially in difficult access areas for the collection and transportation of liquid samples.

**KEY WORDS:** Mucopolysaccharidosis, Morquio syndrome, glycosaminoglycans, keratan sulfate, diagnosis, dried blood samples.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Paciente de 6 anos, apresentando baixa estatura, “mãos em garra”, pectus carinatum e deformidade do tronco e pescoço .....	22
Figura 2 – Paciente de 25, 38 e 6 anos, apresentando deformidades esqueléticas típicas da síndrome de Morquio tipo IVA.....	23
Figura 3 - Pacientes de 31 e 33 anos, irmãs, com baixa estatura, protusão externa, distrofia da articulação radioulnarcárpica, distrofia da articulação do cotovelo (úmero radiulnar) e pectus carinatum.....	24
Figura 4 - Via do catabolismo do queratan sulfato.....	30
Figura 5 - Remoção de sulfato pela N-acetilgalactosamina-6-sulfatase.....	31
Figura 6 - Protocolo de investigação laboratorial para o diagnóstico de mucopolissacaridose, utilizado no Laboratório de Erros Inatos do metabolismo do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.....	35

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação das mucopolissacaridoses.....	27
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

AT - Azul de toluidina  
AR - Autossômica recessiva  
CS - Condroitin Sulfato  
 $\beta$ - GAL -  $\beta$ - galactosidase  
DS - Dermatan Sulfato  
DLD - Doença Lisossômica de Depósito  
DMB - Dimetilblue  
DPN - Diagnóstico pré-natal  
EIM - Erros Inatos do Metabolismo  
HS - Heparan Sulfato  
GAGS- Glicosaminoglicanos  
GALNS - Galactose-6-sulfato sulfatase ou N-acetilgalactosamina-6-sulfatase  
HCPA - Hospital de Clínicas de Porto Alegre  
LREIM - Laboratório Regional de Erros Inatos do Metabolismo  
MPS – Mucopolissacaridose  
MPS IVA - Mucopolissacaridose tipo IVA  
MU- $\beta$ -gal-6-sulfato - Substrato utilizado nos ensaios enzimáticos  
QS - Queratan sulfato  
RLX - Recessiva ligada ao cromossomo X  
RN - Recém-nascido  
SIPF - Sangue impregnado em papel filtro  
TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido  
TCI - Termo de Consentimento Informado  
TG - Terapia gênica  
TMO - Transplante de medula óssea  
TRE - Terapia de reposição enzimática

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>1.1.ERROS INATOS DO METABOLISMO.....</b>	<b>17</b>
<b>1.2 DOENÇAS LISSÔMICAS DE DEPÓSITO (DLD).....</b>	<b>20</b>
<b>1.3 MUCOPOLISSACARIDOSES .....</b>	<b>20</b>
1.3.1 Mucopolissacaridose tipo IVA .....	21
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>25</b>
<b>2.1 MUCOPOLISSACARIDOSE.....</b>	<b>25</b>
2.1.2 Mucopolissacaridose tipo IVA (Morquio A).....	28
<b>2.2 ETIOLOGIA.....</b>	<b>31</b>
<b>2.3 ASPECTOS CLÍNICOS.....</b>	<b>31</b>
<b>2.4 INCIDÊNCIA .....</b>	<b>33</b>
<b>2.5 DIAGNÓSTICO .....</b>	<b>34</b>
2.5.1 Protocolo laboratorial para a investigação de mucopolissacaridoses .....	35
2.5.2 Diagnóstico pré-natal.....	35
2.5.3 Estratégias de prevenção dos erros inatos do metabolismo .....	37
2.5.4 Detecção de portadores .....	37
2.5.4.1 Diagnóstico enzimático.....	37
2.5.4.2 Diagnóstico molecular .....	38
2.5.5 Diagnóstico de mucopolissacaridose tipo IVA.....	38
<b>2.6 TRATAMENTO .....</b>	<b>39</b>
2.6.1 Tratamento para a MPS IVA .....	41
<b>3 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>42</b>
<b>4 OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>
<b>4.1 OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>43</b>
<b>4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>43</b>
<b>5 METODOLOGIA .....</b>	<b>44</b>
<b>5.1 AMOSTRA ESTUDADA .....</b>	<b>44</b>
<b>5.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO .....</b>	<b>44</b>
<b>5.3 POPULAÇÃO EM ESTUDO .....</b>	<b>44</b>

<b>5.4 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA .....</b>	<b>45</b>
<b>5.5 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS .....</b>	<b>45</b>
<b>5.6 DESCRIÇÃO DAS TÉCNICAS UTILIZADAS .....</b>	<b>46</b>
5.6.1 Separação de leucócitos .....	46
5.6.2 Preparação das amostras para a dosagem de proteína .....	46
5.6.3 Dosagem de proteína nas amostras de leucócitos.....	47
5.6.4 Ensaio enzimáticos.....	48
5.6.4.1 Ensaio em leucócitos.....	48
5.6.4.1.1 Galactose-6-sulfato sulfatase .....	48
5.6.4.1.2 B-Galactosidase .....	49
5.6.4.2 Ensaio enzimático em papel filtro .....	49
5.6.4.2.1 Ensaio enzimático de galactose-6-sulfato sulfatase (SIPF).....	50
5.6.4.2.2 Ensaio enzimático da $\beta$ -galactosidase em SIPF (enzima de referência).....	50
5.6.5 Termoestabilidade .....	51
<b>5.7 PARÂMETROS AVALIADOS .....</b>	<b>52</b>
<b>5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>52</b>
<b>5.9 ASPECTOS ÉTICOS .....</b>	<b>523</b>
<b>6 DESENVOLVIMENTO .....</b>	<b>54</b>
<b>6.1 A REALIZAÇÃO DA PESQUISA.....</b>	<b>54</b>
<b>7 ARTIGO EM INGLÊS.....</b>	<b>55</b>
<b>8 ARTIGO EM PORTUGUÊS .....</b>	<b>70</b>
<b>9 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>84</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>85</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>90</b>
<b>ANEXO A - APROVAÇÃO DO PROJETO .....</b>	<b>90</b>
<b>ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA CONTROLES.....</b>	<b>91</b>
<b>ANEXO C - TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO PARA PACIENTES .....</b>	<b>92</b>
<b>ANEXO D - AUTORIZAÇÃO PARA USO DE IMAGEM .....</b>	<b>94</b>
<b>ANEXO E - SUBMISSÃO DO ARTIGO .....</b>	<b>95</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO

Os erros inatos do metabolismo (EIM) são doenças determinadas geneticamente, causadas por um defeito enzimático específico que leva ao bloqueio de uma determinada rota metabólica. Esse bloqueio tem como consequência o acúmulo do substrato da enzima deficiente, a deficiência do produto da reação ou o desvio do substrato para uma rota metabólica alternativa.

Os EIM correspondem à cerca de 10% de todas as doenças genéticas, isto é, cerca de 500 distúrbios que envolvem defeitos na síntese, degradação, transporte e armazenamento de moléculas no organismo (Sanchez et al, 2006). Ainda que individualmente raros, são freqüentes em conjunto, tendo uma incidência global estimada em 1/1.000 recém-nascidos vivos (RNs). Em grupos de alto risco, como RNs agudamente enfermos, esse número pode ser 10 a 20 vezes maior (Wannmacher et al, 1982 e Green,1991).

O termo EIM foi proposto por Archibald Garrod, através de seus estudos sobre a alcaptonúria, pentosúria, albinismo e cistinúria. Ele observou que os indivíduos afetados apresentavam concentração anormal de metabólitos intermediários, sugerindo a presença de um defeito em algum ponto do metabolismo dessas moléculas. Tais distúrbios foram atribuídos à atividade deficiente ou ausente de uma enzima responsável por um passo específico de uma rota metabólica, cujo bloqueio levava ao acúmulo do substrato e / ou falta do produto (Stanbury et al, 1983).

Os EIM podem ser classificados de várias maneiras, como, por exemplo, pela idade de apresentação ou pela área do metabolismo afetada. Sinclair (1982) dividiu os EIM de acordo com a repercussão celular e metabólica do defeito associado, em:

- 1) EIM envolvendo distúrbios do transporte. Exemplo: Deficiências de dissacaridases.
- 2) EIM envolvendo distúrbios de armazenamento e degradação. Exemplo: doenças lisossômicas de depósito.

- 3) EIM envolvendo distúrbios de síntese. Exemplo: hiperplasia adrenal congênita.
- 4) EIM envolvendo distúrbios do metabolismo intermediário. Exemplo: hiperfenilalaninemia e tirosinemia.

Embora a confirmação diagnóstica seja usualmente obtida pela demonstração da baixa atividade de uma enzima específica, várias razões podem motivar a deficiência enzimática, como por exemplo: 1) A enzima codificada por um gene mutante pode não ser produzida ou ser produzida com atividade catalítica reduzida; 2) Pode resultar de uma mutação envolvendo o gene que regula a síntese da enzima; 3) a enzima pode ser degradada a uma velocidade exagerada, levando à redução da quantidade de enzima ativa disponível; 4) a mutação pode afetar a síntese de cofator necessário para a atividade enzimática (Fensom et al,1989).

Em 1982, foi criado no Serviço de Genética Médica (SGM) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) o Laboratório Regional de Erros Inatos do Metabolismo (LREIM).

O LREIM é um centro de referência nacional para o diagnóstico de MPS, sendo a base laboratorial da Rede MPS Brasil, criada em 2004. A Rede MPS Brasil recebe amostras de pacientes de diversas regiões do Brasil e mesmo do exterior, para diagnóstico ou acompanhamento de pacientes em tratamento. Este serviço tem sido considerado da maior importância, uma vez que essas doenças são raras, subdivididas em diversos grupos e geralmente não apresentam sintomas clínicos específicos, o que exige a realização de inúmeras técnicas laboratoriais sofisticadas, que requerem material e profissionais especializados.

De maneira geral, todos os pacientes encaminhados ao LREIM são submetidos a testes de triagem qualitativos e semiquantitativos na urina e no sangue. Quando um desses testes resulta positivo ou quando persiste a suspeita clínica, mesmo com testes de triagem negativos, a investigação continua com testes mais específicos e indicados de acordo com a suspeita clínica.

Infelizmente, a maioria das doenças lisossômicas (DLD) não são identificadas pelos testes de triagem iniciais na investigação de um EIM. Portanto, quando sinais clínicos e radiológicos são sugestivos de uma DLD, é necessária a realização de exames específicos e, na maioria dos casos, somente através de ensaios enzimáticos

em leucócitos ou cultura de fibroblastos é que se obtém o diagnóstico definitivo (Lowden,1982). Como as DLD representam mais da metade dos casos de EIM diagnosticados no LREIM, é justificada a nossa preocupação com a sua identificação.

A baixa frequência individual dos EIM e sua grande heterogeneidade clínica justificam a criação de laboratórios de referência, com o objetivo de facilitar o diagnóstico dessas doenças.

O LREIM atua como um laboratório de referência para serviços de genética, pediatria e neurologia de todos os estados do Brasil, outros países da América Latina (Argentina, México, Colômbia, Chile e Peru) principalmente e países de outras regiões, como África, Oriente Médio e Ásia, os quais enviam material para análise, quando necessitam de apoio diagnóstico em casos de suspeita de DLD.

A atuação como um centro de referência, recebendo amostras dos mais remotos lugares do Brasil e do exterior, traz algumas preocupações. Entre elas, a que se relaciona com a influência das condições de coleta e transporte do material, na atividade enzimática a ser analisada. O transporte de amostras líquidas, como sangue total enviado em tubos vacutainer, é prejudicado quando as distâncias são longas e os serviços de transporte de material são precários. Em tais situações, as amostras estão sujeitas à deterioração em curto espaço de tempo.

Desde a criação do Serviço de Genética Médica, em 1982, até dezembro de 2010, 2134 pacientes com suspeita clínica de MPS foram investigados. Destes, 1101 tiveram diagnóstico confirmado de MPS, sendo 113 de Síndrome de Morquio A (MPS IVA). Os pacientes com MPS IVA diagnosticados eram de várias procedências, incluindo outros estados do Brasil (Alagoas, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande Do Sul, Rio Grande do Norte, Santa Catarina, São Paulo) e de outros Países (Arábia Saudita, Chile, Colômbia, Peru e México).

Com o objetivo de aprimorar e continuar oferecendo apoio ao diagnóstico das DLD, especialmente das Mucopolissacaridoses, para os diversos serviços que utilizam o LREIM e a Rede MPS Brasil, este projeto teve a finalidade de padronizar uma nova técnica de diagnóstico da MPS IVA, utilizando amostras de sangue impregnado em

papel filtro (SIPF). O uso deste tipo de amostra facilita muito o transporte, possibilitando o acesso ao diagnóstico dos pacientes provenientes das regiões mais distantes.

## **1.2 DOENÇAS LISSÔMICAS DE DEPÓSITO (DLD)**

Para Tager et al (1984) as DLD resultam da deficiência de alguma enzima específica, ativador protéico ou proteína de transporte, conduzindo ao acúmulo dos substratos no lisossomo, que provoca mudanças bioquímicas específicas e sintomas característicos. O aparelho lisossômico funciona como um sistema digestivo intracelular, onde as enzimas hidrolíticas, com pH ácido, são responsáveis pela degradação de macromoléculas. O catabolismo ocorre geralmente em cascata: Cada passo é catalisado por uma enzima específica, em que o produto de uma reação forma o substrato da próxima.

As DLD são doenças progressivas, graves e predominantemente incuráveis, com risco de repetição de 25% na mesma família. Na maioria delas, o diagnóstico permite apenas medidas preventivas, tais como o aconselhamento genético, a detecção de heterozigotos e o diagnóstico pré-natal (DPN).

## **1.3 MUCOPOLISSACARIDOSES**

As mucopolissacaridoses (MPS) são erros inatos do metabolismo dos glicosaminoglicanos (GAGs), que ocorrem pelo acúmulo progressivo destas macromoléculas dentro dos lisossomos, consequência por sua vez da deficiência das enzimas responsáveis pela sua degradação dentro destas organelas. São um grupo das doenças lisossômicas de depósito (DLD), nas quais há acúmulo anormal de GAGs dentro dos lisossomos e excreção aumentada desses compostos na urina. As MPS são

doenças progressivas e apresentam um amplo espectro de manifestações clínicas, tanto motoras como sensoriais (Sanchez, 2006).

### 1.3.1 Mucopolissacaridose tipo IVA

A mucopolissacaridose tipo IVA é uma doença de depósito lisossômico (DLD), de caráter autossômico recessivo.

A MPS IVA é causada por uma deficiência intralisossomal da degradação de queratan sulfato. Este glicosaminoglicano é um componente da N-acetilglicosamina ou acetilgalactosamina e galactose, formando um componente essencial da cartilagem e da córnea. Desta maneira, fica clara a manifestação primária da mucopolissacaridose no sistema esquelético (disostose múltipla) e nos olhos (opacidade de córnea).

A MPS IVA apresenta uma grande heterogeneidade clínica, com sintomas muito variáveis: baixa estatura, protusão esternal, pescoço curto, deformidades das mãos, deficiência no esmalte dentário, pectus carinatum, entre outros sinais e sintomas. Isto pode dificultar o diagnóstico individual dos pacientes, geralmente confundidos com portadores de outras displasias ósseas. Figuras 1, 2 e 3.

Pelo menos duas enzimas contribuem para a degradação do queratan sulfato, a galactose-6-sulfato sulfatase e a  $\beta$ -galactosidase, que quebram o sulfato restante de alguns glicosaminoglicanos (queratan sulfato e condroitin sulfato). A deficiência genética de uma dessas enzimas causa as MPS tipo IVA e IVB, respectivamente (Kircher et al, 2007).

Apesar da baixa estatura e da displasia esquelética progressiva ser usualmente mais pronunciada na MPS IVA, não é possível distinguir pelas características clínicas a MPS IVA da IVB.

Devido à displasia de odontóide, a mielopatia cervical é quase sempre presente, ainda que também contribuam outros fatores, como a disfunção ligamentar. A inteligência é normal em ambos os tipos de MPS IV (Neufeld e Muenzer, 2001 e Northover, 1996).



Figura 1 - Paciente de 6 anos, apresentando baixa estatura, “mãos em garra”, pectus carinatum e deformidades do tronco e pescoço.



Figura 2 – Paciente de 25, 38 e 6 anos, apresentando deformidades esqueléticas típicas da síndrome de Morquio tipo IV A.



Figura 3 - Pacientes de 31 e 33 anos, irmãs, com baixa estatura, protusão esternal, distrofia da articulação radioulnarcárpica, distrofia da articulação do cotovelo (úmero radioulnar) e pectus carinatum.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 MUCOPOLISSACARIDOSE

A primeira publicação sobre Mucopolissacaridose foi realizada por Charles H. Hunter em 1917, que descreveu dois irmãos, de 8 e 10 anos de idade, que apresentavam baixa estatura, facies infiltrada, hepatoesplenomegalia, hérnia inguinal, mãos em garra e respiração ruidosa.

Mais tarde se esclareceu que os pacientes descritos por Hunter sofriam de uma forma de mucopolissacaridose ligada ao cromossomo X, atualmente chamada de MPS tipo II (Síndrome de Hunter). Todas as demais MPS são herdadas de modo autossômico recessivo.

Em 1919 Gertrude Hurler, de Munique, publicou a história clínica de algumas crianças com características semelhantes às descritas por Hunter, porém com presença de lordose lombar, opacidade de córnea e retardo mental. Provavelmente, apresentavam uma das formas de MPS, agora conhecida como MPS I (Síndrome de Hurler).

Estudos posteriores estabeleceram que estas doenças eram um defeito do metabolismo dos glicosaminoglicanos, sendo as mesmas classificadas como doenças genéticas que resultam da deficiência de enzimas lisossômicas necessárias para a degradação dos GAGs. Os GAGs presentes na urina de pacientes com MPS foram identificados como dermatan sulfato e heparan sulfato nas Síndromes de Hurler (MPS I), Hunter (MPS II) e Sly (MPS VII); como heparan sulfato na Síndrome de Sanfilippo (MPS III); como queratan sulfato na Síndrome de Morquio (MPS IV) e como dermatan sulfato na Síndrome de Maroteaux – Lamy (MPS VI).

As mucopolissacaridoses fazem parte do grupo das doenças de depósito lisossômico, nas quais há acúmulo anormal de mucopolissacarídeos ou glicosaminoglicanos (GAGs) dentro dos lisossomos e excreção aumentada destes compostos na urina (Sanchez, 2006).

As MPS são caracterizadas por acúmulo progressivo de substratos não digeridos, geralmente polímeros que não podem ser hidrolisados devido à inativação, ausência ou baixa atividade de uma das enzimas lisossomais (Scriver et al, 2001).

As MPS são doenças graves que comprometem o desenvolvimento de forma importante. A causa de morte dos pacientes com MPS se deve geralmente às complicações respiratórias e/ou insuficiência cardíaca.

Clinicamente, as MPS apresentam muitos achados em comum, (curso crônico e progressivo e o comprometimento multissistêmico, principalmente esquelético, cardiopulmonar, da córnea, fígado, baço, cérebro e meninges), o que permite uma suspeita diagnóstica inicial (Dangel, 1998).

As manifestações clínicas são em geral variáveis, existindo formas atenuadas e formas graves. O acúmulo de heparan sulfato, que é um componente das células do tecido nervoso, leva a sintomas predominantemente neurológicos, como o que ocorre nas síndromes de Hurler, Hunter e Sanfilippo. As valvulopatias e as cardiomiopatias são mais freqüentes e mais graves nas MPS em que há acúmulo de dermatan sulfato, como ocorre nas síndromes de Hurler, Hunter e Maroteaux-Lamy.

De uma maneira geral, a degradação dos glicosaminoglicanos (mucopolissacarídeos) nos lisossomos é iniciada por endoglicosidases, como a hialuronidase, que rompe as cadeias longas de polissacarídeos em unidades menores. Após esta degradação limitada, os fragmentos são novamente degradados por hidrólises seqüenciais das terminações ainda não reduzidas (Neufeld e Muenzer, 2001).

Esta segunda etapa é realizada por hidrolases lisossomais, específicas para cada tipo de união.

A ausência da enzima responsável neste processo leva a um acúmulo intralisossomal de moléculas de glicosaminoglicanos incompletamente degradados, interferindo no funcionamento normal dos lisossomos.

Na síndrome de Morquio, o substrato acumulado é o queratan sulfato, que leva à opacidade de córnea e a alterações esqueléticas (Dangel, 1998).

Atualmente, as mucopolissacaridoses podem ser classificadas de acordo com os aspectos bioquímicos, clínicos e genéticos, resumidos na tabela 1.

Tabela 1 - Classificação das mucopolissacaridoses  
Adaptado de Neufeld e Muenzer (2001)

<b>Tipo de MPS</b>	<b>Epônimo</b>	<b>Herança</b>	<b>GAGs na urina</b>	<b>Deficiência Enzimática</b>	<b>Localização do gene</b>
I grave	Hurler	AR	DS + HS	$\alpha$ -L-Iduronidase	4p 16.3
I interm.	Hurler-Scheie	AR	DS + HS	$\alpha$ -L-Iduronidase	4p 16.3
I atenuada	Scheie	AR	DS + HS	$\alpha$ -L-Iduronidase	4p 16.3
II	Hunter (grave)	RLX	DS + HS	Iduronato sulfatase	Xq28
II	Hunter (atenuada)	RLX	DS + HS	Iduronato sulfatase	Xq28
III A	Sanfilippo A	AR	HS	Heparan-N-sulfatase	17q25.3
III B	Sanfilippo B	AR	HS	$\alpha$ -N-Acetil-glucosaminidase	17q21
III C	Sanfilippo C	AR	HS	Acetil-CoA: $\alpha$ -glicos. acetiltransf.	8p11.1
III D	Sanfilippo D	AR	HS	N-acetilglicosamina 6-sulfatase	12q14
IV A	Morquio A	AR	QS	Galactose-6-sulfatase	16q24.3
IV B	Morquio B	AR	QS	$\beta$ -galactosidase	3p21.33
VI	Maroteaux-Lamy	AR	DS	Arilsulfatase B	5q13-q14
VII	Sly	AR	DS + HS	$\beta$ -glicuronidase	7q21.11
IX	Natowicz	AR	CS	Hialuronidase	3p21.1-p21.3

### 2.1.2 Mucopolissacaridose tipo IVA (Morquio A)

A MPS IVA é uma DLD de caráter autossômico recessivo, caracterizada pelo acúmulo do substrato queratan sulfato nos lisossomos, resultante da baixa atividade da enzima lisossomal Galactose-6-sulfatase ou N - acetilgalactosamina -6- sulfatase (GALNS). Como resultado do defeito enzimático, o substrato queratan sulfato deixa de ser degradado e acumula-se progressivamente nos lisossomos de vários órgãos, principalmente na córnea e cartilagens, levando a opacidade de córnea e a alterações esqueléticas importantes, sem comprometimento cognitivo (Dangel,1998).

Anormalidades esqueléticas típicas da MPS IVA incluem baixa estatura, tronco curto, platiespondilia, hipoplasia de odontóide, cifose, hiperlordose, escoliose, genu valgum, entre outros sinais e sintomas.

A mielopatia cervical pode desenvolver-se precocemente em pacientes com a forma grave da síndrome de Morquio (Scriver et al, 2001 e Stevens et al,1991).

A Síndrome de Morquio A (MPS IVA) foi descrita pela primeira vez em 1929, pelo pediatra uruguaio Luis Morquio, que descreveu uma família com quatro crianças afetadas. Essas crianças eram irmãos, cujos pais eram primos em primeiro grau. No mesmo ano, Brailsford descreveu um paciente similar, na Inglaterra (Neufeld e Muenzer, 2001).

Em 1974, o defeito metabólico foi descrito e a deficiência de galactose-6-sulfato-sulfatase foi identificada.

As principais manifestações clínicas desta doença são atribuídas à restrição tecidual na distribuição do QS. (córnea e cartilagem), em contraste para uma ampla distribuição de dermatan sulfato (DS), e heparan sulfato (HS). Como estes dois glicosaminoglicanos, o QS é degradado seqüencialmente, da não-redução e pela ação de glicosidases e sulfatases.

Na degradação seqüencial do queratan sulfato, uma vez que o primeiro sulfato foi degradado, a galactose terminal é clivada em uma reação catalisada pela  $\beta$ -galactosidase. Esta enzima é deficiente na MPS IVB (Tojak JE, Ho CH, 1980; Groebe H, 1980). (figura 4).

O defeito enzimático na MPS IVA é na N-acetilgalactosamina-6-sulfatase, que é responsável pela clivagem do queratan sulfato (Matalon et al,1974; Horwitz,1978). Esta enzima também catalisa a remoção do sulfato de resíduos de N-acetilgalactosamina -6-sulfato que estão presentes no condroitin-6-sulfato, levando a excreção em excesso de condroitin sulfato. (Figura 5).

Ao nascimento, a maioria dos pacientes não apresenta sintomas perceptíveis, ocasionalmente, a inibição do abdutor e do quadril pode estar presente.

Os primeiros sintomas tornam-se evidentes ao final do primeiro ano de vida, quando as crianças desenvolvem deformidades em “giba”, claramente visíveis na posição sentada.

O desenvolvimento psicomotor e mental são normais, o andar é prejudicado pelo progressivo genu-valgus. Dificuldade para caminhar e aumento dos reflexos com associação piramidal podem ser observados na infância. Sintomas de compressão de raiz nervosa ocorrem devido à compressão da medula cervical (Kircher et al, 2007).

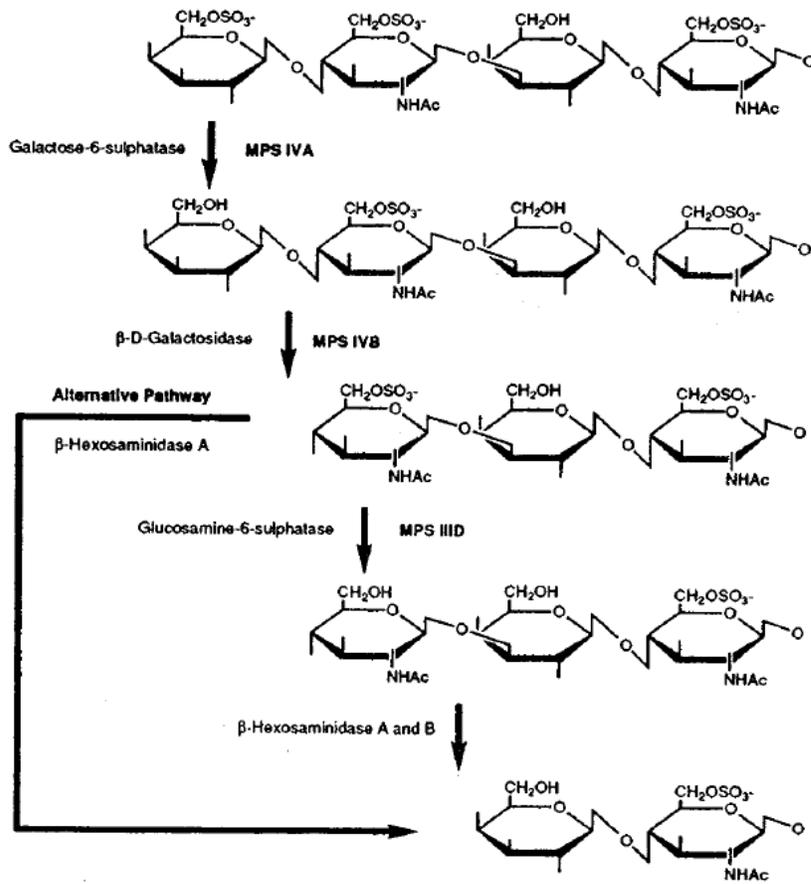


FIGURE 4. Pathway for catabolism of keratan sulfate.

Fonte: Scriver (2001)

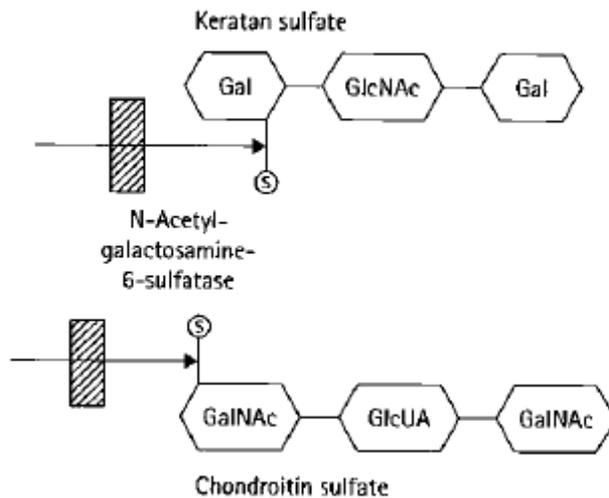


Figura 5 - Remoção de sulfato pela N-acetilgalactosamina-6-sulfatase.

Fonte: Matalon (1974) e Horwitz (1978)

## 2.2 ETIOLOGIA

Com exceção da MPS tipo II, que é herdada de forma recessiva ligada ao cromossomo X, todas as demais mucopolissacaridoses, incluindo a MPS IVA, são herdadas de modo autossômico recessivo (Neufeld et al, 2001).

## 2.3 ASPECTOS CLÍNICOS

A Síndrome de Morquio A apresenta uma grande variação clínica. As manifestações clínicas mais freqüentemente observadas incluem:

Baixa estatura: Ocorre como conseqüência das alterações ósseas apresentadas.

Fácies característica das doenças de depósito.

Comprometimento ocular: Opacidade de córnea, podendo ocorrer complicações como glaucoma, atrofia do nervo óptico e retinopatia degenerativa (Wrait, 1996).

Cardiopatia: Comprometimento de válvula aórtica pode ocorrer em alguns pacientes com a MPS IVA. A lesão mais comum é o espessamento da válvula mitral, associada a sua estenose ou insuficiência.

Sistema esquelético: As alterações esqueléticas típicas observadas nos pacientes são conhecidas como disostose múltipla e incluem:

Coluna vertebral: Instabilidade da coluna vertebral, secundária à hipoplasia de odontóide, cifose toracolombar, platiespondilia, vértebras com projeções em forma de flecha e pectus carinatum, que estão quase sempre presentes.

Tórax: costelas em forma de remo, clavículas pequenas e espessadas, escápula espessada e elevada.

Pélvis e quadril: Ossos ilíacos pequenos, ísquio e púbis espessados e malformados, subluxação da cabeça do fêmur, coxa valga.

Ossos longos: Espessamento das diáfises.

Mãos: falanges pequenas, metacarpos com bases cônicas, ossos do carpo pequenos e irregulares, estreitamento das diáfises dos metacarpos.

Comprometimento articular: A função articular anormal é secundária ao comprometimento metafisário e ao espessamento e fibrose da cápsula articular (Muenzer, 1986; Wraith, 1995).

Comprometimento do aparelho respiratório: Os pacientes podem apresentar infecções respiratórias e obstrução das vias aéreas superiores e inferiores, secundárias a hipertrofia das amígdalas e adenóides e também pelas anormalidades dos ossos faciais e pela redução das dimensões do tórax e abdômen, devido às alterações da coluna.

A síndrome da apnéia obstrutiva do sono ocorre em 85 a 90 % dos casos e é freqüente a alteração da função pulmonar (Semenza et al,1988).

As mudanças esqueléticas começam a aparecer no final do primeiro ou segundo ano de vida, quando os pacientes desenvolvem dificuldade de deambular, retardo do crescimento e as deformidades esqueléticas tornam-se evidentes. As deformidades são progressivas e tornam-se exageradas com a idade (McKusick ,1993).

O espaçamento entre os dentes pode ser pequeno e alargado. O esmalte dentário é hipoplásico em ambos, dentes de leite e dentes permanentes. Os dentes

desenvolvem cor cinza ou amarelada e o esmalte torna-se lascado ou fraturado. Os dentes desenvolvem cáries facilmente. As mudanças dentárias foram observadas somente nos pacientes de Morquio tipo A, não nos do tipo B (Nelson, 1988).

Nem todos os pacientes com MPS IVA são gravemente afetados. Em casos particulares, esta doença existe em uma variante mais branda, com pacientes com altura quase normal, que são diagnosticados em um estágio muito tardio, onde os primeiros sintomas aparecem somente entre 6 e 10 anos; os pacientes queixam-se de dor quando caminham e seu andar torna-se difícil. No sistema esquelético, as articulações do quadril e da coluna são as mais afetadas. Já para os adolescentes, as deformidades do fêmur lideram e as complicações requerem múltiplas medidas ortopédicas. A curvatura da coluna (freqüentemente a transição toracolombar) está mais prejudicada na idade adulta. Radiologicamente, sinais graves de displasia nas articulações do quadril, visíveis inicialmente, serão encobertos posteriormente por mudanças degenerativas. O corpo vertebral expõe formas irregulares, especialmente a transição toracolombar (Kircher et al, 2007).

## **2.4 INCIDÊNCIA**

Essas doenças foram estudadas em todos os grupos étnicos e estima-se que a incidência conjunta das MPS seja entre 1:10.000 a 1:25.000 nascidos vivos (Baehner, 2005). Provavelmente este valor seja subestimado, pois os dados da literatura são escassos. Neufeld e Muenzer (2001) e Northover (1996), estimam uma incidência de MPS IV entre 1:25.000 e 1:165.000, sendo Morquio A a forma mais freqüente. A incidência de MPS IVA na Irlanda do Norte é estimada em 1:76.000 nascidos vivos, enquanto que no Oeste da Austrália é estimada em 1:641.178 nascidos vivos (Nelson, 2003). Outras estimativas apontam para uma incidência de MPS IVA entre 1:200.000 a 1:300.000 nascidos vivos ([www.bmrn.com](http://www.bmrn.com)).

## 2.5 DIAGNÓSTICO

Os pacientes com mucopolissacaridoses acumulam glicosaminoglicanos (GAGs), que são excretados em excesso na urina, o que é útil para o diagnóstico inicial. Para investigar a presença de mucopolissacaridúria, se recomenda utilizar exames quantitativos, como a prova de 1,9-dimetil-metileneblue (DMB). Testes qualitativos, como a cromatografia para GAGs (Humbel et al, 1972; Lipiello e Mankin HJ,1977), e a eletroforese uni ou bidimensional, (Pennock,1976 e Cappelletti, 1979), são especialmente úteis para identificar os tipos de GAGs excretados em excesso e direcionar a investigação para os ensaios enzimáticos específicos (Barth et al, 1990; Chih-Kuang, 2002 e De Jong, 1989). A quantificação dos GAGs tem sido utilizada ainda como biomarcador da resposta ao tratamento das MPS.

O diagnóstico definitivo das mucopolissacaridoses se estabelece pela demonstração da deficiência da atividade enzimática específica, em leucócitos e/ou fibroblastos cultivados. Chamoles et al (2001) e Civallero et al (2006) desenvolveram uma nova técnica para medir a atividade enzimática de algumas enzimas lisossomais, em sangue impregnado em papel filtro (SIPF). Este método facilita o transporte das amostras e pode ser utilizado para a pesquisa de outras doenças lisossômicas. Também tem sido descrita recentemente, uma técnica que utiliza o teste de DMB automatizado, em amostra de urina seca em papel filtro, que também poderia ser utilizada na pesquisa neonatal destas doenças (Whitley, 2002).

Uma vez identificado o glicosaminoglicano eliminado em excesso ou quando existe uma suspeita clínica para um determinado tipo de MPS, se deve realizar a determinação da atividade enzimática que se suspeita deficiente, utilizando leucócitos ou fibroblastos cultivados. Para a interpretação dos testes qualitativos, utilizados no diagnóstico das mucopolissacaridoses, é necessário considerar alguns aspectos: A excreção de GAGs varia de forma inversamente proporcional à idade, sendo que no período neonatal é quase o dobro do observado nos lactentes de 6 a 12 meses de vida. Sendo assim, os níveis de mucopolissacaridúria dos pacientes examinados devem ser comparados com os controles normais da mesma faixa etária (De Jong, 1989 e Chih-

Kuang, 2002).

Algumas limitações quanto aos testes qualitativos são importantes de serem mencionadas: A excreção relativamente aumentada de GAGs no período neonatal, que vai decrescendo com a idade; a possibilidade de não se detectar as MPS dos tipos III ou IV, pela excreção de formas parcialmente degradadas ou pela excreção de quantidades relativamente menores que podem ocorrer nesses casos (Schwartz et al, 2001).

### 2.5.1 Protocolo laboratorial para a investigação de mucopolissacaridoses

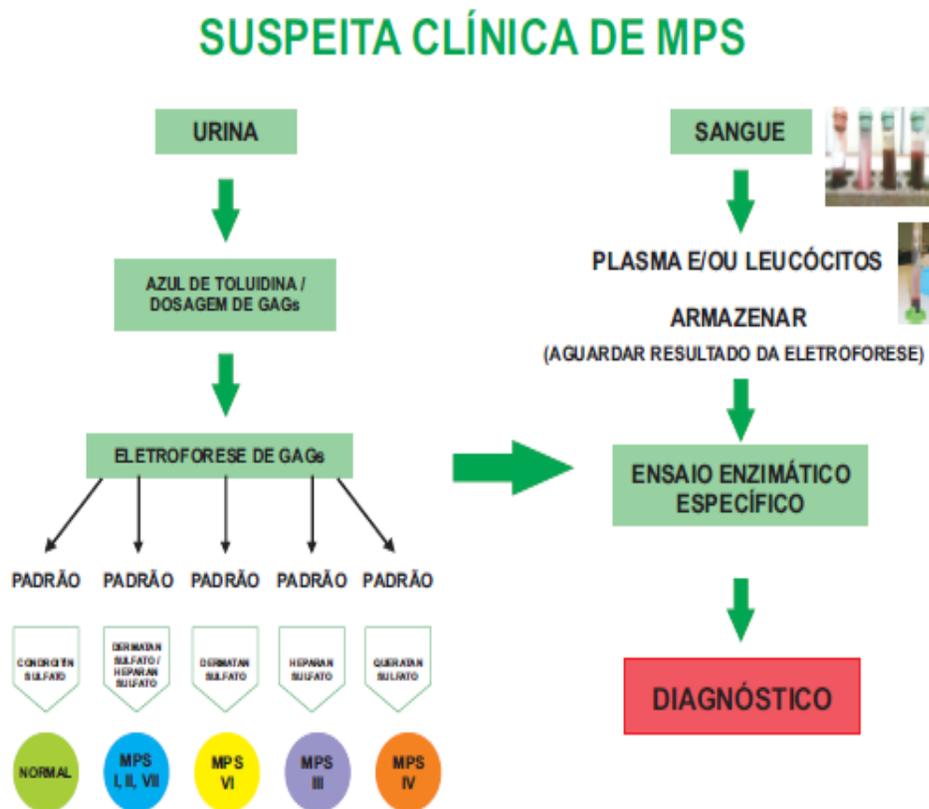


Figura 6 - Protocolo de investigação laboratorial para o diagnóstico de mucopolissacaridose, utilizado no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

### 2.5.2 Diagnóstico pré-natal

No grupo dos erros inatos do metabolismo, no qual a maioria das doenças são autossômicas recessivas, a possibilidade de ter um novo filho afetado é quase sempre de 25%. No momento em que é feito o diagnóstico de uma criança com EIM, é recomendado realizar o aconselhamento genético com a finalidade de informar à família sobre os riscos de recorrência, o prognóstico, a gravidade da doença em estudo e a possibilidade de realização do diagnóstico pré-natal (DPN).

Para os casais que se sabem em risco de ter um filho afetado por uma MPS, o diagnóstico pré-natal (DPN) pode ser uma opção (embora a interrupção da gestação não seja prevista na legislação brasileira), pois ajuda a reduzir a ansiedade associada à gestação, principalmente nas situações onde o prognóstico é grave e não há a possibilidade de um tratamento eficaz.

O DPN é possível para todos os tipos de MPS. Pode-se realizar o DPN em diferentes tipos de amostras, tais como:

1) vilosidades coriônicas, coletadas usualmente entre a 10<sup>a</sup> e 11<sup>a</sup> semana de gestação, e que permitem a análise direta do material num período mais precoce da gestação;

2) líquido amniótico, que é geralmente coletado entre a 14<sup>a</sup> e 16<sup>a</sup> semana de gestação, e cuja análise requer o cultivo prévio das células, o qual leva em torno de 2 semanas;

3) sangue fetal, que é coletado do cordão umbilical a partir da 20<sup>a</sup> semana de gestação.

O diagnóstico pré-natal é geralmente realizado pelo ensaio enzimático relacionado com a MPS específica, mas também pode ser realizado pela pesquisa molecular da mutação, quando esta já é conhecida na família.

### 2.5.3 Estratégias de prevenção dos erros inatos do metabolismo

Diversas estratégias podem contribuir para a prevenção do quadro clínico, do nascimento e mesmo da concepção de pacientes com erros inatos do metabolismo (EIM). Uma vez que não existe um tratamento curativo para as MPS, é importante o aconselhamento genético e o diagnóstico pré - natal. No caso dos erros inatos, ambos só podem ser disponibilizados às famílias, a partir da detecção do caso-índice, o que implica a exigência de um diagnóstico preciso de cada situação, com o objetivo de evitar novos casos.

### 2.5.4 Detecção de portadores

A maioria dos EIM são herdados de forma autossômica recessiva (Beaudet et al, 1995), embora algumas doenças sejam transmitidas de forma recessiva ligada ao X (por ex., doença de Hunter). A identificação de portadores pode ser importante para permitir um aconselhamento genético eficaz em famílias que apresentam um caso de EIM.

Diferentes métodos laboratoriais podem ser empregados para a identificação de portadores:

#### 2.5.4.1 Diagnóstico enzimático

É feito pela detecção da atividade enzimática, geralmente intermediária entre aquela de indivíduos normais e afetados. O ensaio pode ser realizado em diferentes amostras (plasma, leucócitos ou fibroblastos) e sua sensibilidade e especificidade variam de acordo com a doença, população estudada, a amostra analisada e o

substrato utilizado.

#### 2.5.4.2 Diagnóstico molecular

O estudo envolve a pesquisa da mutação gênica específica, quando esta é conhecida na família. O gene para a N-acetilgalactosamina-6-sulfatase, deficiente na doença de Morquio tipo A, tem sido clonado e seqüenciado a partir da placenta humana e localizado no locus 16q24.3 (Baker et al, 1993 e Masuno et al, 1993).

#### 2.5.5 Diagnóstico de mucopolissacaridose tipo IVA

Embora o padrão-ouro para o diagnóstico da MPS IVA seja a medida da atividade enzimática em leucócitos ou cultura de fibroblastos, que se supõe deficiente, as análises de GAGs na urina, juntamente com os achados clínicos, são extremamente importantes no início da investigação. A presença de queratan sulfato na eletroforese ou o aumento na concentração de GAGs na dosagem destes , direciona a investigação laboratorial para a MPS tipo IV.

O diagnóstico se inicia pela suspeita clínica e laboratorialmente, através dos testes de triagem em amostra de urina, através da análise quantitativa (dosagem de GAGs) e qualitativa (eletroforese de GAGs). Nos casos em que um padrão de queratan sulfato é detectado, faz-se os ensaios enzimáticos da  $\beta$ -galactosidase e da N-acetilgalactosamina-6-sulfatase ou galactose-6-sulfato sulfatase simultaneamente.

O diagnóstico definitivo da MPS IVA se estabelece através da medida da atividade da enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatase em leucócitos ou fibroblastos, onde se constata a sua deficiência.

Algumas considerações em relação aos testes de triagem são importantes de serem mencionadas no diagnóstico da MPS tipo IVA (Morquio A):

A possibilidade de não se detectar a MPS tipo IV, pela análise dos GAGs urinários, pela excreção de formas parcialmente degradadas do queratan sulfato ou pela excreção de quantidades relativamente menores que podem ocorrer, especialmente em pacientes com mais idade, que apresentam uma menor excreção deste glicosaminoglicano ou em casos leves de Morquio A, onde a excreção de queratan sulfato pode ser atípica (Kircher et al, 2007).

O diagnóstico precoce é importante para definir estratégias terapêuticas a seguir, especialmente no momento em que estudos clínicos estão sendo realizados para o tratamento através da enzima de substituição de GALNS (N-acetylgalactosamina-6-sulfatase).

## **2.6 TRATAMENTO**

Até o momento não existe a cura para as MPS e o tratamento dos sintomas deve ser considerado em um primeiro momento. Existem diversas recomendações para o tratamento dos sintomas das MPS, que possuem uma variabilidade enorme no que se refere à gravidade, início dos sintomas e progressão da doença. O tratamento dos sintomas deve ser monitorado caso a caso e envolve principalmente medidas que corrijam ou minimizem o envolvimento esquelético, neurológico, respiratório e cardíaco dessas doenças, necessitando uma equipe multidisciplinar (Kircher et al, 2007).

O atendimento aos pacientes com MPS deve ser feito por equipe multidisciplinar, visando o manejo das complicações associadas. O paciente deve ser avaliado periodicamente, e o acompanhamento médico tem como objetivo fornecer a melhor qualidade de vida possível ao paciente e à sua família (Haddad et al, 1997 e Wraith et al, 1996).

Atualmente, além da terapia de reposição enzimática para os tipos I, II e VI, o tratamento a ser oferecido é essencialmente paliativo e sintomático.

Alguns aspectos devem ser considerados no manejo dos pacientes:

- **Fisioterapia motora:** Esse tipo de tratamento pode auxiliar na manutenção da função articular (Haddad et al, 1997; Neufeld e Muenzer, 2001).

- **Complicações respiratórias:** História de apnéia do sono deve sempre ser investigada. Adenoidectomia pode ser realizada no intuito de aliviar a obstrução das vias aéreas, podendo ser necessária oxigenioterapia (Wraith,1996).

- **Descompressão / Fusão cervical:** Embora controversa, a maioria dos autores refere que ela deve ser realizada profilaticamente nos pacientes com MPS IV, grupo onde a freqüência de mielopatia cervical é especialmente elevada (Stevens, 1991).

- **Riscos anestésicos:** As principais complicações associadas são: Dificuldade de intubação, necessidade de traqueostomia de urgência e parada cardíaca intra-operatória (Baines e Keneally, 1983). Portanto, recomenda-se que os procedimentos cirúrgicos indicados sejam de extrema necessidade e sejam realizados em hospitais que possuam unidades adequadas de tratamento intensivo, e com anestesistas especializados na manutenção de via aérea pediátrica. Em relação às indicações de cirurgia, não devem ser realizados procedimentos cosméticos ou menores em pacientes gravemente afetados, a não ser que sob anestesia local (Wraith, 1996).

- **Outras alternativas de tratamento:** O uso de plasmaferese e/ ou o transplante de fibroblastos não se mostraram eficientes no tratamento das MPS. Já o transplante de medula óssea (TMO), apesar dos riscos, pode ser uma opção em casos selecionados (Krivit et al,1989). O TMO é um procedimento associado a uma alta taxa de mortalidade, entretanto, sua indicação em pacientes com MPS I-H em idade precoce (geralmente até os 2 anos) e com QI>70, desde que haja doador HLA-compatível, parece ser consenso na literatura (Vellodi et al, 1997; Peters et al, 1998 e Schwartz et al, 2001).

A terapia de reposição enzimática (TRE) é o tratamento específico, hoje disponível para as MPS I, II e VI, através do qual se repõe através de infusões regulares a enzima deficiente respectiva. A TRE não é eficiente para tratar os sintomas neurológicos das MPS, uma vez que a enzima administrada endovenosamente não atravessa a barreira hematoencefálica. Outra dificuldade é tratar os danos esqueléticos, já que as lesões ósseas são precoces e aparentemente irreversíveis. Ainda não há TRE disponível para os tipos III, IV e VII, mas existem avanços nesse sentido e esse cenário

poderá mudar nos próximos anos.

A terapia gênica (TG), um procedimento que se encontra no estágio experimental, representa uma importante perspectiva em termos de tratamento das MPS. O princípio básico desse tratamento é a transferência de material genético (seqüências de DNA) de outros organismos, para dentro das células de um indivíduo, com o objetivo de conferir um benefício terapêutico, usualmente com o uso de vetores.

#### 2.6.1 Tratamento para a MPS IV A

Para a MPS IVA, o tratamento disponível hoje é essencialmente paliativo e sintomático. O transplante de medula óssea pode ser uma alternativa. Apesar de não haver melhora das alterações esqueléticas, a rigidez articular é diminuída e o comprometimento visceral melhora. A terapia de reposição enzimática para a MPS IVA está em desenvolvimento clínico, com perspectivas de aprovação para os próximos 2 ou 3 anos ([www.bmnr.com](http://www.bmnr.com) e Schiffmann, 2002).

### 3 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Amostras de sangue impregnado em papel filtro (SIPF) têm sido utilizadas em nosso laboratório para triagem de várias doenças lisossômicas de depósito, incluindo algumas que dispõem atualmente de tratamento através da TRE, como as Mucopolissacaridoses tipo I, II e VI, e outras que ainda não tem tratamento disponível, como as MPS IIIB e VII.

Julgamos importante padronizar e tornar disponível uma nova técnica que mede a atividade enzimática da N-acetilgalactosamina-6-sulfatase (enzima deficiente na MPS tipo IVA) em amostras de SIPF no momento em que a terapia de reposição enzimática para a MPS IVA está em desenvolvimento clínico. A possibilidade de um diagnóstico mais precoce, através de técnicas mais simples e com material de mais fácil coleta e transporte como o papel filtro, permitirá ainda o diagnóstico dos pacientes das regiões mais remotas.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GERAL**

O objetivo principal deste projeto foi padronizar e validar um novo método fluorimétrico que mede a atividade enzimática da N-acetilgalactosamina-6-sulfatase (enzima deficiente na MPS tipo IVA), em amostras de sangue impregnado em papel filtro (SIPF).

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a) Correlacionar os resultados obtidos na análise em SIPF com os resultados obtidos em leucócitos (padrão-ouro);
- b) Estabelecer os valores de referência para o método que utiliza amostras de SIPF;
- c) Verificar a estabilidade das amostras de SIPF para o ensaio enzimático da N-acetilgalactosamina-6-sulfatase, quando as mesmas são submetidas a variações de tempo e temperatura de armazenamento.

## **5 METODOLOGIA**

### **5.1 AMOSTRA ESTUDADA**

Para o presente estudo, foram coletadas amostras de sangue total para obtenção de sangue impregnado em papel filtro e extração de leucócitos. O grupo controle foi constituído de amostras de 54 indivíduos saudáveis (18-50 anos), de ambos os sexos. O grupo dos pacientes foi constituído pelas amostras de 35 pacientes, com diagnóstico de mucopolissacaridose IVA, previamente confirmado pela metodologia convencional, em leucócitos. A amostra foi de conveniência, por se tratar de doença rara. A faixa etária destes pacientes variou de 3 a 47 anos, de ambos os sexos.

### **5.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO**

Estudo de caso-controle, que teve como principal objetivo a padronização e a comparação de técnicas de diagnóstico de mucopolissacaridose tipo IVA. Neste estudo foram realizados ensaios enzimáticos em amostras de leucócitos e SIPF de pacientes com diagnóstico de MPS IVA e controles normais.

### **5.3 POPULAÇÃO EM ESTUDO**

Critérios de inclusão:

Para ser incluído no estudo, o paciente deveria atender a todos os critérios abaixo relacionados:

- Possuir diagnóstico bioquímico de mucopolissacaridose tipo IVA;

- Ter comparecido no Serviço de Genética Médica do HCPA, para consulta e coleta de amostra de sangue para a realização dos ensaios enzimáticos, entre setembro de 2009 e dezembro de 2010.

- Concordar em participar do estudo mediante assinatura do Termo de Consentimento Informado (TCI).

#### **5.4 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA**

Dos 35 pacientes incluídos (média de idade =  $3,0 \pm 47,0$  anos), 18 eram do sexo masculino e 17 do sexo feminino, procedentes de vários estados do Brasil.

As amostras dos indivíduos controles (n= 54), média de idade =  $18,0 \pm 50,0$  anos), foram constituídas por doadores voluntários do Serviço de genética Médica.

#### **5.5 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS**

Os pacientes foram contactados e devidamente informados sobre o presente estudo. Todos aceitaram participar do estudo e assinaram o termo de consentimento informado (TCI). Os indivíduos controles foram informados sobre o projeto e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Foram coletados, de 8 a 10 ml de sangue periférico de todos os pacientes e controles. O sangue total foi utilizado para a impregnação em papel filtro. Após a obtenção do papel filtro, o sangue foi transferido para um tubo contendo heparina para a extração dos leucócitos.

## 5.6 DESCRIÇÃO DAS TÉCNICAS UTILIZADAS

### 5.6.1 Separação de leucócitos

Os leucócitos foram isolados de sangue heparinizado de acordo com o método descrito por Skoog e Beck (1956), que consiste em transferir 10 ml de sangue total para um tubo de vidro grande e adição de 10 ml de uma solução composta pela mistura dos seguintes reagentes: solução de ácido cítrico-citrato-dextrose (ACD), dextran 6% (PM = 229.000) e glicose 5%, preparados em cloreto de sódio 0,9% (1.5: 5: 3.5, v/v). Após misturar suavemente por inversão a amostra e a solução, essa mistura foi deixada à temperatura ambiente, até a completa sedimentação dos eritrócitos (aproximadamente 1 hora, sendo o tempo máximo de até 2 horas). O sobrenadante foi transferido para um tubo cônico de plástico e centrifugado a 2000 rpm por 10 min a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado, contendo os leucócitos foi lavado com 0,8 ml de solução de cloreto de sódio 0,9 %, homogeneizando em agitador tipo vórtex. Foram adicionados 2,4 ml de água destilada gelada e novamente homogeneizado em vórtex e aguardado 90 segundos. Foi adicionado 0,8 ml de cloreto de sódio 3,6 %, misturado por inversão e centrifugado a 3000 rpm por 3 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet de leucócitos foi armazenado a -20°C até o momento das análises enzimáticas.

### 5.6.2 Preparação das amostras para a dosagem de proteína

No momento da análise, o precipitado (pellet de leucócitos), foi diluído em água destilada, num volume que variou de 300µl a 500 µl, conforme o tamanho dos pellets e as amostras foram sonicadas em Sonicador Ultrassônico marca MISONIX, por 2 ciclos de 25 segundos, intercalados por um período de descanso de 30 segundos, a fim de

assegurar o rompimento das membranas celulares e a conseqüente liberação do material celular contido no interior dos lisossomos. Durante todo o procedimento, as amostras foram mantidas em recipiente com gelo para manter a estabilidade da atividade enzimática.

### 5.6.3 Dosagem de proteína nas amostras de leucócitos

Para a dosagem de proteína nas amostras de leucócitos, utilizamos o método descrito por Lowry, et al (1951). As amostras foram diluídas em água destilada (20µl de amostra e 480 µl de água destilada). Foram adicionados, sob agitação em vórtex, 1,5 ml de reativo alcalino de cobre em todos os tubos, inclusive na curva-padrão de albumina. Após 10 minutos de repouso a temperatura ambiente, foram adicionados, sob agitação em vórtex, 150µl de reativo de Folin - Ciocalteau diluído (1 ml de Folin + 1,4 ml de água destilada) em todos os tubos, inclusive na curva e, após 30 minutos à temperatura ambiente, a cor desenvolveu-se, sendo possível detectar a quantidade de proteína presente na amostra, através de uma medida espectrofotométrica em um comprimento de onda de 750 nm, usando como padrão uma curva preparada com albumina bovina a 0,02%, com concentrações de 20, 40, 60, 80 e 100.

O cálculo foi realizado a partir da curva-padrão de albumina e os resultados expressos em µg /100 µl. Este procedimento foi realizado à temperatura ambiente.

## 5.6.4 Ensaio enzimáticos

### 5.6.4.1 Ensaio em leucócitos

#### 5.6.4.1.1 Galactose-6-sulfato sulfatase

Para o ensaio da Galactose-6-sulfato sulfatase (G6SS), em leucócitos, nós utilizamos o método descrito por Van Diggelen et al (1990) e por Tylki-Szymanska et al (1998). O substrato 4-metilumbeliferil- $\beta$ -galactosideo-6-sulfato (Moscerdam), foi diluído em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 4.3, numa proporção de 5,2 mg / ml de tampão. O mesmo foi armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . No ensaio enzimático, as amostras de leucócitos foram diluídas em BSA 0,2 %, para uma concentração de proteína de 10  $\mu\text{g}$ . Na primeira etapa de reação, 20 $\mu\text{l}$  da amostra diluída foi incubada com 40  $\mu\text{l}$  do substrato, por 17 horas em banho a  $37^{\circ}\text{C}$ , com agitação suave. Após este período, foi adicionado 10  $\mu\text{l}$  de tampão fosfato de sódio 0,9M, pH 4,3 e 20  $\mu\text{l}$  de enzima exógena  $\beta$ -galactosídio galactohidrolase (Sigma) e as amostras foram incubadas numa segunda etapa de reação por um período de 2 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ , com agitação suave. Após incubação, a reação foi interrompida com a adição de 400 $\mu\text{l}$  de tampão carbonato / bicarbonato de sódio pH 10,7. A fluorescência (excitação,365nm; emissão,450nm) foi medida no espectrofluorímetro Hitachi, modelo F2000. A atividade enzimática foi expressa em nmol /17horas / mg de proteína.

**Princípio do método:** A atividade desta enzima lisossômica é medida em pH ácido, em leucócitos, fibroblastos, amniócitos ou vilosidades coriônicas (exame direto e células cultivadas). Utiliza-se um substrato artificial fluorogênico que é degradado pela enzima, com liberação da fração fluorescente (metilumbeliferona). Esta atividade é medida contra uma curva padrão de metilumbeliferona e a atividade específica é expressa em nmol / 17h / mg de proteína.

#### 5.6.4.1.2 B-Galactosidase

Nós utilizamos o método descrito por Suzuki, K. (1977).

Para o ensaio enzimático da  $\beta$ -galactosidase em leucócitos, (enzima de referência), as amostras foram diluídas em cloreto de sódio 0,9 % para uma concentração de proteína da amostra de 15 a 30  $\mu$ g. O substrato 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-galactosídeo (Sigma) foi diluído em tampão citrato-fosfato pH 4, numa proporção de 1 mg / 1,5 ml, que foi dissolvido através de aquecimento. No ensaio, foi utilizado um volume de 100 $\mu$ l de amostra diluída e 200  $\mu$ l de substrato, em tubos de vidro 12x75, que foram incubados por 1 hora, a 37°C, com agitação suave. Após este período, a reação foi interrompida pela adição de 3 ml de tampão glicina-NaOH, pH 10,3. A fluorescência (excitação, 365nm; emissão, 450nm) foi medida no espectrofluorímetro Hitachi, modelo F2000. A atividade enzimática foi expressa em nmol / h / mg de proteína.

#### 5.6.4.2 Ensaio enzimático em papel filtro

As amostras de SIPF foram obtidas de sangue total, utilizando-se papel Whatman nº 903, seguindo-se as normas de coleta da National Committee for Clinical Laboratory Standard, (NCCLS, 2003). As amostras coletadas em papel filtro foram secas à temperatura ambiente, por um período de 10 a 14 horas, em superfície plana, não absorvente. Depois de secas, as mesmas foram acondicionadas em sacos plásticos, com dessecante (sílica) e armazenadas a 4°C até o momento da análise.

#### 5.6.4.2.1 Ensaio enzimático de galactose-6-sulfato sulfatase (SIPF)

Para o ensaio enzimático em SIPF, nós adaptamos o método descrito por Van Diggelen et al (1990) e Tylki-Szymanska et al (1998). No ensaio enzimático, nós utilizamos discos de 3.0 mm de diâmetro, obtidos com auxílio de perfurador, contendo SIPF (~ 3,6 µl de sangue total), em tubos tipo eppendorf de 500 µl. Para cada amostra, utilizamos 3 tubos, sendo dois para teste (ensaio em duplicata) e um branco. Após adição de líquido de eluição (20 µl de água destilada), as amostras foram incubadas com 40 µl de substrato 4-MU-β-galactosídio-6-sulfato (Moscerdam), preparado conforme descrito para a técnica em leucócitos. Foram adicionados 400 µl de tampão carbonato / bicarbonato de sódio pH 10,7 (de parada), aos tubos brancos, antes do substrato. Esta primeira etapa de reação foi de 48 horas, a 37°C, com agitação suave. Os tubos foram vedados com parafilm para evitar a evaporação. Após esta primeira etapa de reação, foram adicionados 10 µl de tampão fosfato de sódio pH 4,3 e 20 µl de enzima exógena β-galactosídio galactohidrolase (Sigma) em todos os tubos e as amostras foram incubadas numa segunda etapa de reação por 6 horas, a 37°C, com agitação suave. Após este período, a reação foi interrompida pela adição de 400 µl de tampão carbonato / bicarbonato de sódio pH 10,7 aos tubos testes. As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 min à temperatura ambiente. A fluorescência (excitação, 365 nm; emissão, 450 nm) foi medida no sobrenadante, em um espectrofluorímetro Hitachi, modelo F2000.

A atividade enzimática foi calculada em nmol / 48 h / ml.

#### 5.6.4.2.2 Ensaio enzimático da β-galactosidase em SIPF (enzima de referência)

A medida da atividade da enzima β-galactosidase foi realizada para a avaliação da integridade das amostras em SIPF.

Para este ensaio, nós utilizamos o método descrito por Civallero et al, 2006. No ensaio foram utilizados discos de 3.0 mm de diâmetro, contendo SIPF (~ 3,6 µl de sangue total), em tubo tipo eppendorf de 1,5 ml. Após a adição de 80 µl de tampão citrato-fosfato pH 4,4, 0,05 M (líquido de diluição), foram adicionados 40 µl de substrato 4-metilumbeliferil-β-D-galactosídeo, 0,8 M /L, que foi preparado pela diluição de 1 mg do substrato em 3,7 ml de água destilada, utilizando-se aquecimento para a dissolução completa. Após homogeneização, as amostras foram incubadas a 37°C, por 3 horas, com agitação suave. Antes da adição do substrato, foram adicionados 600 µl de tampão glicina-NAOH, 0,085 M, pH 10,5 aos tubos brancos.

Após o período de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 600 µl de tampão glicina-NAOH 0,085 M/L aos testes. As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm, por 10 minutos a 4°C.

A fluorescência (excitação, 365nm; emissão, 450nm) foi medida no sobrenadante, no espectrofluorômetro Hitachi, modelo F2000.

A atividade enzimática foi calculada em nmol /h/ ml.

Em todos os ensaios enzimáticos as leituras foram corrigidas pelos brancos e comparadas com calibradores de 4-metilumbeliferona.

#### 5.6.5 Termoestabilidade

Para avaliar a estabilidade das amostras de SIPF para o diagnóstico de MPS tipo IVA, nós utilizamos amostras de papel filtro de 3 controles e 2 pacientes, coletadas no mesmo dia. Após a secagem das amostras, por um período de 10 a 14 horas, foi realizado o ensaio enzimático de GALNS, cujo resultado foi considerado como 100% de atividade enzimática (tempo zero). Então, as amostras foram armazenadas em diferentes temperaturas (4°C, 22°C e 37°C). Nós avaliamos a atividade enzimática após 7, 14 e 30 dias.

## 5.7 PARÂMETROS AVALIADOS

Neste estudo avaliou-se a capacidade de identificar pacientes com MPS IVA, através de um novo método, utilizando amostras de SIPF. Para esta finalidade foram avaliados:

a) A especificidade e sensibilidade do novo método, comparando-se os resultados obtidos nas amostras de pacientes com diagnóstico previamente estabelecido com os resultados dos controles.

b) Os resultados obtidos nas amostras de leucócitos (padrão ouro) com os obtidos no novo método, em SIPF.

c) A estabilidade das amostras de SIPF, quando estas foram submetidas a diferentes tempos e temperaturas de armazenamento, para a realização do ensaio de galactose-6-sulfato sulfatase.

Todas as amostras foram analisadas em paralelo (leucócitos e SIPF), dos controles e pacientes e todos os ensaios foram realizados em duplicata.

## 5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste não paramétrico Mann-Whitney U foi usado para medir a diferença entre os grupos controles e pacientes em todos os ensaios.

A curva ROC foi usada para calcular os valores específicos de cut-off para os controles adultos e pacientes e também para avaliar a sensibilidade e especificidade associada ao uso do novo método em SIPF. Todas análises foram feitas com auxílio do programa estatístico SPSS em um computador PC compatível e foi considerado significativo um  $p < 0,05$ .

## 5.9 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – Projeto 09-348 (anexo A).

Os indivíduos controles negativos foram devidamente informados sobre o projeto e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) desenvolvido para este fim (anexo B).

Os pacientes, cujas amostras foram coletadas, assinaram o termo de consentimento informado (TCI) desenvolvido pela rede MPS Brasil. Este projeto foi aprovado pelo CEP/HCPA sob número 03-066 “Mucopolissacaridoses no Brasil: Um estudo clínico, epidemiológico, bioquímico e molecular com impacto no diagnóstico, manejo e prevenção” (anexo C).

O uso das amostras dos controles positivos não gerou novas informações aos pacientes, pois elas foram utilizadas apenas para o desenvolvimento e aprimoramento das técnicas para a identificação de pacientes com MPS IVA.

## **6 DESENVOLVIMENTO**

### **6.1 A REALIZAÇÃO DA PESQUISA**

A realização da coleta de dados efetivou-se durante 13 meses (setembro / 2009 a outubro / 2010). As amostras dos controles foram coletadas em grupos de 5 ou 10 voluntários em cada etapa.

Os ensaios enzimáticos foram realizados logo após a coleta das amostras, com intervalo de aproximadamente uma semana entre as coletas e os ensaios, tempo suficiente para o preparo das amostras para os ensaios enzimáticos. Após a finalização dessa etapa, iniciou-se a análise estatística dos resultados obtidos e a elaboração do artigo e da dissertação.

## 7 ARTIGO EM INGLÊS

### **PRACTICAL AND RELIABLE ENZYME TEST FOR THE DETECTION OF MUCOPOLYSACCHARIDOSIS IVA (MORQUIO SYNDROME TYPE A) IN DRIED BLOOD SAMPLES**

Marli V. Camelier<sup>1 2</sup>, Maira G. Burin<sup>1</sup>, Jurema De Mari<sup>1</sup>, Taiane A. Vieira<sup>1 2</sup>,  
Giórgia Marasca<sup>1</sup>, Roberto Giugliani<sup>1 2 3 4 5</sup>

1Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil

2Postgraduate Program in Medicine – Medical Sciences, UFRGS, Porto Alegre, RS,  
Brazil.

3Postgraduate Program in Genetics and Molecular Biology, UFRGS, Porto Alegre, RS,  
Brazil.

4Department of Genetics, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

5INAGEMP – National Institute of Population Medical Genetics, Porto Alegre, RS, Brazil

Corresponding author:

Prof. Roberto Giugliani, MD, PhD

Medical Genetics Service

Hospital de Clinicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350

90035-903 – Porto Alegre – RS

Brazil

Tel + 5551 33598011

Fax + 5551 33598010

Email [rgiugliani@hcpa.ufrgs.br](mailto:rgiugliani@hcpa.ufrgs.br)

Key Words: Mucopolysaccharidosis IVA, Morquio Syndrome, Lysosomal Storage Diseases, Glycosaminoglycans, Dried Blood Spots, Screening.

## ABSTRACT

**Background:** Mucopolysaccharidosis IVA (MPS IVA), or Morquio Syndrome type A, is an autosomal recessive disease caused by deficiency of the lysosomal enzyme Nacetylgalactosamine-6-sulfatase (GALNS), resulting in excessive lysosomal storage of keratan sulfate in many tissues and organs. This accumulation causes a severe skeletal dysplasia with short stature, and affects the eye, heart and other organs, with many signs and symptoms. Morquio A syndrome is estimated to occur in 1 in 200,000 to 300,000 live births. Clinical trials with enzyme replacement therapy for this disease are in progress, and it is probable that the treatment, when available, would be more effective if started early. We describe on this paper an innovative fluorometric method for the assay of GALNS in dried blood spots (DBS). **Materials and Methods:** We used dried blood spots (DBS) as the enzyme source and compared it with leukocytes samples, having studied 25 MPS IVA patients and 54 healthy controls. We optimized the assay conditions, including incubation time and stability of DBS samples. To eppendorf type tubes containing a 3-mm diameter blood spot we added elution liquid and substrate solution. After two different incubations at 37°C, the amount of hydrolyzed product was compared with a calibrator to allow the quantification of the enzyme activity. Results in DBS were compared to the ones obtained in leukocytes using the standard technique. **Results and conclusion:** The described fluorescent methodology was validated in our laboratory and the assay was found sensitive and specific, allowing reliable detection of MPS IVA patients. The use of DBS simplifies the collection and transport steps, and is especially useful for testing patients from more remote areas of large countries, and when samples need to cross country borders. We believe this assay could be easily incorporated into the protocol of reference laboratories and play a role in the screening for MPS IVA, contributing to earlier detection of affected patients.

## INTRODUCTION

Morquio disease type A or mucopolysaccharidosis IVA (MPS IVA) is an autosomal recessive disorder caused by an intralysosomal defect which affects the degradation of keratan sulfate [1,2]. This glycosaminoglycan is formed by N-acetylglucosamine (or acetylgalactosamine) and galactose, and is an essential component of cartilage and cornea.

At least two enzymes contribute to the degradation of keratan sulfate: galactose-6-sulfate sulfatase (GALNS, which is deficient in MPS IVA) and  $\beta$ -galactosidase (which is deficient in MPS IVB) [1-4]. Although the short stature and progressive skeletal dysplasia are usually more marked on MPS IVA, it is not possible to differentiate MPS IVA from MPS IVB just by clinical data, these disorders being examples of diseases in which the same phenotype is caused by different enzyme defects [4,5].

MPS IVA is clinically characterized by multisystem involvement, affecting mainly the skeletal, cardiopulmonary and visual systems, with short stature, corneal clouding, dysostosis multiplex, joint contractures and tooth enamel defect, among other signs and symptoms. The cognitive and mental developments are normal. The symptoms usually become apparent by the end of the first or second years of life, with a progressive decrease of growth velocity. The patient usually reaches a final stature between 113 and 122 cm, presenting kyphosis, pectus carinatum, kyphoscoliosis and characteristic facies [2-9].

The initial investigation of MPS can be done by the analysis of urinary GAGs, including the measurement of total GAGs, which is increased in almost all MPS patients, and the identification of the types of GAGs excreted (usually by electrophoresis or thin-layer chromatography). These preliminary investigations help to focus the investigation to a few specific types. In the case of MPS IVA, the unusual GAG component which is mainly increased is keratan sulfate. The definitive diagnosis of MPS IVA is then established by the measurement of GALNS activity using leukocytes or cultured fibroblasts, usually by a fluorimetric method [10].

The need of whole blood samples to extract leukocytes, although more convenient than collecting a skin biopsy to obtain fibroblasts, demands that the sample reacts in the laboratory in a relatively short time after the collection (Burin et al. 2000) [11]. This complicates the use of leukocytes in large countries, in regions with deficient transport systems, and especially when samples have to cross international borders, due to customs and sanitary restrictions.

The use of dried blood samples (DBS) collected on filter paper could be an alternative as a screening method, and is already being used for the detection of several lysosomal diseases, including MPS I, II, IIIB, IVB, VI and VII (Chamoles et al [12]; Civallero et al [13]). Although the use of DBS facilitates sample collection and transportations, especially when large distances are involved and/or borders should be crossed, the confirmation of an abnormal result in leukocytes or fibroblasts is still recommended.

The fact that a specific treatment for MPS IVA is in clinical development – a protocol with intravenous enzyme replacement therapy is already in phase III ([www.bmrn.com](http://www.bmrn.com)) – makes it more important to have available, simple and easy technique for the detection of the enzyme deficiency in a convenient sample.

## MATERIAL AND METHODS

All participants/guardians signed informed consent forms approved by the Institutional Review Board. Leukocytes and dried blood samples (DBS) were obtained from 54 healthy individuals (18-50 years old) and from 25 patients (3-47 years old) with mucopolysaccharidosis type IVA whose diagnosis was previously confirmed in leukocytes through the method described by Van Diggelen et al [10]. The DBS samples were prepared using Whatman paper # 903, according to the requirements of the National Committee for Clinical Laboratory Standards protocol (NCCLS).[14], and were stored at 4°C until the analyses were performed.

Leukocytes were separated from heparinized blood according to the method described by Skoog et al. [15], and stored at -20° C until the analysis. The leukocyte samples were diluted in distilled water and were sonified in Ultrasonic Sonicator Processor MISONIX label. The Lowry method was used for the measuring proteins in leukocyte samples [16]. To validate the method, we carried out a simultaneous GALNS assay in leukocytes and DBS. For GALNS measurement in leukocytes, we used the method described by Van Diggelen et al. [10] and by Tyłki-Szymanska et al[ 17], with 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-galactoside-6-sulphate (MU- $\beta$ Gal-6S, Moscerdam, Rotherdam) as substrate. The 20 $\mu$ l leukocyte homogenate (10 $\mu$ g protein) was incubated at 37°C with the substrate and dilution buffer for 17h in the first incubation and for 2h in the second incubation, when exogenous  $\beta$ -galactosidase galactohydrolase was added (Table 1). For blanks, bovine serum albumin (BSA) 0.2% was used instead of sample. After the whole reaction, fluorescence (excitation, 365 nm; emission 450 nm) was measured on a Hitachi spectrofluorometer, model F2000. Readings were corrected for blanks and compared with 4-methylumbelliferone calibrators. Enzyme activity was calculated as nanomoles of substrate hydrolyzed per 17 h/mg of protein. For the assay on DBS, we adapted the same method described by Van Diggelen et al. and by Tyłki-Szymanska et al. [10,17]. DBS were collected and dried following standard procedures. A single 3.0-mm diameter disk containing dried blood samples (~3.6  $\mu$ l whole blood) was incubated

at 37°C for 48 h with appropriate artificial substrates and dilution buffer in the first incubation, and for 6h in the second incubation, as already described above for leukocytes (details in Table 1). Stopping buffer was added to the blanks before substrate. After incubation, the samples were centrifuged at 1500  $xg$  for 10 min at room temperature. Fluorescence (excitation, 365 nm; emission, 450 nm) was measured in the supernatant on a Hitachi spectrofluorometer, model F2000. Readings were performed using the same parameters as for leukocytes assay, and the enzyme activity was calculated as nanomoles of substrate hydrolyzed per 48h/ml of blood (3.6 $\mu$ l of blood per punch of DBS sample is assumed).

The stability of DBS was evaluated in several storage conditions (temperature and days of storage), in samples collected from 2 patients and 3 controls. After drying overnight at room temperature (22°C), the measured activity of GALNS was performed and considered 100%. Additional spots of the same sample were assayed after storage at 4°C, 22°C and 37°C for 7, 14 and 30 days.

The intra-assay CVs of GALNS in DBS was calculated by the duplicate measurement of the enzyme in all patients (n=25) and controls (n= 54). The inter-assay variation coefficient was calculated by measurement of the enzyme activity of 3 control DBS samples in three different assays carried out on the same day (all tests performed in duplicate). The non-parametric Mann-Whitney *U* test was used to measure the differences between controls and patients. A  $p < 0.05$  was considered to be significant. Receiver operating characteristic (ROC) curves were used to calculate specific cut-off values for adult controls and patients (table 2). The Bonferroni test for multiple comparisons was used to measure the differences for the stability study. All analyses were performed using the Statistical Program Social Sciences (Chicago, IL).

## RESULTS AND DISCUSSION

The main adaptation of the leukocytes method described by Van Diggelen et al. [10] for the assay on DBS was the increase of the incubation times: 31 h more for the first incubation (total of 48h) and 4 h more for the second incubation (total of 6h).

Table 2 shows GALNS activity in leukocytes and in DBS samples. In all patients with MPS IVA we could detect the enzyme deficiency in leukocytes and in DBS samples. A statistically significant difference was observed in GALNS activity between control and MPS IVA patient groups in both samples (Figure 1).

The intra-assay variation coefficient of controls (n=54) and patients (n=25) in DBS samples was  $\leq 12\%$ . The inter-assay variation coefficient on the DBS samples analyses in 3 different assays was  $\leq 13\%$ .

The stability tests showed that, when the sample was kept at 4°C, the activity was between 97 and 100 % of initial activity up to 30 days after collection. When maintained at room temperature (22°C), we observed an activity of 80% at day 7 (not statistically different if compared to reference value), 38% at day 14 and 2% at day 30 (both statistically different if compared to reference value). The samples stored at 37°C for 7, 14 and 30 days had an activity of 10%, 2% and 0%, respectively, close to the results obtained in fresh patient samples (Figure 2).

We observed a significative increase on the readings of blanks in the samples stored at 22°C (at 14 and 30 days), and in the samples stored at 37°C (at 7, 14 and 30 days). The Bonferroni test for the time stability evaluation showed variations from time 0 to 14 days and from 0 to 30 days ( $p=0.004$ ), with other variations related to storage time being not significant. Regarding temperature, a statistically significant difference was observed with all temperatures ( $p<0.005$ ). In the patients' samples, no effects of storage temperature and length of storage were observed as the activity was close to zero in all conditions.

These results indicate that DBS samples collected for the measurement of GALNS activity should be kept at 4°C whenever possible, being stable at this temperature for at least 30 days. Shipment on ice packs seems to be not strictly

necessary provided the sample arrives at the laboratory before 7 days after collection. In areas where high temperatures may occur, shipment in insulated packs, preferably with ice, should be considered. Another useful recommendation would be the simultaneous shipment of negative control samples. The information about collection date of the sample is critical and should be included.

A precaution should be taken for the measurement of enzyme activity, related to the blood concentration in filter paper, which is not always constant. This concentration depends mainly on the sample's collection procedures [13]. To minimize this variation it is recommended that a reference enzyme is measured in each sample, and we generally use  $\beta$  - galactosidase for this purpose (table 2) [13]. However, when a deficient activity of GALNS is found, the assay of another sulphatase would be advisable to rule out the possibility of multiple sulphatase deficiency.

A positive correlation occurs between the leukocyte count in blood and the degree of enzyme activity measured in DBS samples.[12].The decrease in enzyme activity related to a low leukocyte count could be easily identified by the simultaneous assay of several enzymes, with the observation of their ratios [12].

A DBS method was already proposed for the diagnosis of MPS IVA by Hopwood et al. [18], based in an indirect immunoquantification. Due to limited antibody availability, however, this method is not accessible for most diagnostic laboratories. Also, a DBS method was proposed by Khaliq et al [19], based on tandem mass spectrometry, but this technology is largely unavailable in most clinical laboratories.

In our hands, this method of GALNS in DBS samples allowed a practical and reliable enzyme test for the identification of MPS IVA patients. This work shows that DBS samples can be used for the detection of MPS IVA, with a method which could be easily incorporated into the protocol of reference laboratories, enabling easier identification of affected patients, especially in areas with difficulties for collection and transportation of liquid samples. This is especially important as the enzyme replacement therapy is being developed for MPS IVA, making specific and timely diagnosis of affected patients critical for introduction of appropriate therapy and for a better treatment outcome.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank Juarez Huve for the collection of blood samples from several affected patients and normal controls. We are also grateful to Regis Guidobono for helping us with some technical procedures, and to Dr. Anthony Fensom, who kindly reviewed the text. We wish to express our gratitude to FIPE/HCPA, FAURGS, UFRGS and to the MPS BRAZIL NETWORK for partially supporting this work.

## REFERENCES

- [1] Lipiello L, & Mankin HJ. Thin-layer chromatographic separation of the isomeric chondroitin sulfates, dermatan sulfate and keratan sulfate. *Anal. Biochem* 1977; 39:54 - 58.
- [2] Kircher SG, Bajbouj M, Miebach E, Beck M. Therapy. In: *Mucopolysaccharidoses – a guide for physicians and parents* (eds Kircher et al.) International Medical Publishers, London 2007;72 - 80.
- [3] Pennock CA. A review and selection of simple laboratory methods used for the study of glycosaminoglycan excretion and the diagnosis of the mucopolysaccharidoses. *J. Clin.*
- [4] Barth ML, Giugliani R, Gondenfum SL et al. Application of a flowchart for the detection of lysosomal storage diseases in 105 high-risk Brazilian patients. *American Journal of Medical Genetics* 1990; 37:534-538.
- [5] Schwartz I, Matte U, Leistner S, Giugliani R. Mucopolysaccharidoses. In: *Doenças Genéticas em Pediatria* (ed: Gerson Karakushansky) Guanabara Koogan, Rio de Janeiro 2001; 180-184.
- [6] Sanchez, MB, Fuentes FJR. Mucopolysaccharidosis. In: *Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias* (ed.: Sanjurjo P & Baldellou A.) Ergon. C/ Arboleda 1, 28220 Majadahonda (Madrid), 2006; 621-629.
- [7] Dangel, JH. Cardiovascular changes in children with mucopolysaccharide storage diseases and related disorders – clinical and echocardiographic findings in 64 patients. *European Journal of Pediatrics* 1998; 157:534-538.
- [8] Colombo MC, Cornejo, VE., Raimann, EB. Errores innatos en el metabolismo del niño. *Ed. Universitaria*. 2003; 8: 225 – 236
- [9] Neufeld EF, Muenzer J. The mucopolysaccharidoses. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, 8th edition, vol.II. New York, USA: McGraw – Hill 2001; 3421-3452.
- [10] Van Diggelen OP, Zhao H, Kleijer WJ, et al. A fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of Morquio disease type A. (MPS IV A). *Clin Chim Acta* 1990; 187: 131 - 140.
- [11] Burin M, Dutra C, Brum J, Mauricio T, Amorim M, Giugliani R. Effect of collection, transport, processing and storage of blood specimens on the activity of lysosomal enzymes in plasma and leukocytes. *Brazilian journal of Medical and Biological Research* 2000; 33: 1003 – 1013.

- [12] Chamoles NA, Blanco MB, Gaggioli D, Casentini C. Hurler – like phenotype: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. *Clin Chem* 2001; 47: 2098 – 102.
- [13] Civallero G, Michelin K, Mari J, Viapiana M, Burin M, Coelho JC, and Giugliani R. Twelve different enzyme assays on dried – blood filter paper samples for detection of patients with selected inherited lysosomal storage diseases. *Clinica Chimica Acta* 2006; 372: 98 – 102.
- [14] National Committee for Clinical Laboratory Standard. Blood Collection on Filter Paper for Newborn Screenings Program; Approved Standard-Fourth Edition. NCCLS document LA4-A4. Vilanova, Pa.: NCCLS,2003.
- [15] Skoog WA & BeckWS. Studies on the fibrinogen, dextran and phytohemagglutinin methods of isolating leukocytes. *Blood*, 1956;11: 436- 454.
- [16] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr A.L, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*,1951;193: 265 - 275.
- [17] Tyłki – Szymanska A, Czartoryska B, Bunge S, et al. Clinical, biochemical and molecular findings in a two – generation Morquio A family. *Clin. Genet* 1998; 53: 369 – 74
- [18] Hopwood JJ, Muller V, Lawrence E, Brooks D. N – acetylgalactosamine – 6 – sulfatase protein detection in MPS IV A patient and unaffected control samples. *Clin Chim Acta* 2007; 377: 88 – 91.
- [19] Khaliq T, Sadilek M, Scott RC, Turecek F, Gelb MH. Tandem Mass Spectrometry for the Direct Assay of Lysosomal Enzymes in Dried Blood Spots: Application to Screening Newborns for Mucopolysaccharidosis IVA. *Clin Chem*. 2011, Jan; 57(1): 128-31.

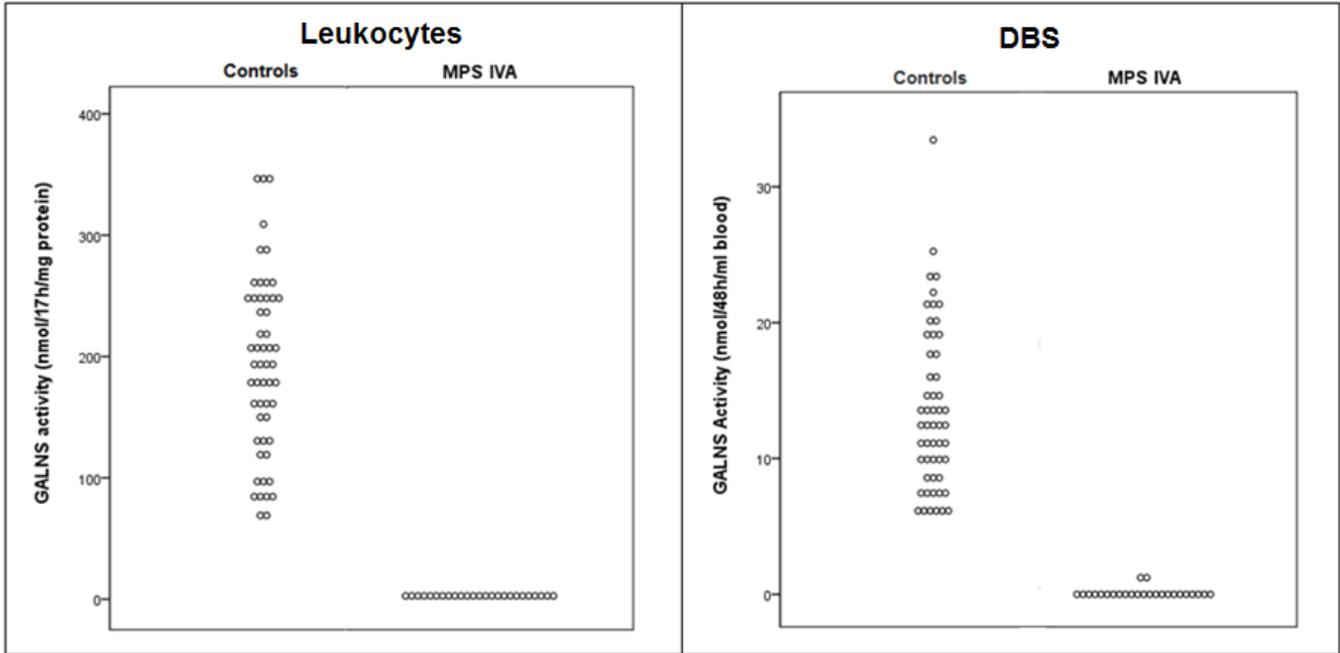
Table 1- Incubation conditions for the assay of N-acetylgalactosamine-6-sulfatase (leukocytes and DBS) and  $\beta$ -galactosidase (DBS).

Enzyme	Sample	Incubation I	Incubation II	Incubation time	Stop buffer
N-acetylgalactosamine-6-sulfatase	Leukocytes	20 $\mu$ l leukocytes (10 $\mu$ g protein) and 40 $\mu$ l, 10 mmol/l 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -galactoside-6-sulfate in 0.1 mol/l sodium acetate/0.1 mol/l acetic acid buffer with 0.02% sodium azide pH 4.3	10 $\mu$ l of 0.9 mol/l sodium phosphate buffer, pH 4.3, plus 0.02% sodium azide and 20 $\mu$ l $\beta$ -galactosidase galactohydrolase 10U	Inc I: 17 hours Inc II: 2 hours	400 $\mu$ l 0.5 mol/l sodium carbonate/ sodium bicarbonate, plus 0.025% triton X100, pH 10.7
N-acetylgalactosamine-6-sulfatase	DBS	3mm DBS, 20 $\mu$ l of distilled water and 40 $\mu$ l 10 mmol/l 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -galactoside-6-sulphate in 0.1 mol/l Na-acetate / 0.1 mol/l acetic acid buffer with 0.02% sodium azide pH 4.3	10 $\mu$ l of 0.9 mol/l sodium phosphate buffer, pH 4.3, plus 0.02% sodium azide and 20 $\mu$ l $\beta$ -galactosidase galactohydrolase 10U	Inc I: 48 hours Inc II: 6 hours	400 $\mu$ l 0.5 mol/l sodium carbonate/ sodium bicarbonate, plus 0.025% triton X100, pH 10.7
$\beta$ -galactosidase	DBS	3mm DBS, 80 $\mu$ l 0.05 mol/l citrate phosphate buffer, pH 4.4 in 45g/l NaCl and 40 $\mu$ l 0.8 mol/l 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-galactoside in distilled water	—	3 hours	600 $\mu$ l 0.085 mol/l glycine-NaOH, pH 10.5

Table 2 - N- acetyl-galactosamine-6-sulfatase and  $\beta$ -galactosidase (reference enzyme) activities on different samples.

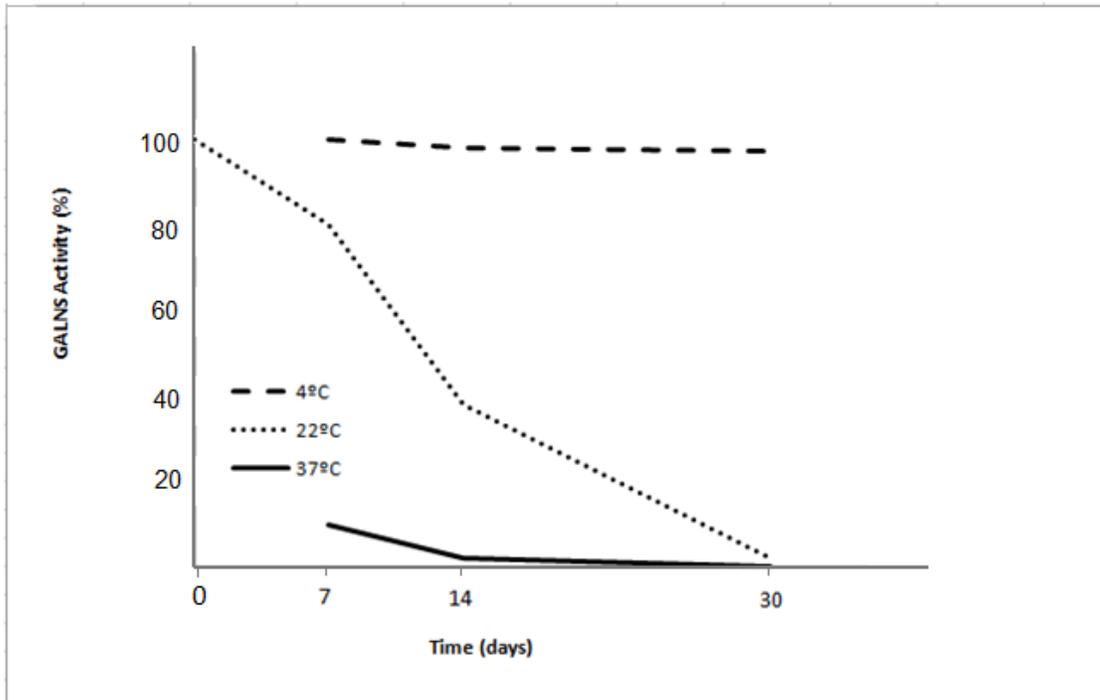
Method	n	Activities range (mean $\pm$ SD)	p	Cutt-off value
<b><u>N-acetylgalactosamine-6-sulfatase</u></b>				
<b><u>Leukocytes<sup>a</sup></u></b>				
MPS IVA patients	25	0.0 - 6.0 (1.03 $\pm$ 1.63)	< 0.001	37
Normal controls	54	68 -352 (192.7 $\pm$ 73.10)		
<b><u>DBS<sup>b</sup></u></b>				
MPS IVA patients	25	0 - 1.25 (0.10 $\pm$ 0.33).	< 0.001	3.5
Normal controls	54	5.75 -33.45 (13.64 $\pm$ 5.98).		
<b><u>B – galactosidase</u></b>				
<b><u>DBS<sup>c</sup></u></b>				
patients	25	20 -57 (36.25 $\pm$ 11.95).		
Normal controls	54	20 -66 (42.04 $\pm$ 11.27).		

Activities expressed as: (a) nmol /17h / mg protein; (b) nmol / 48h/ ml; (c) nmol / h/ ml



**Figure 1**

Activity of GALNS in patients and controls leukocytes and DBS samples.



**Figure 2**

Effects of temperature and length of storage on the activity of GALNS in DBS

## 8 ARTIGO EM PORTUGUÊS

### TESTE ENZIMÁTICO PRÁTICO E SEGURO PARA DETECÇÃO DE MUCOPOLISSACARIDOSE IVA (SÍNDROME DE MORQUIO TIPO A) EM AMOSTRAS DE SANGUE SECO

Marli V. Camelier<sup>1 2</sup>, Maira G. Burin<sup>1</sup>, Jurema De Mari<sup>1</sup>, Taiane A. Vieira<sup>1 2</sup>, Giórgia Marasca<sup>1</sup>, Roberto Giugliani<sup>1 2 3 4 5</sup>

<sup>1</sup> Serviço de Genética Médica – Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>2</sup> Programa de Pós – graduação em Medicina – Ciências Médicas, UFRGS. Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>3</sup> Programa de Pós – Graduação em Genética e Biologia Molecular, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>4</sup> Departamento de Genética, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>5</sup> INAGEMP-Instituto Nacional de Genética Médica Populacional, Porto Alegre, RS, Brasil

Autor correspondente:

Prof. Roberto Giugliani, MD, PhD

Serviço de Genética Médica

Hospital de Clinicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350

90035-903 – Porto Alegre – RS

Brasil

Tel 51 33598011

Fax 51 33598010

Email: rgiugliani@hcpa.ufrgs.br

Palavras-Chave: Mucopolissacaridose IVA, Síndrome de Morquio, Doença de Armazenamento Lisossômico, Glicosaminoglicanos, Sangue Impregnado em Papel Filtro, Triagem.

## RESUMO

**Introdução:** Mucopolissacaridose tipo IVA (MPS IVA) ou Síndrome de Morquio tipo IVA, é uma doença autossômica recessiva causada pela deficiência da enzima lisossomal N-acetilgalactosamina-6-sulfatase (GALNS), resultando no excesso de armazenamento lisossômico de queratan sulfato em muitos tecidos e órgãos. Este acúmulo causa uma severa displasia esquelética com baixa estatura e afeta os olhos, coração e outros órgãos, com sinais e sintomas variados. A síndrome de Morquio A tem uma incidência estimada entre 1: 200.000 a 1: 300.000 nascidos vivos. Testes clínicos com terapia de reposição enzimática para esta doença estão em progresso, e é provável que o tratamento, quando disponível, poderia ser mais eficiente se iniciado precocemente. Nós descrevemos um método fluorimétrico inovador para o ensaio da GALNS em sangue impregnado em papel filtro (SIPF).

**Métodos:** Nós usamos sangue impregnado em papel filtro (SIPF) como fonte de enzima e comparamos com amostras de leucócitos, tendo estudado 25 pacientes com MPS IVA e 54 controles saudáveis. Nós otimizamos as condições de ensaio, incluindo tempo de incubação e estabilidade das amostras de SIPF. Dois tubos tipo eppendorf contendo um disco de 3-mm de diâmetro com sangue em papel filtro, nós adicionamos líquido de eluição e solução de substrato. Após duas diferentes incubações à 37°C, a quantidade de produto hidrolisado foi comparada com um calibrador para permitir a quantificação da atividade enzimática. Resultados em SIPF foram comparados com os obtidos com a técnica padrão usando leucócitos.

**Resultados:** A metodologia fluorimétrica foi validada em nosso laboratório e o ensaio encontrou sensibilidade e especificidade, permitindo uma detecção segura de pacientes com MPS IVA.

O uso de amostras de SIPF simplifica a etapa de coleta e transporte, e é especialmente útil para testar pacientes das mais remotas áreas de grandes países, e quando amostras necessitam cruzar fronteiras. Este teste poderia ser facilmente

incorporado aos protocolos de laboratórios de referência e ter um papel de triagem para a MPS IVA, contribuindo para a detecção precoce de pacientes afetados.

## INTRODUÇÃO

A doença de Morquio tipo A ou mucopolissacaridose tipo IVA (MPS IVA) é uma doença autossômica recessiva, causada por um defeito intralisossomal que afeta a degradação de queratan sulfato [1,2]. Este glicosaminoglicano é formado pela N – acetilglicosamina (ou acetilgalactosamina) e galactose, e é um componente essencial da cartilagem e córnea.

Pelo menos duas enzimas contribuem para a degradação do queratan sulfato: galactose-6-sulfato sulfatase (GALNS, que é deficiente na MPS IVA) e  $\beta$ - galactosidase (que é deficiente na MPS IVB) [1-4]. Embora a baixa estatura e progressiva displasia esquelética sejam usualmente mais pronunciadas na MPS IVA, não é possível diferenciar a MPS IVA da MPS IVB apenas pelos dados clínicos, sendo esta doença um exemplo de doença em que o mesmo fenótipo é causado por diferentes defeitos enzimáticos [4,5].

A MPS IVA é clinicamente caracterizada pelo envolvimento multissistêmico, afetando principalmente o sistema esquelético, cardiopulmonar e visual, com baixa estatura, opacidade de córnea, disostose múltipla, contratura das juntas e defeito no esmalte dentário, entre outros sinais e sintomas. O desenvolvimento cognitivo e mental são normais. Os sintomas geralmente tornam-se evidentes no final do primeiro ou segundo ano de vida, com diminuição progressiva da velocidade de crescimento. Os pacientes usualmente atingem uma estatura final entre 113 e 122 cm, apresentando cifoses, pectus carinatum, sifoesciose e fácies características [2-9].

A investigação inicial da MPS pode ser feita através da análise de GAGs urinários, incluindo a medida de GAGs total, que estão aumentados na maioria de todos os pacientes com MPS e a identificação dos tipos de GAGs excretados (geralmente através da eletroforese ou cromatografia em camada delgada). Esta investigação

preliminar auxilia a direcionar a investigação para o tipo específico de MPS. No caso da MPS IVA, o componente GAG não usual que é principalmente aumentado é o queratan sulfato. O diagnóstico definitivo da MPS IVA é estabelecido através da medida da atividade da GALNS utilizando leucócitos ou fibroblastos cultivados, usualmente através do método fluorimétrico [10].

A necessidade de amostras de sangue para extrair leucócitos, embora mais conveniente que a coleta de biópsia de pele para obter fibroblastos, requer que as amostras cheguem ao laboratório em um espaço de tempo relativamente curto após a coleta (Burin et al, 2000)[11]. Isso dificulta a utilização de leucócitos em países de grandes dimensões, em regiões com sistemas de transporte deficiente e especialmente quando as amostras tem que cruzar fronteiras internacionais, em função das restrições aduaneiras e sanitárias.

O uso de amostras de sangue seco (SIPF) coletadas em papel filtro, poderia ser uma alternativa como um método de triagem e já vem sendo utilizado para a detecção de diversas doenças lisossômicas, incluindo MPS I, II, IIIB, IVB, VI e VII (Chamoles et al) [12]; (Civallero et al) [13]. Embora o uso de SIPF facilite a coleta e o transporte das amostras, especialmente quando grandes distâncias estão envolvidas e / ou fronteiras devem ser cruzadas, a confirmação de um resultado anormal em leucócitos ou fibroblastos cultivados é ainda recomendada.

O fato de um tratamento específico para MPS IVA estar em desenvolvimento clínico - um protocolo com terapia de reposição enzimática intravenosa já está na fase III ([www.bmrn.com](http://www.bmrn.com)) - torna ainda mais importante a existência de uma técnica simples e fácil para a detecção da deficiência enzimática em uma amostra conveniente.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Todos os participantes / responsáveis assinaram o termo de consentimento informado (TCI), aprovado pelo comitê de ética e pesquisa do HCPA. Amostras de leucócitos e sangue impregnado em papel filtro (SIPF) foram obtidas de 54 indivíduos

saudáveis (18-50 anos) e de 25 pacientes (3-47 anos) com diagnóstico de mucopolissacaridose tipo IVA, previamente confirmado em leucócitos, através do método descrito por Van Diggelen et al. [10]. Amostras de SIPF foram preparadas usando papel filtro Whatman nº 903, de acordo com requerimentos do Comitê Nacional de Protocolo Padrão de Laboratório Clínico (NCCLS). [14], e foram armazenadas a 4°C até a realização das análises.

Leucócitos foram isolados de sangue heparinizado de acordo com o método descrito por Skoog et al. [15], e armazenados a -20°C até as análises. As amostras de leucócitos foram diluídas em água destilada e foram sonicadas em sonicador ultrassônico da marca MISONIX. O método de Lowry foi usado para medir as proteínas em amostras de leucócitos [16]. Para validar o método, nós realizamos ensaios simultâneos da GALNS em leucócitos e SIPF. Para a medida da GALNS em leucócitos, nós usamos o método descrito por Van Diggelen et al. [10] e por Tyłki-Szymanska et al. [17], com 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-galactosídeo-6-sulfato (MU- $\beta$ -Gal-6S, Moscerdam, Rotherdam) como substrato. 20  $\mu$ l de homogenato de leucócitos (10 $\mu$ g de proteína) foi incubada a 37°C com o substrato e tampão de diluição por 17 horas, na primeira etapa de incubação e por 2 horas, na segunda etapa, quando a  $\beta$ -galactosidase galactohidrolase exógena foi adicionada (Tabela 1). Para os brancos, albumina de soro bovino (BSA) 0,2 % foi usada em vez da amostra. Depois da reação completa, a fluorescência (excitação, 365 nm; emissão 450 nm) foi medida em um espectrofluorímetro Hitachi, modelo F2000. As leituras foram corrigidas pelos brancos e comparadas com calibradores 4-metilumbelliferona. A atividade enzimática foi calculada como nmol de substrato hidrolisado, por 17 h/mg de proteína. Para o ensaio em SIPF, nós adaptamos o mesmo método descrito por Van Diggelen et al. e por Tyłki-Szymanska et al. [10,17]. Amostras de SIPF foram coletadas e secas seguindo procedimentos padrão. Um único disco de diâmetro de 3.0 mm contendo amostra de sangue seco (~3,6  $\mu$ l de sangue total) foi incubado a 37°C por 48 horas, com o substrato artificial e tampão de diluição, na primeira etapa de incubação e por 6 horas na segunda incubação, como já descrito para leucócitos (detalhes na tabela 1). O tampão de parada foi adicionado aos tubos brancos antes do substrato. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 1500 xg por 10 minutos, à temperatura

ambiente. A fluorescência (excitação, 365nm; emissão, 450nm) foi medida no sobrenadante em um espectrofluorímetro Hitachi, modelo F2000. As leituras foram realizadas usando os mesmos parâmetros do ensaio em leucócitos, e a atividade enzimática foi calculada como nmol de substrato hidrolisado, por 48 h/ml de sangue (3,6 µl de sangue por punção de amostra de SIPF).

A estabilidade das amostras de SIPF foi avaliada em diversas condições de armazenamento (temperatura e dias de armazenamento), em amostras coletadas de 2 pacientes e 3 controles. Após secagem overnight à temperatura ambiente (22°C), a medida da atividade da GALNS foi realizada e considerada 100%. As mesmas amostras foram analisadas depois de armazenadas à 4°C, 22°C e 37°C por 7, 14 e 30 dias.

O coeficiente de variação intra-ensaio da GALNS em SIPF foi calculado através da medida da enzima em duplicata em todos pacientes (n=25) e controles (n=54). O coeficiente de variação inter-ensaio foi calculado através da medida da atividade da enzima de 3 controles de amostras de SIPF em três diferentes ensaios, no mesmo dia (todos os testes foram realizados em duplicata). O teste não-paramétrico Mann-Whitney U foi usado para medir a diferença entre controles e pacientes. Um  $p < 0,05$  foi considerado significativo. A curva ROC foi usada para calcular os valores específicos de cut-off para controles adultos e pacientes (tabela 2). O teste de Bonferroni para comparações múltiplas foi usado para medir as diferenças no estudo da estabilidade.

Todas análises foram realizadas usando o programa estatístico SPSS em um computador compatível PC.

## **RESULTADOS E DISCUSSÕES**

A principal adaptação do método em leucócitos descrito por Van Diggelen et al. [10] para o ensaio em SIPF foi no aumento dos tempos de incubação: 31 hs mais na primeira incubação (total de 48hs) e 4 hs mais na segunda incubação (total de 6 hs).

A tabela 2 mostra a atividade da GALNS em amostras de leucócitos e SIPF. Em todos os pacientes com MPS IVA, nós podemos detectar a deficiência enzimática em amostras de leucócitos e SIPF. Uma diferença estatisticamente significativa foi observada na atividade da GALNS entre o grupo controle e pacientes com MPS IVA em ambas amostras (Figura1).

O coeficiente de variação intra-ensaio dos controles (n=54) e pacientes (n=25) em amostras de SIPF foi  $\leq 12\%$ . O coeficiente de variação inter-ensaio nas amostra de SIPF analisadas em três diferentes ensaios foi  $\leq 13\%$ .

Os testes de estabilidade mostraram que quando as amostras foram mantidas a  $4^{\circ}\text{C}$ , a atividade permaneceu entre 97 e 100 % da atividade inicial por até 30 dias após a coleta. Quando mantidas à temperatura ambiente ( $22^{\circ}\text{C}$ ), nós observamos uma atividade de 80 % no dia 7 (não estatisticamente diferente se comparada aos valores de referência), 38 % no dia 14 e 2 % no dia 30 (ambas estatisticamente diferentes se comparadas aos valores de referência). Amostras armazenadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 7,14 e 30 dias tiveram uma atividade de 10%, 2% e 0%, respectivamente, próximo aos resultados obtidos em amostras frescas de pacientes (Figura 2).

Nós observamos um aumento significativo nas leituras dos brancos das amostras armazenadas a  $22^{\circ}\text{C}$  (14 e 30 dias), e nas amostras armazenadas a  $37^{\circ}\text{C}$  (7,14 e 30 dias). O teste de Bonferroni para avaliar a estabilidade em relação ao tempo mostrou variações do tempo zero para 14 dias e de zero para 30 dias ( $p=0,004$ ), com outras variações relatadas para o tempo de armazenamento sendo não significativas. Em relação à temperatura, uma diferença estatisticamente significativa foi observada com todas temperaturas ( $p<0,005$ ). Nas amostras dos pacientes não foram observados efeitos de temperatura e tempo de armazenamento, sendo a atividade próxima de zero em todas condições.

Esses resultados indicam que amostras de SIPF coletadas para medida da atividade de GALNS devem ser mantidas a  $4^{\circ}\text{C}$  sempre que possível, sendo estável nesta temperatura por mais de 30 dias. O envio de amostra em embalagens com gelo parece não ser estritamente necessário para amostras que chegam ao laboratório antes de 7 dias após a coleta. Em áreas onde podem ocorrer temperaturas altas, o envio em embalagens isoladas, preferencialmente com gelo, deveria ser considerado. Outra

recomendação útil seria o envio simultâneo de amostra controle. A informação sobre data da coleta da amostra é crítica e deveria ser incluída.

Uma precaução deveria ser feita quanto a medida da atividade enzimática, relatada para concentração de sangue em papel filtro, que não é sempre constante. Esta concentração depende principalmente dos procedimentos de coleta da amostra [13]. Para minimizar esta variação é recomendada a medida de uma enzima de referência em cada amostra e nós geralmente usamos a beta-galactosidase para esta finalidade (tabela 2) [13]. Entretanto, quando uma deficiência da atividade da GALNS é encontrada, o ensaio de outra sulfatase deveria ser aconselhável para avaliar a possibilidade de uma deficiência múltipla de sulfatase.

Uma correlação positiva pode ocorrer entre a contagem de leucócitos no sangue e a diminuição da atividade enzimática medida em amostras de SIPF [12]. A diminuição na atividade enzimática relatada para baixas contagens de leucócitos poderia ser facilmente identificada pelo ensaio simultâneo de outras enzimas, com a observação de suas médias [12].

Um método em SIPF já foi proposto para o diagnóstico de MPS IVA, por Hopwood et al [18]), baseado em uma imunoquantificação indireta. Devido à limitada disponibilidade de anticorpo, entretanto, este método não é acessível para a maioria dos laboratórios diagnósticos. Também, um método em SIPF foi proposto por Khaliq et al [19], baseado em espectrometria de massa em tandem, mas esta tecnologia não é disponível na maioria dos laboratórios clínicos.

Na nossa experiência, este método de GALNS em amostras de SIPF permitiu um teste enzimático prático e seguro para a identificação de pacientes com MPS IVA. Este trabalho mostrou que amostras de SIPF podem ser usadas para detectar pacientes com MPS IVA, como um método que poderia ser facilmente incorporado aos protocolos dos laboratórios de referência, possibilitando a identificação mais fácil de pacientes afetados, especialmente em áreas com dificuldades para a coleta e transporte de amostras líquidas. Isso é especialmente importante quando a terapia de reposição enzimática está sendo desenvolvida para a MPS IVA, tornando específico e crítico o tempo para diagnóstico de pacientes afetados, para a introdução de terapia apropriada e para um melhor resultado do tratamento.

## AGRADECIMENTOS

Nós agradecemos ao Juarez Huve pela coleta de amostras de sangue de vários pacientes e controles normais. Nós também somos gratos ao Regis Guidobono por nos auxiliar com alguns procedimentos técnicos, e ao Dr. Anthony Fensom, que gentilmente revisou o texto. Nós gostaríamos de expressar nossa gratidão ao FIPE/HCPA, FAURGS, UFRGS e a Rede MPS Brasil, pelo suporte parcial neste trabalho.

## REFERÊNCIAS

- [1] Lipiello L, & Mankin HJ. Thin-layer chromatographic separation of the isomeric chondroitin sulfates, dermatan sulfate and keratan sulfate. *Anal. Biochem* 1977; 39:54 - 58.
- [2] Kircher SG, Bajbouj M, Miebach E, Beck M. Therapy. In: *Mucopolysaccharidoses – a guide for physicians and parents* (eds Kircher et al.) International Medical Publishers, London 2007;72 - 80.
- [3] Pennock CA. A review and selection of simple laboratory methods used for the study of glycosaminoglycan excretion and the diagnosis of the mucopolysaccharidoses. *J. Clin. Path* 1976; 29: 111-128.
- [4] Barth ML, Giugliani R, Gondenfum SL et al. Application of a flowchart for the detection of lysosomal storage diseases in 105 high-risk brazilian patients. *American Journal of Medical Genetics* 1990; 37:534-538
- [5] Schwartz I, Matte U, Leistner S, Giugliani R. Mucopolissacaridoses. In: *Doenças Genéticas em Pediatria* (ed: Gerson Karakushansky) Guanabara Koogan, Rio de Janeiro 2001; 180-184.
- [6] Sanchez, MB, Fuentes FJR. Mucopolisacaridosis. In: *Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias* (ed.: Sanrurjo P & Baldellou A.) Ergon. C/ Arboleda 1, 28220 Majadahonda (Madrid), 2006; 621-629.
- [7] Dangel, JH. Cardiovascular changes in children with mucopolysaccharide storage diseases and related disorders – clinical and echocardiographic findings in 64 patients. *European Journal of Pediatrics* 1998; 157:534-538.
- [8] Colombo MC, Cornejo,VE., Raimann, EB. Errores innatos en el metabolismo del niño. *Ed. Universitária*. 2003; 8: 225 – 236
- [9] Neufeld EF, Muenzer J. The mucopolysaccharidoses. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, 8<sup>th</sup> edition, vol.II. New York, USA: McGraw – Hill 2001; 3421-3452.

- [10] Van Diggelen OP, Zhao H, Kleijer WJ, et al. A fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of Morquio disease type A. (MPS IV A). *Clin Chim Acta* 1990; 187: 131 - 140.
- [11] Burin M, Dutra C, Brum J, Mauricio T, Amorim M, Giugliani R. Effect of collection, transport, processing and storage of blood specimens on the activity of lysosomal enzymes in plasma and leukocytes. *Brazilian journal of Medical and Biological Research* 2000; 33: 1003 – 1013.
- [12] Chamoles NA, Blanco MB, Gaggioli D, Casentini C. Hurler – like phenotype: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. *Clin Chem* 2001; 47: 2098 – 102.
- [13] Civallero G, Michelin K, Mari J, Viapiana M, Burin M, Coelho JC, and Giugliani R. Twelve different enzyme assays on dried – blood filter paper samples for detection of patients with selected inherited lysosomal storage diseases. *Clinica Chimica Acta* 2006; 372: 98 – 102.
- [14] National Committee for Clinical Laboratory Standard. Blood Collection on Filter Paper for Newborn Screenings Program; Approved Standard-Fourth Edition. NCCLS document LA4-A4. Vilanova, Pa.: NCCLS,2003.
- [15] Skoog WA & Beck WS. Studies on the fibrinogen, dextran and phytohemagglutinin methods of isolating leukocytes. *Blood*, 1956;11: 436- 454.
- [16] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr A.L, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*,1951;193: 265 - 275.
- [17] Tytki – Szymanska A, Czartoryska B, Bunge S, et al. Clinical, biochemical and molecular findings in a two – generation Morquio A family. *Clin. Genet* 1998; 53: 369 – 74.
- [18] Hopwood JJ, Muller V, Lawrence E, Brooks D. N – acetylgalactosamine – 6 – sulfatase protein detection in MPS IV A patient and unaffected control samples. *Clin Chim Acta* 2007; 377: 88 – 91.
- [19] Khaliq T, Sadilek M, Scott RC, Turecek F, Gelb MH. Tandem Mass Spectrometry for the Direct Assay of Lysosomal Enzymes in Dried Blood Spots: Application to Screening Newborns for Mucopolysaccharidosis IVA. *Clin Chem*. 2011, Jan; 57(1): 128-31.

Tabela 1 - Condições de incubação para o ensaio de N - acetilgalactosamina-6-sulfatase (Leucócitos e SIPP) e B-galactosidase (SIPP).

Enzima	Amostra	Incubação I	Incubação II	Tempo de Incubação	Solução Tampão
N-acetilgalactosamina-6-sulfatase	Leucócitos	20 ul leucócitos (10 ug de proteína) e 40 uL 10 mmol/l 4-metilumbelliferyl-β-galactoside-6-sulfate em 0,1 mol / l acetato de sódio/ 0,1 mol / l tampão ácido acético de 0,02% azida de sódio pH 4,3	10 mL de tampão fosfato de 0,9 mol / l, pH 4,3, acrescido de 0,02% azida de sódio e 20 ul β-galactosidase galactohidrolase 10U	Inc I: 17 horas Inc II: 2 horas	400 μL 0,5mol / l carbonato de sódio/ bicarbonato de sódio, acrescido de 0,025% triton X100, pH 10,7
N-acetilgalactosamina-6-sulfatase	SIPP	3 mm DBS, 20 ml de água destilada 40 μL 10 mmol/l 4-metilumbelliferyl- β – galactoside -6-sulfato em 0,1 mol / l Na-acetato / 0,1 mol / l de tampão fosfato de citrato 0,02% ácido de sódio pH 4,3	10 mL de tampão fosfato de 0,9 mol / l, pH 4,3, acrescido de 0,02% azida de sódio e 20 ul β-galactosidase galactohidrolase 10U	Inc I: 48 horas Inc II: 6 horas	400 μL 0,5mol / l carbonato de sódio/ bicarbonato de sódio, acrescido de 0,025% triton X100, pH 10,7
β-galactosidase	SIPP	DBS 3mm, 80 mL 0,05 mol / l tampão fosfato de citrato, pH 4,4 em 45g/l NaCl e 40 μL 0,8 m mol / l 4-metilumbelliferyl-β-D-galactoside em água destilada	-	3 horas	600 μL 0,085 mol/l glicina-NaOH, pH 10,5

Tabela 2 - N- acetil-galactosamina-6-sulfatase e  $\beta$ -galactosidase (enzima de referência) atividades em diferentes amostras.

Método	n	Variação das atividades (média $\pm$ SD)	p	Cutt-off valor
<b>N-acetilgalactosamina-6-sulfatase</b>				
<b>Leucócitos<sup>a</sup></b>				
Pacientes MPS IVA	25	0,0 – 6,0 (1,03 $\pm$ 1,63)	< 0,001	37
Controles normais	54	68 -352 (192,7 $\pm$ 73,10)		
<b><i>SIPP</i><sup>b</sup></b>				
Pacientes MPS IVA	25	0 -1,25 (0.10 $\pm$ 0.33).	< 0,001	3,5
Controles normais	54	5,75 -33,45 (13,64 $\pm$ 5,98).		
<b>B – galactosidase</b>				
<b><i>SIPP</i><sup>c</sup></b>				
Pacientes	25	20 -57 (36,25 $\pm$ 11,95).		
Controles Normais	54	20 -66 (42,04 $\pm$ 11,27).		

Atividades expressa como: (a) nmol /17h /mg de proteína; (b) nmol / 48h/ml; (c) nmol / h/ ml

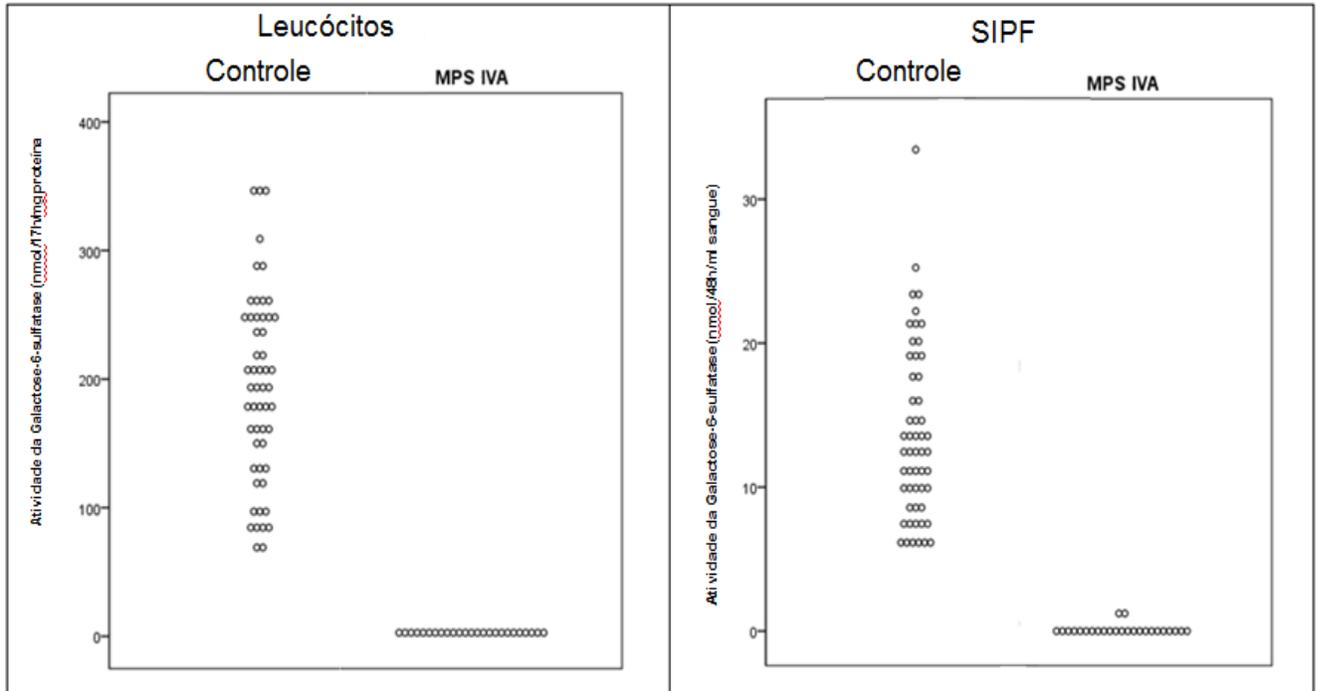


Figura 1 - Atividade da GALNS em amostras de leucócitos e SIFP em pacientes e controles.

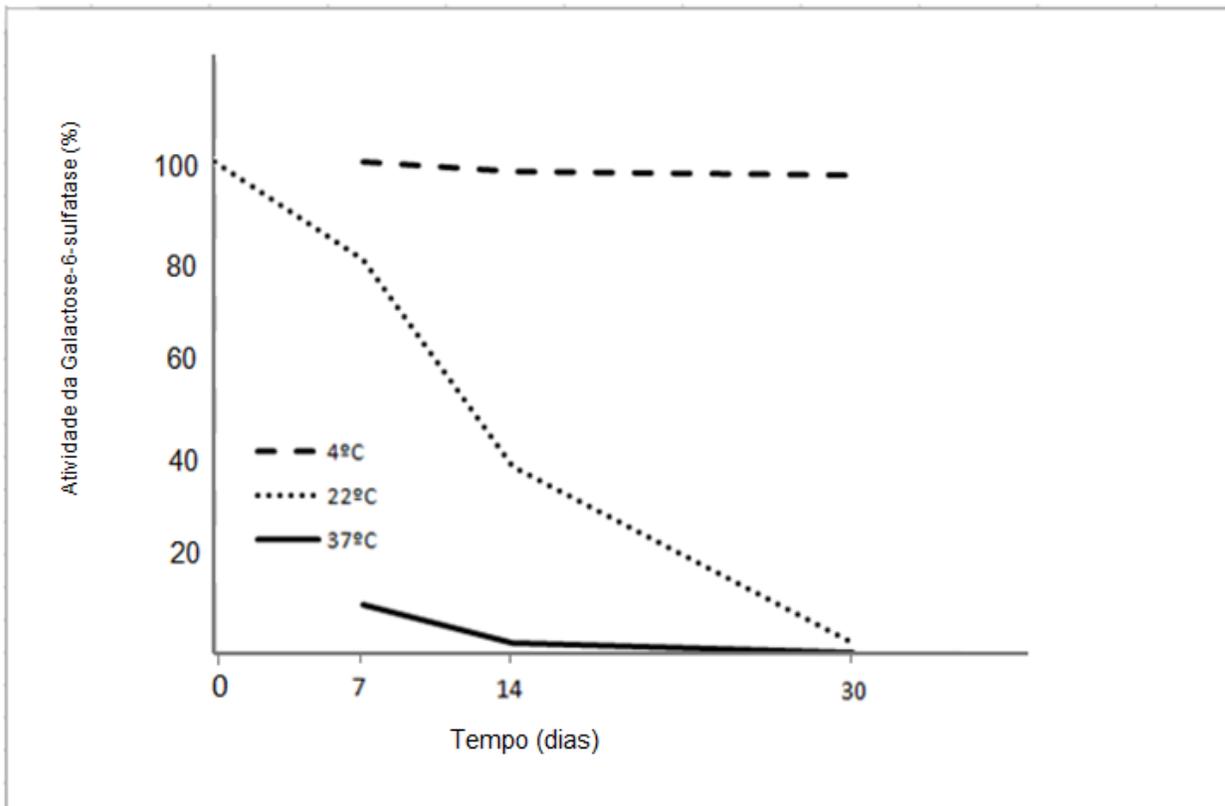


Figura 2 - Efeito da temperatura e tempo de armazenamento sobre a atividade da GALNS em SIPF.

## 9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A mucopolissacaridose tipo IVA é uma doença progressiva, com envolvimento esquelético importante. Apesar da displasia esquelética ser característica, o diagnóstico definitivo só é obtido através do ensaio enzimático específico, tornando importante a padronização de técnicas bioquímicas mais práticas e acessíveis, disponibilizando o acesso ao diagnóstico para todos os pacientes.

Este trabalho mostrou que a utilização de amostras de SIPF como teste de triagem para o diagnóstico bioquímico da MPS IVA é viável de ser incorporado aos laboratórios de referência, para identificar pacientes com doença de Morquio tipo A, especialmente em áreas de difícil acesso para coleta e transporte de amostras líquidas.

A utilização de papel filtro padrão (Whatmann nº 903) e o procedimento de coleta das amostras, seguindo-se as normas de coleta da NCCLS, assim como o tempo de secagem das amostras antes de armazenar à 4°C, é muito importante para a obtenção de resultados confiáveis, permitindo, desta maneira o diagnóstico seguro de pacientes afetados.

Os testes de estabilidade de amostras de SIPF para o ensaio enzimático da GALNS, para o diagnóstico de pacientes com mucopolissacaridose tipo IVA, foram de extrema importância, mostrando que a temperatura de armazenamento das amostras a 4°C é a temperatura indicada para a obtenção dos resultados confiáveis, evitando-se desta maneira, resultados falso-positivos. Nesta temperatura, as amostras foram estáveis por até 6 meses.

Acreditamos que a disponibilização deste teste em SIPF vai permitir um diagnóstico mais precoce da MPS IVA, o que é especialmente importante num momento em que uma terapia específica para esta doença está sendo desenvolvida.

## REFERÊNCIAS

1. BAEHNER, F.; et al. Cumulative incidence rates of the mucopolysaccharidoses in Germany. **Journal of Inherited Metabolic Diseases**, n.28, p. 1011-1017, 2005.
2. BAINES D.; KENEALLY J. Anaesthetic implications of the mucopolysaccharidoses: A fifteen- year experience in a children`s hospital. *Anaesth Intens Care*, n.11, p.198-202, 1983.
3. BAKER, E.; GUO X-H; ORSBORN A; et al. The Morquio A syndrome (mucopolysaccharidosis IVA) gene maps to 16q24.3. **Am Jhum Genet**, n.52, p.96, 1993.
4. BARTH, M. L.; GIUGLIANI R.; GONDENFUM S.; et al. Application of a flowchart for the detection of lysosomal storage diseases in 105 high-risk brazilian patients. **American Journal of Medical Genetics**, n.37, p.534-538, 1990.
5. BEAUDET, A. L.; et al. Variation in the phenotypic expression of B-glucuronidase deficiency. **Pediatrics**, n.86, p.388-394, 1995.
6. CAPPELLETTI, R.; DEL ROSSO, M.; CHIARRUGI V. A new electrophoretic method for complete separation of all known animal glycosaminoglycans in a monodimension run. **Anal. Biochem**, n.99, p.311-315, 1979.
7. CIVALLERO G, Michelin K, Mari j, Viapiana M, Burin M, Coelho JC, and Giugliani R.
8. Twelve different enzyme assays on dried blood paper samples for detection of patients with selected inherited lysosomal storage diseases. *Clinica Chimica Acta*, 2006; 372: 98-102.
9. CHAMOLES, N. A.; et al. Hurler-like phenotype: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. **Clinical Chemistry**, v.47, n.12, p.2098-2102, 2001.
10. CHIH-KUANG, C. MPS screening methods, the Berry spot and acid turbidity tests, cause a high incidence of false-negative results in Sanfilippo and Morquio Syndromes. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v.16, n.5, p.253-258, 2002.
11. COLOMBO M. C.; et al. **Errores innatos en el metabolismo del niño**. Santiago: Editorial Universitária. 2003.
12. DANGEL, J. H. Cardiovascular changes in children with mucopolysaccharide storage diseases and related disorders – clinical and echocardiographic findings in 64 patients. **European Journal of Pediatrics**, n.157, p.534-538, 1998.

13. DE JONG, J. G.; Dimethylmethylene blue-based Spectrophotometry of glycosaminoglycan. In untreated urine: a rapid Screening procedure for mucopolysaccharidosis. **Clinical Chemistry**, v.35, n.7, p.1472, 1989.
14. FENSOM, A. H.; et al. First trimester diagnosis of metachromatic leucodystrophy. **Clin. Genet**, N.34, p.122-125, 1989.
15. GREEN, A. Investigation for inborn errors of metabolism. An approach to diagnosis. **J. Intern. Ped. Clin. Chem**, n.3, p.104-105, 1991.
16. GROEBE, H.; KRINS, M.; SCHMIDBERGER, H.; et al. Morquio Syndrome (mucopolysaccharidosis IV B) associated with  $\beta$ -galactosidase deficiency: a report of two cases. **Am J Hum Genet**, n.32, p.258, 1980.
17. HADDAD, F.; et al. Carpal tunnel syndrome in the Mucopolysaccharidoses and Mucopolipidoses. **J Bone Joint Surg**, n.79, p.576-582, 1997.
18. HORWITZ, A. L. The enzyme defect in Morquio's disease: the specificity of N-acetylhexosamine sulfatases. **Biochem Biophys Res Commun**, n.80, p.819, 1978.
19. HUMBEL, R.; et al. Sequential thin-layer chromatography of urinary acid glycosaminoglycans. **Clin. Chim. Acta**, n.40, p.290-293, 1972.
20. KIRCHER, S. G.; et al. Therapy. In: Mucopolysaccharidoses – a guide for physicians and parents. **International Medical Publishers**, p.72 a 80, 2007.
21. KRIVIT, W.; et al. Lysosomal storage diseases treated by bone marrow transplantation. In: **Bone Marrow transplantation: current controversies**. New York: Alan Liss, 1989, p.367-378.
22. LIPIELLO, L.; MANKIN, H. Thin-layer chromatographic separation of the isomeric chondroitin sulfates, dermatan sulfate and dermatan sulfate. **Anal. Biochem.**, n.39, p.54-58, 1977.
23. LOWDEN, J. A. Enzymological diagnosis of lysosomal storage diseases. In: WILLEY, A. M.; et al. **Clinical Genetics—Problems in diagnosis and counseling**. New York: Academic Press, 1982.
24. LOWRY, O. H.; et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem**, n.193, p.265-275, 1951.
25. MASUNO, M.; et al. Mucopolysaccharidosis IVA: assignment of the human N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase (GALNS) gene to chromosome 16q24. **Genomics**, n.16, p.777, 1993.

26. MATALON, R.; et al. Morquio's syndrome: deficiency of a chondroitin sulfate N-acetylhexosamine sulfate sulfatase. **Biochem Biophys Res Commun**, n.61, p.759, 1974.
27. McKUSICK, V. A. **Mendelian inheritance in man**. Catalogs of autosomal recessive and X-linked phenotypes. 10.ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 1993.
28. MUENZER, J. Mucopolysaccharidoses. **Advances in Pediatrics**, n.33, p.269-302, 1986.
29. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARD. **Blood Collection on Filter Paper for Newborn Screenings Program**; Approved Standard-Fourth Edition. NCCLS document LA4-A4. Vilanova, Pa.: NCCLS, 2003.
30. NELSON, J. Clinical findings in 12 patients with MPS IV A (Morquio's disease): further evidence for heterogeneity Part II: dental findings. **Clin Genet**, n.33, p.121, 1988.
31. NELSON, J. **Incidence of the mucopolysaccharidoses in Western Australia**. American Journal of Medical Genetics 123A:310-313 (2003).
32. NEUFELD, E.; et al. Lysosomal Storage Diseases. **Ann. Rev. Biochem**, n.60, p.257-280, 2001.
33. NEUFELD, E.; MUENZER, J. "The mucopolysaccharidoses" In **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**. New York: McGraw Hill, 2001. p.3421-3452, 2001.
34. NORTHOVER, H., COWIE, R.A., WRAITH, J.E. "**Mucopolysaccharidosis type IVA (Morquio Syndrome): a clinical review**", en journal of Inherited Metabolic Disease, 1996, 19 (3), pp. 357-365.
35. PENNOCK, C. A. A review and selection of simple laboratory methods used for the study of glycosaminoglycan excretion and the diagnosis of the mucopolycchacaridoses. **J. Clin. Path**, n.29, p.111-128, 1976.
36. PETERS, C.; et al. Hurler syndrome: II. Outcome of HLA- Genotypically identical sibling and HLA- haploidentical related donor bone marrow transplantation in fifty - four children. **Blood**, n.91, p.2601-2608, 1998.
37. SANCHEZ, M.; Mucopolisacaridosis. In.: SANRURJO, P.; BALDELLOU, A. **Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias**. Majadahonda: Ergon, 2006. p.621-629.
38. SCHIFFMANN, R., BRADY, R.O. "**New prospects for the treatment of lysosomal storage diseases**", em Drugs, 2002,62(5),pp. 733-742.

39. SCHWARTZ, I.; et al. Mucopolissacaridoses. In: KARAKUSHANSKY, Gerson. **Doenças Genéticas em Pediatria**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, p.180-184.
40. SCRIVER, C. R.; et al. **The metabolic & molecular bases of inherited disease**. New York: McGraw Hill, 2001. v.3
41. SEMENZA, G. L.; et al. Respiratory Complications of Mucopolysaccharide Storage Disorders. **Medicine**, n.67, p.209-219, 1988.
42. SINCLAIR, L. A new look at the inborn errors of metabolism. **Ann. Clin. Biochem**, n.19, p.314-321, 1982.
43. SKOOG, W. A.; BECK, W. S. Studies on the fibrinogen, dextran and phytohemagglutinin methods of isolating leukocytes. **Blood**, n.11, p.436-454, 1956.
44. STANBURY, J. B.; et al. **The metabolic basis of inherited disease**. 5.ed. New York: McGraw-Hill, 1983.
45. STEVENS, J. M.; et al. The odontoid process in Morquio – Brailsford's disease. The effects of occipitocervical fusion. **The Journal of Bone and joint surgery**, v.73, n.5, p.851-858, 1991.
46. SUZUKI, K. Globoid cell leukodystrophy (Krabbe disease) and GM1 gangliosidosis. In: GLEW, R. H.; PETERS, S. P. **Practical Enzymology of Sphingolipidosis**. New York: Alan R. Liss, 1977. p.101-136
47. TAGER, J. M.; et al. Metabolic consequences of genetic defects in lysosomes. **Biochem. Soc. Trans**, n.12, p.902-905, 1984.
48. TOJAK, J. E.; et al. Morquio-like syndrome (MPS IVB) associated with deficiency of  $\beta$ -galactosidase. **Johns Hopkins Med J**, n.146, p.75, 1980.
49. TYLKI-SZYMANSKA, A.; CZARTORYSKA, B.; BUNGE, S.; et al. Clinical, biochemical and molecular findings in a two – generation Morquio A family. **Clin. Genet**, n.53, p.369-74, 1998.
50. VAN DIGGELEN, O. P.; et al. A fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of Morquio disease type A. **Clin Chim Acta**, n.187, p.131-40, 1990.
51. VELLODI, A.; et al. Bone marrow transplantation for mucopolysaccharidoses type I: experience of two British centres. **Arch Dis Child**, n.76, p.92-99, 1997.
52. WANNMACHER, C.; et al. Detection of metabolic disorders among high risk patients. **Rev. Brasil. Genet.**, v.1, p.187-194, 1982.

53. WHITLEY, C. B.; et al. Urine glycosaminoglycan excretion quantified by an automated semimicro method in specimens conveniently transported from around the globe. **Molecular Genetics and Metabolism**, n.75, p.56-64, 2002.
54. WRAITH, J. E. The mucopolysaccharidoses: a clinical review and guide to management. **Arch Dis in Child**, n.72, p.263-267, 1996.

## ANEXOS

## ANEXO A - APROVAÇÃO DO PROJETO



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE**  
**Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação**

COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB00000921) analisaram o projeto:

**Projeto:** 09-348

**Versão do Projeto:** 25/08/2009

**Versão do TCLE:** 02/09/2009

**Pesquisadores:**

MAIRA GRAEFF BURIN

ROBERTO GIUGLIANI

IDA VANESSA DOEDERLEIN SCHWARTZ

MARLI VIAPIANA

GIORGIA DE SOUZA MARASCA

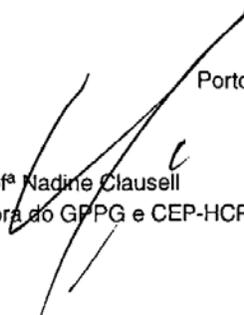
TAIANE ALVES VIEIRA

**Título:** DIAGNÓSTICO DE MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO IVA EM SANGUE TOTAL E EM SANGUE IMPREGNADO EM PAPEL FILTRO

- Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, inclusive quanto ao seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente ao CEP/HCPA. Somente poderão ser utilizados os Termos de Consentimento onde conste a aprovação do GPPG/HCPA.

- De acordo com a regulamentação da Resolução 340/2004 do CNS/MS o CEP/HCPA foi credenciado, através da Carta Circular Nº 037 CONEP/CNS/MS de 11 de agosto de 2004, para dar aprovação final para este projeto.

Porto Alegre, 02 de setembro de 2009.

  
 Profª Nadine Clausell  
 Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA

## **ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA CONTROLES**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA CONTROLES**

**Título do projeto: Diagnóstico de Mucopolissacaridose tipo IVA em sangue total e em sangue impregnado em papel filtro**

**Pesquisador responsável:** Maira Graeff Burin. Serviço de Genética Médica. Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos, 2350. Porto Alegre. Fone: 3359 8011.

O laboratório do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre está trabalhando na padronização de uma nova metodologia em leucócitos( células brancas do sangue ) e a implantação deste método utilizando amostras de sangue impregnadas em papel filtro (SIPF). Esta nova metodologia permite o diagnóstico de certeza dos pacientes com mucopolissacaridose do tipo IVA, sem a possibilidade de confusão com o tipo IVB. O uso de SIPF é uma alternativa às amostras de sangue total enviados em tubos vacutainer ou seringas, que estão sujeitos a deterioração em um curto espaço de tempo e que tem seu envio limitado quando pensamos em longas distâncias. Caso seja possível fazer as análises nesse tipo de material, isso facilitaria enormemente o transporte das amostras, até o nosso laboratório, e espera-se que isto aumente o acesso das pessoas a este tipo de exame (que no Brasil somente é feito aqui em nosso laboratório).

Para a padronização dessa técnica são necessárias amostras de sangue de indivíduos saudáveis de diferentes idades, para que possamos estabelecer os valores normais da atividade da galactose-6-sulfatase em indivíduos sadios e, a partir daí, diferenciarmos dos valores da atividade que são encontradas nos pacientes.

## ANEXO C - TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO PARA PACIENTES

I

TCI - MPS NO BRASIL

14/02/2003

## TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

**TÍTULO DO PROJETO:** Mucopolissacaridoses no Brasil: um estudo clínico, epidemiológico, bioquímico e molecular com impacto no diagnóstico, manejo e prevenção

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Roberto Giugliani, Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, RS

Nome do paciente: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_ Estado \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_

Fone: (\_\_\_\_) \_\_\_\_\_ Email: \_\_\_\_\_

Responsável: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

RG: \_\_\_\_\_ Grau de parentesco: \_\_\_\_\_

**Justificativa e objetivos do estudo:**

As mucopolissacaridoses são doenças genéticas de curso progressivo e muitas vezes de diagnóstico difícil. Com o objetivo de diagnosticar corretamente os pacientes afetados, permitindo que recebam as medidas de tratamento disponíveis em cada situação, foi montado um projeto para avaliar clínica e laboratorialmente os pacientes com suspeita de apresentar uma mucopolissacaridose. Os casos identificados serão referidos a centros regionais que possam realizar o manejo adequado e oferecer as medidas de prevenção de novos casos para a família. O estudo pretende identificar as mucopolissacaridoses mais frequentes e as regiões de maior incidência, bem como incentivar a pesquisa sobre essas doenças no Brasil.

**Procedimentos a que serão submetidos os pacientes**

Os pacientes com suspeita de apresentar uma mucopolissacaridose serão submetidos a uma avaliação clínica. Caso a suspeita seja confirmada, serão coletadas amostras de sangue e de urina para análises laboratoriais. Em alguns casos será necessária a repetição dos exames e mesmo a coleta de uma biópsia de pele para o completo esclarecimento do caso. Alguns procedimentos adicionais, como exames de imagens, testes de função pulmonar, testes de mobilidade articular, testes de resistência, estudo do sono, entre outros, poderão ser indicados. O estudo de familiares pode ser importante para o esclarecimento do caso. Esses exames fazem parte da rotina de atendimento de pacientes com suspeita de mucopolissacaridose.

HCPA / GPPG  
VERSÃO APROVADA

07/03/03  
03.066

14/02/2003

**Armazenamento de dados e amostras**

Nos casos confirmados, os dados clínicos e laboratoriais serão registrados em um banco de dados e as amostras ficarão armazenadas em um banco de material. Esses dados e amostras ficarão à disposição de pesquisadores que queiram desenvolver pesquisas sobre o tema, desde que as pesquisas sejam aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

**Benefícios esperados**

Com o diagnóstico do tipo de mucopolissacaridose, o paciente poderá se beneficiar das medidas de tratamento eventualmente disponíveis. Por outro lado, sua família também poderá se beneficiar através do aconselhamento genético, detecção de portadores e diagnóstico pré-natal.

**Caso tenha alguma dúvida ou queira algum esclarecimento adicional, contactar o Dr. Roberto Giugliani ou alguém da equipe de mucopolissacaridoses do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, no endereço abaixo:**

Serviço de Genética Médica  
Hospital de Clínicas de Porto Alegre  
Rua Ramiro Barcelos 2350  
90035-003 – Porto Alegre – RS  
tel (51) 33168011  
fax (51) 33168010  
email l-genética@hcpa.ufrgs.br

**Concordo em participar do projeto de pesquisa "Mucopolissacaridoses no Brasil: um projeto abrangente para sua investigação, registro diagnóstico, manejo e prevenção"**

Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Paciente ou responsável: \_\_\_\_\_

Responsável pelo estudo: \_\_\_\_\_

**HCPA / GPPG  
VERSÃO APROVADA**

07/103/03  
05.06b

## ANEXO D - AUTORIZAÇÃO PARA USO DE IMAGEM



HOSPITAL DE  
CLÍNICAS  
PORTO ALEGRE RS

SERVIÇO DE GENÉTICA MÉDICA  
CENTRO COLABORADOR DA  
ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE  
PARA O DESENVOLVIMENTO DE SERVIÇOS DE  
GENÉTICA MÉDICA NA AMÉRICA LATINA



### AUTORIZAÇÃO PARA USO DE IMAGEM

Concordo com a utilização de imagem fotográfica de \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_, incluindo rosto, sem  
divulgação simultânea de nome, ou qualquer forma de identificação, para fins de  
documentação de investigação diagnóstica bem como uso em publicação científica. As  
imagens fotográficas ficarão sob tutela do Serviço de Genética Médica do Hospital de  
Clínicas de Porto Alegre, estando o Dr Roberto Giugliani (chefe do Serviço), disponível para  
eventuais esclarecimentos pelo telefone (51) 2101 8011.

Porto Alegre, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Paciente

\_\_\_\_\_  
Responsável

\_\_\_\_\_  
Médico

Rua Ramiro Barcelos, 2350  
90035-903 - Porto Alegre - RS - Brasil  
www.hcpa.ufrgs.br

HCPA / GPPC  
VERSÃO APROVADA  
12/02/07

fone (51) 2101-8011  
fax (51) 2101-8010  
l-genetica@hcpa.ufrgs.br

## ANEXO E - SUBMISSÃO DO ARTIGO

### **Clinica Chimica Acta xxx (2011) xxx–xxx**

Practical and reliable enzyme test for the detection of Mucopolysaccharidosis IVA (Morquio Syndrome type A) in dried blood samples

Marli V. Camelier a,b, Maira G. Burin a, Jurema De Mari a, Taiane A. Vieira a,b, Giórgia Marasca a, Roberto Giugliani a,b,c,d,e, □

a Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil

b Postgraduate Program in Medicine, Medical Sciences, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

c Postgraduate Program in Genetics and Molecular Biology, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

d Department of Genetics, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

e INAGEMP, National Institute of Population Medical Genetics, Porto Alegre, RS, Brazil

a r t i c l e i n f o a b s t r a c t

Article history:

Received 14 January 2011

Received in revised form 18 April 2011

Accepted 2 June 2011

Available online xxxx

Keywords:

Mucopolysaccharidosis IVA

Morquio syndrome

Lysosomal storage diseases

Glycosaminoglycans

Dried blood spots

Screening

**Background:** Mucopolysaccharidosis IVA (MPS IVA), or Morquio Syndrome type A, is an autosomal recessive disease caused by deficiency of the lysosomal enzyme N-acetylgalactosamine-6-sulfatase (GALNS), resulting in excessive lysosomal storage of keratan sulfate in many tissues and organs. This accumulation causes a severe skeletal dysplasia with short stature, and affects the eye, heart and other organs, with many signs and symptoms. Morquio A syndrome is estimated to occur in 1 in 200,000 to 300,000 live births. Clinical trials with enzyme replacement therapy for this disease are in progress, and it is probable that the treatment, when available, would be more effective if started early. We describe an innovative fluorometric method for the assay of GALNS in dried blood spots (DBS). **Methods:** We used dried blood spots (DBS) as the enzyme source and compared it with leukocytes samples, having studied 25 MPS IVA patients and 54 healthy controls. We optimized the assay conditions, including incubation time and stability of DBS samples. To eppendorf type tubes containing a 3-mm diameter blood spot we added elution liquid and substrate solution. After 2 different incubations at 37 °C, the amount of hydrolyzed product was compared with a calibrator to allow the quantification of the enzyme activity. Results in DBS were compared to the ones obtained in leukocytes using the standard technique. **Results:** The fluorescent methodology was validated in our laboratory and the assay was found sensitive and specific, allowing reliable detection of MPS IVA patients. The use of DBS simplifies the collection and transport steps, and is especially useful for testing patients from more remote areas of large countries, and when samples need to cross country borders. **Conclusion:** This assay could be easily incorporated into the protocol of reference laboratories and play a role in the screening for MPS IVA, contributing to earlier detection of affected patients.