



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

**DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DAS MUCOPOLISSACARIDOSES I, VI e VII:
APERFEIÇOAMENTO DE TÉCNICAS ESPECTROFLUORIMÉTRICAS PARA
A MEDIDA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM AMOSTRAS DE SANGUE
IMPREGNADO EM PAPEL FILTRO E OUTROS MARCADORES
BIOQUÍMICOS**

Doutoranda: Jaqueline Cé

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Janice Carneiro Coelho

Porto Alegre, 2018

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

**DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DAS MUCOPOLISSACARIDOSES I, VI e VII:
APERFEIÇOAMENTO DE TÉCNICAS ESPECTROFLUORIMÉTRICAS PARA
A MEDIDA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM AMOSTRAS DE SANGUE
IMPREGNADO EM PAPEL FILTRO E OUTROS MARCADORES
BIOQUÍMICOS**

JAQUELINE CÉ

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas: Bioquímica da
Universidade Federal do Rio Grande
do Sul, como requisito à obtenção do
título de Doutora em Bioquímica

Orientadora

Prof.^a Dr.^a Janice Carneiro Coelho

Porto Alegre

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Cé, Jaqueline
Diagnóstico diferencial das Mucopolissacaridoses
I, VI e VII: Aperfeiçoamento de técnicas
espectrofluorimétricas para a medida da atividade
enzimática em amostras de sangue impregnado em papel
filtro e outros marcadores bioquímicos / Jaqueline
Cé. -- 2018.
97 f.
Orientador: Dra. Janice Coelho.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. mucopolissacaridoses. 2. sangue impregnado em
papel filtro. 3. alfa-iduronidase. 4. arilsulfatase
B. 5. beta-glicuronidase. I. Coelho, Dra. Janice,
orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

*“Dedico os estudos que tenho participado e realizado desde minha graduação
para o aprimoramento do diagnóstico das Mucopolissacaridoses
aos indivíduos que possuem essa doença.”*

AGRADECIMENTOS

Meu principal agradecimento é para minha orientadora Dra. Janice Coelho, por toda a parceria, por todos os ensinamentos, pela compreensão em todos os momentos. Nossa pesquisa fluiu tranquilamente durante esse período. Um agradecimento especial por eu ser sua última aluna de Doutorado e por todo o incentivo e força e aos conselhos para a vida.

Agradeço ao incrível Grupo DLD, Ana Carolina Breier, Vanessa Daitx, Jamila Mezzalira, Mariana Goldim, Nicole Sartori, Cristina Castilhos pela forte amizade, ficará as saudades dos nossos dias no laboratório 25.

Às minhas queridas ICs Vitória Moraes, Eduarda Käfer e Melissa Rodrigues pela ajuda nos experimentos e testes.

Ao Alexandre Mello pela nossa colaboração em trabalhos, que as pesquisas com as MPS e demais DLDs continuem.

À minha família, meu pai e irmã e amigos e ao Polaco meu companheiro de escritas e pesquisas pelas madrugadas.

Ao meu noivo Arthur Fraga, que acompanhou todo o desenvolvimento da tese, e me auxiliou atualizando e configurando as tecnologias.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, especialmente para a Cléia.

Por fim agradeço à Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela oportunidade de ter ingressado tanto no Mestrado quanto no Doutorado e ao auxílio do CNPq.

ÍNDICE

RESUMO.....	3
ABSTRACT	4
LISTA DE ABREVIATURAS.....	5
1 INTRODUÇÃO	7
1.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO.....	7
1.2 DOENÇAS LISSÔMICAS DE DEPÓSITO	8
1.3 MUCOPOLISSACARIDOSES	8
1.3.1 MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO I	12
1.3.2 MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO VI.....	12
1.3.3 MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO VII.....	12
1.4 DIAGNÓSTICO DAS MUCOPOLISSACARIDOSES.....	13
1.5 TÉCNICAS EM SANGUE IMPREGNADO EM PAPEL FILTRO.....	14
1.6 TAMPÃO UNIVERSAL.....	16
1.7 MARCADORES BIOQUÍMICOS NO ESTUDO DAS DLDs.....	18
1.7.1 ESTRESSE OXIDATIVO COMO MARCADOR BIOQUÍMICO NAS MUCOPOLISSACARIDOSES.....	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GERAL	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
Capítulo I	23
Artigo: Beta-glucuronidase activity in dried blood spots: Reduced technique with biochemical parameters determined	23
Capítulo II	30
Artigo: Spectrofluorimetric Measurement of the Enzyme Activity of Alpha- Iduronidase, Arylsulfatase B, and Beta-Glucuronidase in DBS using Universal Extraction Buffer.....	30
Capítulo III	55
Artigo: Analyses of oxidative stress biomarker in Mucopolysaccharidosis VI compared with Mucopolysaccharidosis I and healthy controls	55
DISCUSSÃO	60
CONCLUSÕES	72
PERSPECTIVAS.....	74
REFERÊNCIAS.....	75

ANEXOS	86
Anexo 1 - Aprovação Comitê de Ética e Pesquisa	86
Anexo 2 - Termo de concordância Banco de Sangue -HCPA.....	89
Anexo 3 - Termo de concordância Associação Gaúcha de MPS	90
Anexo 4 –Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	91

RESUMO

As Mucopolissacaridoses são erros inatos do metabolismo, fazem parte das doenças lisossômicas de depósito e ocorrem devido à deficiência na atividade de enzimas que catalisam a degradação de glicosaminoglicanos. O objetivo desse estudo foi aperfeiçoar o diagnóstico bioquímico das Mucopolissacaridoses dos tipos I, VI e VII, estabelecendo o uso do tampão fosfato de sódio 20 mmol/L pH 7,0 (tampão universal - TU) e outros parâmetros bioquímicos. Nesse trabalho foi aprimorada a técnica de medida de atividade da beta-glicuronidase (GUSB), enzima deficiente na MPS VII, reduzindo a quantidade de reagentes em 4 vezes e a utilização do tamanho dos picotes de sangue impregnado em papel filtro (SPF) para 1,2 mm. Estudamos a cinética da atividade da GUSB determinando o pH ótimo (4,4), Km (1,25 mM), Vmáx (594,48 nmol/h/mL), termoestabilidade (inativação significativa da enzima a partir de 60 min a 60 °C) e tempo e temperatura de armazenamento (até 30 dias à 4, 25 e 37 °C, acima de 60 dias à -20 °C) e estabelecemos um intervalo de referência para a atividade da GUSB em amostras de indivíduos saudáveis nessa metodologia (174,4 nmol/h/mL a 781,9 nmol/h/mL). Estabelecemos o uso do TU para determinação das atividades da alfa-iduronidase (IDUA), arilsulfatase B (ASB) e GUSB medindo a atividade enzimática em SPF eluído nesse tampão e correlacionamos com a técnica espectrofluorimétrica já padronizada para cada enzima em SPF de 1,2 mm em amostras de indivíduos saudáveis. As correlações foram positivas e os coeficientes de validação da técnica estavam dentro dos limites aceitáveis. As médias de atividade determinadas para indivíduos saudáveis foram: $14,65 \pm 4,35$ nmol/h/mL (IDUA), $22,51 \pm 5,09$ nmol/h/mL (ASB) e $531,92 \pm 121,05$ nmol/h/mL (GUSB). Foram analisados parâmetros bioquímicos envolvidos em estresse oxidativo no plasma de indivíduos com MPS VI e comparados com MPS I e controles saudáveis. A medida da atividade da SOD não diferiu entre os grupos, a atividade de CAT encontrava-se diminuída tanto em MPS VI quanto em MPS I e a dosagem de TBARS estava aumentada em ambas as MPS em relação aos controles. A partir desse estudo, foi possível padronizarmos e aperfeiçoarmos novas técnicas para o diagnóstico laboratorial para a MPS I, VI e VII além de introduzir o estresse oxidativo como um possível marcador no uso da terapia de reposição enzimática.

Palavras chave: mucopolissacaridoses, sangue impregnado em papel filtro, α -iduronidase, arilsulfatase B, β -glicuronidase.

ABSTRACT

Mucopolysaccharidoses are inborn errors of metabolism, being part of lysosomal storage diseases and occurring due to deficiency in the activity of enzymes that catalyze the degradation of glycosaminoglycans. The aim of this study was to improve the biochemical diagnosis of Mucopolysaccharidoses of types I, VI and VII, establishing the use of 20 mmol/L sodium phosphate buffer pH 7.0 (universal extraction buffer - UEB) and other biochemical parameters. In this work, the activity measurement technique of beta-glucuronidase (GUSB), enzyme deficient in MPS VII, has been improved, reducing the amount of reagents in 4 times and using the size of dried blood spots (DBS) for 1.2 mm. We studied the kinetics of GUSB activity by determining the optimum pH (4.4), K_m (1.25 mM), V_{max} (594.48 nmol/h/mL), thermostability (significant inactivation of the enzyme from 60min at 60 °C) and storage time and temperature (up to 30 days at 4, 25 and 37 °C, above 60 days at -20 °C) and established a reference range for GUSB activity in samples from healthy subjects in this methodology (174.4 nmol/h/mL at 781.9 nmol/h/ mL). We established the use of TU to determine the activities of alpha-iduronidase (IDUA), arylsulfatase B (ASB) and GUSB by measuring the enzymatic activity in DBS eluted in this buffer and correlated with the standardized spectrofluorometric technique for each enzyme in DBS of 1.2 mm in samples from healthy individuals. Correlations were positive and the validation coefficients of the technique were within acceptable limits. The activity means determined for healthy individuals were 14.65 ± 4.35 nmol/h/mL (IDUA), 22.51 ± 5.09 nmol/h/mL (ASB) and 531.92 ± 121.05 nmol/h/mL (GUSB). Biochemical parameters involved in oxidative stress in the plasma of individuals with MPS VI and compared to MPS I and healthy controls were analyzed. Measurement of SOD activity did not differ between groups, CAT activity was decreased in both MPS VI and MPS I and the TBARS dosage was increased in both MPS compared to controls. From this study, it was possible to standardize and improve new techniques for laboratory diagnosis for MPS I, VI and VII, besides introducing oxidative stress as a possible marker in the use of enzyme replacement therapy.

Key words: mucopolysaccharidoses, dried blood spots, universal extraction buffer, α -iduronidase, arylsulfatase B, β -glucuronidase.

LISTA DE ABREVIATURAS

AH: ácido hialurônico

ASB: arilsulfatase B

C4S: condroitin-4-sulfato

C6S: condroitin-6-sulfato

CAT: catalase

CS: condroitin sulfato

DLD: Doenças Lisossômicas de Depósito

DS: dermatan sulfato

EIM: Erros Inatos do Metabolismo

EO: estresse oxidativo

EROS: espécies reativas ao oxigênio

GAGS: glicosaminoglicanos

GUSB: beta-glicuronidase

HS: heparan sulfato

IDUA: alfa-iduronidase

Km: constante de Michaelis-Menten

MPS I: Mucopolissacaridoses tipo I

MPS VI: Mucopolissacaridoses tipo VI

MPS VII: Mucopolissacaridoses tipo VII

MPS: Mucopolissacaridoses

MS/MS: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas

QS: queratan sulfato

SOD: superóxido dismutase

SPF: sangue impregnado em papel filtro

TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TRE: terapia de reposição enzimática

TU: tampão universal

V_{máx}: velocidade máxima

1 INTRODUÇÃO

1.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO

Os erros inatos do metabolismo (EIM) são um grupo fenotipicamente e geneticamente heterogêneo de doenças que ocorrem devido a alterações gênicas que causam a síntese inadequada de determinada enzima ou defeitos no transporte de proteínas (Karam et al., 2001; Mak et al., 2013). A ausência ou deficiência na atividade enzimática ocasiona o bloqueio de alguma rota metabólica, o que impede ou prejudica a transformação de um substrato em produto. Esse bloqueio pode causar o acúmulo do substrato da enzima deficiente, a falta do produto da reação ou o desvio do substrato para uma rota alternativa, capaz de acumular produtos tóxicos (El-Hattab, 2015; Karam et al., 2001).

Mais de 1000 EIM já foram identificados. Individualmente são raros, porém, em conjunto, possuem uma frequência significativa, tem sido relatado que a incidência cumulativa dos EIM é de mais de 1 em 800 ou 1000 nascidos vivos (El-Hattab, 2015; Mak et al., 2013). Essa incidência pode ser considerada mais alta quando consideramos a dificuldade no diagnóstico dessa classe de doenças. Como os EIM possuem manifestações clínicas em comum com outras doenças, a suspeita clínica de um EIM demora a ser considerada e direcionada para laboratórios especializados, onde geralmente os testes de identificação são realizados. Esses laboratórios devem estar preparados com técnicas de detecção rápidas e precisas para um diagnóstico confiável, o que demanda constante pesquisa e aprimoramento de métodos (de Castilhos et al., 2011).

1.2 DOENÇAS LISSÔMICAS DE DEPÓSITO

As doenças lisossômicas de depósito (DLDs) são um grupo heterogêneo de mais de 50 EIM causados pela ausência ou deficiência de uma ou mais enzimas responsáveis pela degradação e reciclagem de macromoléculas (de Castilhos et al., 2011; Lampe et al., 2013; Wenger et al., 2003). A maioria é de herança autossômica recessiva ou ligada ao cromossomo X e resultam no acúmulo progressivo de metabólitos não degradados ou parcialmente degradados no interior dos lisossomos de várias células, tecidos e órgãos onde a substância deveria ser normalmente catabolizada em maiores quantidades (Lampe et al., 2013; Saudubray e Charpentier, 2014).

As DLDs podem ser classificadas de diferentes modos, sendo que a classificação considerada mais útil é aquela baseada na enzima ou proteína deficiente, sendo que uma mesma enzima pode causar o acúmulo de substratos diferentes. Desse modo, a classificação mais comum e clinicamente aceita é em função do tipo de substrato que se acumula nos lisossomos: esfingolipidoses, mucopolissacaridoses, glicoproteinoses, mucolipidoses, oligossacaridoses e glicogenoses (Ballabio e Gieselmann, 2009; Ferreira e Gahl, 2017; Futerman e van Meer, 2004).

1.3 MUCOPOLISSACARIDOSES

As mucopolissacaridoses (MPS) são DLDs, causadas pela deficiência na atividade de enzimas que catalisam a degradação de glicosaminoglicanos

(GAGs). Essas doenças são crônicas e progressivas e ocorrem por causa do bloqueio na rota de degradação de um ou mais GAGs nos lisossomos das células, resultando na disfunção da célula, tecido e conseqüentemente do órgão (Clarke et al., 2012; Coutinho et al., 2012; Lehman et al., 2011; Neufeld e Muenzer, 2014).

Existem cinco tipos de GAGs: heparan sulfato (HS), condroitin sulfato (CS), dermatan sulfato (DS), ácido hialurônico (AH) e queratan sulfato (QS). Os GAGs são cadeias de heteropolissacarídeos longas, lineares, de carga negativa, compostas por uma unidade de dissacarídeo que se repete e são sulfatados em diferentes graus (exceto AH). Geralmente estão associados a pequenas quantidades de proteínas formando proteoglicanos (Champe et al., 2007; Nelson e Cox, 2008; Smith et al., 2007).

Devido à grande quantidade de cargas negativas essas moléculas se repelem e são cercadas por grande quantidade de moléculas de água, então adquirem uma consistência mucóide, viscosa, que tem função lubrificante e de resistência protegendo, por exemplo, mucosas e fluído sinovial (Champe et al., 2007). Os GAGs, exceto o AH, se originam da clivagem proteolítica de proteoglicanos que existem na matriz extracelular e são direcionados aos lisossomos onde são degradados por hidrolases ácidas (enzimas que têm seu pH ótimo de atividade de aproximadamente 5). A degradação progressiva dos GAGs requer 11 enzimas diferentes: quatro glicosidases, cinco sulfatases, uma endoglicosidase e uma transferase não hidrolítica (Coutinho et al., 2012; Neufeld e Muenzer, 2014).

As MPS foram classificadas em diferentes tipos (Tabela 1), de acordo com a enzima que se encontra deficiente e os graus de comprometimento clínico.

As onze enzimas conhecidas dão origem a sete tipos de MPS (Breier et al., 2017; Cobos et al., 2015; Tomatsu et al., 2013).

Tabela 1: Classificação das mucopolissacarídeos

TIPOS DE MPS	EPÔNIMO	ENZIMA DEFICIENTE	GAGs ACUMULADOS
IH	Hurler	α -L-Iduronidase	DS, HS
IS	Scheie	α -L-Iduronidase	DS, HS
IH/S	Hurler-Scheie	α -L-Iduronidase	DS, HS
II (grave)	Hunter (grave)	Iduronato-2-sulfatase	DS, HS
II (leve)	Hunter (leve)	Iduronato-2-sulfatase	DS, HS
IIIA	Sanfilippo A	Heparan N-sulfatase	HS
IIIB	Sanfilippo B	α -N-Acetilglicosaminidase	HS
IIIC	Sanfilippo C	Acetil-Coa: α -glicosaminaacetiltransferase	HS
IIID	Sanfilippo D	N-Acetilglicosamina-6-sulfatase	HS
IVA	Morquio A	N-acetilgalactosamina-6-sulfatase	QS, C6S
IVB	Morquio B	β -galactosidase	QS
V	não utilizado,	-	-
VI	Maroteaux-Lamy	N-acetilgalactosamina-4- sulfatase	DS
VII	Sly	β -glicuronidase	DS, HS, C4S, C6S
VIII	não utilizado	-	-
IX	Natowicz	Hialuronidase	AH

Fonte: adaptada de Neufeld e Muenzer, 2014; Muenzer, 2004.

As MPS atingem o organismo de modo sistêmico e progressivo, os indivíduos afetados devem ser acompanhados por uma equipe multidisciplinar a fim de proporcionar tratamentos paliativos e permitir uma melhora na qualidade de vida desses pacientes. O diagnóstico precoce pode adiar ou prevenir o desenvolvimento de patologias irreversíveis e contribuir no prognóstico para as MPS que são passíveis de tratamentos (Coppa et al., 2012; Lehman et al., 2011; Muenzer, 2014).

Alguns tratamentos que permitem a restauração parcial da atividade enzimática ou inibição da síntese de GAGs já são utilizados ou estão em estudo como: terapia de reposição enzimática (TRE), já disponível para MPS I, II, IVA e VI (Auray-Blais et al., 2012; Coutinho et al., 2016; Martell et al., 2011; Politei et al., 2014; Poswar et al., 2017; Tomatsu et al., 2013), transplante de medula óssea (Neufeld e Muenzer, 2014), transplante de células-tronco hematopoiéticas, inibidores da síntese do substrato e terapia gênica (Giugliani et al., 2016; Poswar et al., 2017; Tomatsu et al., 2013).

Apesar desses avanços recentes, a falta de conhecimento sobre a doença, a não especificidade dos sintomas e as manifestações clínicas variáveis, frequentemente impedem o diagnóstico rápido e preciso. Para pacientes com fenótipos leves, o tempo entre a identificação dos primeiros sintomas e o diagnóstico, muitas vezes é de anos, às vezes décadas (Lampe et al., 2013; Lehman et al., 2011).

É importante aprimorar técnicas já existentes de diagnóstico laboratorial para as MPS e também disponibilizar, para a comunidade científica, métodos que diminuam o tempo de análise bem como reduzam o custo da triagem para os indivíduos com suspeita dessas doenças.

1.3.1 MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO I

A mucopolissacaridose tipo I (MPS I) se subdivide em síndrome de Hurler (MPS IH, OMIM #607014), Hurler-Scheie (MPS IH/S, OMIM #607015), ou Scheie (MPS IS, OMIM #607016), forma grave, intermediária e atenuada da doença, respectivamente. É causada pela deficiência da enzima lisossômica α -iduronidase (IDUA, E.C. 3.2.1.76) levando ao acúmulo dos GAGs DS e HS nos lisossomos de indivíduos afetados (Neufeld e Muenzer, 2014).

O diagnóstico da MPS I é confirmado por um nível baixo ou indetectável da enzima IDUA no plasma, leucócitos ou nos fibroblastos da pele, e por uma concentração alta dos GAGs na urina (Neufeld e Muenzer, 2014).

1.3.2 MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO VI

A mucopolissacaridose do tipo VI (MPS VI, OMIM #253200) ou síndrome de Maroteaux-Lamy tem como causa a deficiência na enzima arilsulfatase B (ASB, E.C.3.1.6.12), acumulando apenas DS (Neufeld e Muenzer, 2014; Politei et al., 2014).

O diagnóstico, assim como para as outras MPSs, é realizado através da medida da atividade da enzima deficiente em leucócitos e pela quantidade de GAGs acumulada na urina dos pacientes (Politei et al., 2014; Wood et al., 2012).

1.3.3 MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO VII

A mucopolissacaridose tipo VII (MPS VII, OMIM #253220), denominada síndrome de Sly é causada pela deficiência da enzima β -glicuronidase (GUSB, EC 3.2.1.31), o que impossibilita a degradação de resíduos de ácido glicurônico contido nos GAGs DS, HS e CS. Seu diagnóstico definitivo se dá pela deficiência dessa enzima medida em amostras de leucócitos (Coutinho et al., 2012; Montañó et al., 2016; Nampoothiri et al., 2008; Sly et al., 1973).

1.4 DIAGNÓSTICO DAS MUCOPOLISSACARIDOSES

A partir da suspeita clínica de uma MPS, amostras de urina e sangue devem ser encaminhadas à laboratórios de referência em diagnóstico de DLDs para que a elucidação da doença seja realizada o mais breve possível. A pesquisa laboratorial inicia-se pela identificação de qual GAG se encontra com excreção aumentada na amostra de urina, para então direcionar para a medida da enzima específica que poderá ser realizada em sangue impregnado em papel filtro (SPF) ou em amostras de plasma ou leucócitos. Quando o transporte de amostras for dificultado, o envio de SPF é priorizado na triagem das MPS (Breier et al., 2014; de Castilhos et al., 2011).

A triagem para MPS consiste de testes quantitativos e qualitativos que identificam o aumento e o tipo de GAG acumulado na urina dos indivíduos afetados, podendo distinguir os tipos de MPS, mas não seus subtipos. A dosagem de GAGs e a eletroforese para identificação do tipo de GAG excretado em cada MPS já foram descritas e padronizadas em urina de coleta ocasional, e impregnada em papel filtro (Breier et al., 2014). Assim como em outras DLDs, a

medida da atividade da enzima responsável pelo acúmulo do GAG observado, pode ser realizada em SPF, na triagem para MPS (Breier et al., 2014; de Castilhos et al., 2011).

O diagnóstico definitivo das MPS é realizado por ensaio enzimático e é confirmado quando há um nível baixo ou indetectável da atividade da enzima envolvida em cada doença em amostras de plasma, leucócitos ou fibroblastos da pele correlacionando com a concentração elevada de GAGs na urina e com os achados clínicos (Muenzer, 2004; Schwartz, 2001).

Recentemente algumas técnicas espectrofluorimétricas de quantificação da medida das atividades enzimáticas em SPF, no diagnóstico das MPS, foram aprimoradas e tiveram seus parâmetros bioquímicos estudados (Breier et al., 2017; Castilhos et al., 2014) para a utilização no diagnóstico dessas doenças visando a redução do tempo de análises. Além de técnicas espectrofluorimétricas, também são utilizadas técnicas de análises em cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (MS/MS) na medida da atividade enzimática em SPF. A maior limitação do método de MS/MS se refere a possibilidade de obter-se resultados falso negativos em indivíduos com fenótipos leves (Tomatsu et al., 2013).

1.5 TÉCNICAS EM SANGUE IMPREGNADO EM PAPEL FILTRO

Nos últimos anos, técnicas de medida da atividade enzimática em SPF foram desenvolvidas e padronizadas com o objetivo de triar indivíduos afetados com DLDs, incluindo as MPS (Castilhos et al., 2014; Chamoles et al., 2001; Civallero et al., 2006). As amostras de SPF são utilizadas apenas como

metodologia de triagem e não como diagnóstico final, pois as quantificações espectrofluorimétricas realizadas através da clivagem de um substrato artificial (geralmente ligado a um radical 4-metilumbeliferil) medem a atividade enzimática total e não a específica como em leucócitos, plasma ou fibroblastos. Resultados falso-positivos podem então, ser encontrados nas técnicas realizadas com amostras de SPF, devido a variações no volume de sangue impregnado no papel, tamanho do picote, modo de eluição do picote e tempo e temperatura de armazenamento (Goldim et al., 2012; Reuser et al., 2011).

Apesar das dificuldades encontradas no uso dessas amostras, elas possuem vantagens em comparação com as amostras de sangue total e fibroblastos, pois são de fácil transporte, podem ser enviadas sem necessidade de refrigeração (Rodrigues et al., 2009), são de fácil armazenagem, preservam a atividade de algumas enzimas por seis meses em temperatura ambiente e até dois anos a 4°C (de Castilhos et al., 2011) e utilizam menor volume de reagentes (Civallero et al., 2006). Além disso, a metodologia em SPF reduz o tempo de análise, pois elimina as etapas de separação e lise de leucócitos ou de cultura de fibroblastos permitindo menor manipulação e perda de material.

Como a maioria das MPS atualmente possui tratamento ou esse encontra-se em estudos clínicos para sua implantação, e esse tratamento melhora a qualidade de vida dos portadores retardando o progresso da doença, torna-se imprescindível o uso de uma triagem rápida e efetiva. A medida da atividade enzimática em SPF tem então por vantagem, facilitar o envio de amostras de diferentes locais do Brasil e de outros países para laboratórios de referência e pesquisa de doenças lisossomais, facilitando assim o diagnóstico da MPS e conseqüentemente a precoce implantação do tratamento (Coutinho et al., 2012).

1.6 TAMPÃO UNIVERSAL

As técnicas para medida da atividade enzimática em SPF, tanto espectrofluorimétricas como em MS/MS, normalmente utilizam um ou mais picotes para a medida de uma única enzima por vez. Isso aumenta a quantidade de material biológico a ser utilizado, principalmente se estamos realizando a triagem de mais de uma MPS.

Para facilitar e ampliar o uso de uma mesma amostra de SPF para a triagem de mais de uma doença, já foi proposto por alguns autores o uso do tampão universal (TU) em técnicas de MS/MS (Chace e Kalas, 2005; Li et al., 2004a). Essas técnicas utilizam um tampão para eluir um único picote de SPF e assim determinar a atividade enzimática de mais de uma enzima.

A vantagem do uso desse tampão em técnicas espectrofluorimétricas, principalmente naquelas de triagem para MPS, é que além de podermos utilizar um mesmo picote para triar mais de uma MPS diminuindo os custos do exame, a espectrofluorimetria é bem mais acessível, principalmente em laboratórios que não possuem equipamentos mais caros e complexos como um espectrômetro de massa.

O TU é uma solução utilizada como tampão de eluição único com a função de reidratar amostras de sangue que foram impregnadas em papel filtro. A utilização desse tampão para eluição de uma amostra de SPF possibilita a quantificação de diversas enzimas a partir do mesmo eluato e reduz o volume de amostra necessário para esses ensaios. O emprego desse tipo de tampão foi descrito por Li et al. (2004b) para realização de um ensaio *multiplex* para cinco

enzimas lisossômicas através de espectrofotometria de massa e era constituído de fosfato de sódio 20 mmol/L pH 7,0.

Muitos estudos de triagem na área de DLD aplicaram o uso de TU para investigação de doenças como Gaucher, Pompe, Fabry, MPS I, Krabbe e Niemann-Pick A/B (Duffey et al., 2010; Gelb et al., 2006; Li et al., 2004b; Metz et al., 2011; Zhang et al., 2008) para quantificação das atividades enzimáticas lisossomais em SPF por técnicas de espectrometria de massas. A principal vantagem dessas técnicas é a pequena quantidade de amostra para realização do ensaio, reduzindo a quantidade de amostra utilizada e aumentando a segurança dos resultados uma vez que a eluição reduz as variações causadas pela distribuição não homogênea do sangue pelo papel filtro (Duffey et al., 2010; Li et al., 2004a). Porém o custo do equipamento (espectrofotômetro de massa) é muito alto, o que deixa esse tipo de técnica inviável para pequenos centros de diagnóstico.

Para uma eluição eficiente do SPF muitos fatores são críticos, como tamanho do picote, volume do TU, melhor tempo e temperatura de eluição e melhor tempo e temperatura de armazenamento das amostras eluídas em TU. É necessário eleger as condições que forneçam uma atividade enzimática específica compatível com o ensaio realizado individualmente e, na medida do possível, com uma alta leitura de atividade para todas as enzimas em análise (Li et al., 2004b). A análise do efeito de tempo e temperatura de eluição do picote de SPF em TU para a medida de atividades enzimáticas por espectrofluorimetria já foi realizado por nosso grupo de pesquisa utilizando-se a medida da atividade das enzimas beta-glicosidase e quitotriosidase visando o diagnóstico da Doença de Gaucher e apresentou resultados promissores (Goldim et al., 2012).

1.7 MARCADORES BIOQUÍMICOS NO ESTUDO DAS DLDs

Um biomarcador é geralmente um analito que indica a presença, extensão e progresso de um processo biológico que está diretamente ligado às manifestações clínicas e ao desfecho de uma doença. Os biomarcadores têm relevância nas DLDs devido ao desenvolvimento de medidas terapêuticas principalmente a TRE. Existem dois tipos principais, o grupo de moléculas onde o acúmulo aumenta como resultado da função lisossomal defeituosa e representam o armazenamento do substrato da enzima ou proteína deficiente na doença e o grupo que tem relação indireta entre o biomarcador e o defeito lisossômico e reflete os efeitos nas funções da célula, tecido e órgão (Bobillo Lobato et al., 2016; Clarke et al., 2012).

O principal marcador bioquímico das MPS é a identificação dos GAGs que se acumulam nos lisossomos. Os GAGs podem ser identificados na urina de indivíduos afetados, onde são parcialmente excretados. A identificação do aumento de excreção e do tipo de GAG facilita o início do diagnóstico por auxiliar na distinção dos diferentes tipos de MPS e a sua quantificação é importante no acompanhamento do tratamento com TRE, embora já esteja comprovado que depois de um certo tempo de tratamento, ocorre uma estabilização na quantidade de GAG excretado e esse marcador deixa de auxiliar na resposta ao tratamento (Clarke et al., 2012; Lawrence et al., 2014). Esse biomarcador torna-se ineficiente somente nos casos de MPSs que acumulam o mesmo tipo de GAG como a MPS I e II, por exemplo.

Além desse marcador bioquímico podemos considerar o estudo da cinética enzimática como metodologia simples e capaz de diferir indivíduos afetados, heterozigotos e normais, e o estresse oxidativo como marcador indireto da progressão da doença.

1.7.1 ESTRESSE OXIDATIVO COMO MARCADOR BIOQUÍMICO NAS MUCOPOLISSACARIDOSES

Os níveis elevados de espécies reativas de oxigênio (EROS) têm sido associados ao estresse oxidativo (EO) e a inflamação, sendo resultado das alterações das características celulares, causadas por mudanças nas vias metabólicas de indivíduos com EIM (Donida et al., 2015; Preissler et al., 2016; Sirtori et al., 2005). Já existem trabalhos na literatura associando o EO com algumas DLDs (Chimenti et al., 2015; Mello et al., 2015; Müller et al., 2012; Ribas et al., 2012; Roversi et al., 2006). O envolvimento de EROS com MPS já foi descrito para o tipo I (Campos e Monaga, 2012; Pereira et al., 2008; Reolon et al., 2009) tipo II (Filippon et al., 2011; Negretto et al., 2014), tipo IIIA (Arfi et al., 2011), tipo IIIB (Villani et al., 2009) e tipo IVA (Donida et al., 2015).

Dentre as principais defesas antioxidantes do organismo estão as enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) (Halliwell, 1994). A SOD converte ânion superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2) como um substrato para a catalase, que converte o H_2O_2 em água e uma molécula de oxigênio. (Filippon et al., 2011; Kolling et al., 2014; Rahman, 2007). Para a determinação de peroxidação lipídica se utiliza como biomarcador a

medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Vasconcelos et al., 2007).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Aperfeiçoar o diagnóstico bioquímico das Mucopolissacaridoses dos tipos I, VI e VII, estabelecendo o uso do tampão fosfato de sódio 20 mmol/L pH 7,0 (tampão universal), bem como a avaliação de parâmetros de estresse oxidativo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Capítulo I:

1. Aprimorar a técnica de medida de atividade enzimática da beta-glicuronidase (MPS VII) reduzindo a quantidade de reagentes e o tamanho dos picotes de sangue impregnado em papel filtro;
2. Determinar os parâmetros bioquímicos de pH ótimo, K_m (constante de Michaelis-Menten), $V_{máx}$ (velocidade máxima), termoestabilidade e tempo e temperatura de armazenamento da beta-glicuronidase;
3. Estabelecer um intervalo de referência para a atividade da beta-glicuronidase em amostras de indivíduos saudáveis.

Capítulo II:

1. Medir a atividade enzimática em sangue colhido em papel filtro das enzimas deficientes na MPS I, VI e VII com o uso do Tampão Universal preparado com Fosfato de Sódio 20mmol/L pH 7,0;
2. Correlacionar a medida da atividade das enzimas em tampão universal com a técnica espectrofluorimétrica já padronizada para cada enzima em sangue impregnado em papel filtro de 1,2mm em amostras de indivíduos saudáveis.

Capítulo III:

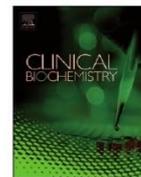
1. Medir as atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) e medir substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no plasma de indivíduos com MPS VI;
2. Comparar esses parâmetros com aqueles de indivíduos com MPS I e controles saudáveis.

Capítulo I

Artigo: Beta-glucuronidase activity in dried blood spots: Reduced technique with biochemical parameters determined

Publicado em Cínical Biochemistry

Cé, J., Rodrigues, M.T., Käfer, E.T., da Costa Moraes, V., Coelho, J.C., 2017. Beta-glucuronidase activity in dried blood spots: Reduced technique with biochemical parameters determined. Clin. Biochem., 50:1243-1248. doi:10.1016/j.clinbiochem.2017.09.022



Beta-glucuronidase activity in dried blood spots: Reduced technique with biochemical parameters determined

Jaqueline Cé^a, Melissa Tôrres Rodrigues, Eduarda Tassoni Käfer, Vitória da Costa Moraes, Janice Carneiro Coelho

Graduate Program in Biological Sciences: Biochemistry, Department of Biochemistry, Institute of Basic Healthcare Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

ARTICLE INFO

Keywords:

Mucopolysaccharidoses
Beta-glucuronidase
Dried blood spots
Sly syndrome

ABSTRACT

Introduction: Mucopolysaccharidoses (MPS) occur due to deficiency in the activity of enzymes that catalyze the breakdown of glycosaminoglycans. MPS VII is caused by deficiency of the beta-glucuronidase enzyme (GUSB). **Objectives:** This study aimed to enhance the technique to measure GUSB activity by reducing the amount of reagents and the size of the DBS, as well as to determine some biochemical parameters of enzyme of healthy individuals.

Methods: The measurement of GUSB in 3 and 1.2 mm DBS (with reagents reduced 2.5- and fourfold) was correlated and the precision of the technique was tested. Optimal pH, Km and Vmax, and thermostability parameters were determined and time and temperature of sample storage were established.

Results: The correlations among the techniques were significant. Although the correlation coefficient was similar, fourfold reduction was selected. pH 4.4 had the highest enzyme activity. GUSB's Km was 1.25 mM, while Vmax was 594.48 nmol/h/mL. After pre-incubation of the sample at 60 °C, its activity dropped from 100% to 15.8% at 120 min. GUSB activity significantly decreased after 45 days of storage at 4, 25, and 37 °C.

Conclusions: This research allowed a previously described technique for MPS VII diagnosis to be adapted for smaller amounts of sample and reagents. That will facilitate the use of smaller amounts of samples, which may be used for other techniques and to save material. Given the importance of early MPS VII diagnosis due to the severity of the disease, using reliable diagnostic techniques in DBS is essential.

1. Introduction

Mucopolysaccharidoses (MPS) are inborn errors of metabolism, more specifically belonging to the group of lysosomal storage diseases (LSD), which occur due to deficiency in the activity of enzymes that catalyze the breakdown of glycosaminoglycans (GAGs) [1]. Mucopolysaccharidosis VII (MPS VII, OMIM #253220), called Sly syndrome, is caused by deficiency of the beta-glucuronidase enzyme (GUSB, EC 3.2.1.31) [1], which prevents the breakdown of glucuronic acid residues contained in the glycosaminoglycans dermatan sulfate, heparan sulfate, and chondroitin sulfate [2–5].

In most LSDs, the final diagnosis, determined by deficiency in enzyme activity measured in leukocytes samples [6], is performed during childhood and adulthood. However, persons affected by MPS VII may have hydrops fetalis at birth and survive for only a few months and only in rare cases do patients, with mild manifestations, survive [5,7].

The use of dried blood spots on filter paper (DBS) to measure enzyme activity in suspected LSD has been described [8–12] as advantageous compared to other samples such as leukocyte separation or fibroblast culture. Besides eliminating those steps of procedures, the methods in DBS allow a smaller volume of samples and reagents to be used, which enable several analyses to be performed simultaneously. Saving material for the investigation of other diseases and the ease of transportation and storage, allied to the fact the material for analysis can be collected right after birth, are additional upsides of the method [9]. Techniques with DBS are suitable for LSD screening, but positive diagnosis should be confirmed in plasma or leukocyte samples [13].

This study aimed to enhance the technique to measure GUSB enzyme activity by reducing the amount of reagents and the size of the DBS, as well as to determine the biochemical parameters of Km (Michaelis-Menten constant), Vmax (maximum velocity), thermostability, and sample storage time and temperature, therefore

Abbreviations: MPS, Mucopolysaccharidoses; GAGs, glycosaminoglycans; MPS VII, Mucopolysaccharidosis type VII; GUSB, beta-glucuronidase; Km, Michaelis-Menten constant; Vmax, maximum velocity; DBS, dried blood spots on filter paper; ANOVA, analysis of variance

* Correspondence to: Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600, anexo, Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil.

E-mail address: jaquelinece@gmail.com (J. Cé).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2017.09.022>

Received 25 May 2017; Received in revised form 20 September 2017; Accepted 25 September 2017

Available online 27 September 2017

0009-9120/ © 2017 The Canadian Society of Clinical Chemists. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

establishing a reference range for the enzyme's activity in samples of healthy individuals.

2. Materials and methods

2.1. Sample collection and storage

Sample size was estimated as at least eight samples to make up the analysis group using the statistical software MiniTab®16. The standard deviation of alpha-iduronidase enzyme activity in persons affected with mucopolysaccharidosis I was considered with margin of error of 5%. The sample n was described per experiment.

The blood samples employed were obtained from volunteer participants invited to take part in the research at the Blood Bank of the Clinics Hospital of Porto Alegre. Ten millilitres of blood were collected with heparin anticoagulant from each subject. The samples were homogenized and a disposable Pasteur pipette was used to place two drops of blood in each circle of a card made of Whatman 903® filter paper. This paper was dried at room temperature and stored in plastic bags containing desiccant at the temperature and times of each test.

2.2. Measuring GUSB enzyme activity

Enzyme activity measurement was adapted from the fluorimetric technique in 3 mm DBS described by Civallero et al. [8] using the artificial 4-methylumbelliferyl-beta-D-glucuronic acid substrate (Sigma). GUSB activity was expressed as nmol/h/mL.

2.3. Standardizing the technique to measure GUSB activity using 1.2 mm dried blood spots

Punch size was reduced from 3 mm to 1.2 mm and the reagents were reduced 2.5-fold and fourfold (Table 1). Pearson correlation tests were performed in 14 samples between the measure of GUSB activity in 3-mm DBS samples and the same activity in 1.2-mm DBS with reagents reduced 2.5-fold and in 1.2-mm DBS with reagents reduced fourfold. All fluorimetric analyses were performed in 96-well fluorimetric plates (OptiPlate-96 F, Perkin Elmer) and fluorescence was read in a Spectramax M5 (SpectraMax M5 Multi-Mode Microplate Readers - Molecular Devices).

2.4. Coefficients of variation to validate the GUSB enzyme activity measurement technique using lower amounts of reagents

After the methods were developed, the technique with the reagents reduced fourfold was selected and the technique's precision was verified by determining the inter-assay, interpersonal, and intra-assay coefficients of variation (CV) using ten DBS samples of healthy individuals.

Ten 1.2-mm DBS punches were used and enzyme activity was measured in the same enzymatic reaction, as a single test, to determine the intra-assay CV. In order to establish the inter-assay CV, enzymatic reactions were performed on five different days using the same DBS samples. The interpersonal CV analysis compared the results obtained in the analysis of the samples by two researchers simultaneously.

Table 1
Miniaturization of GUSB activity measurement method.

Reagents	3 mm	1.2 mm ^a	1.2 mm ^b
Water (µL)	50	20	12.5
DBS sample (mm)	3	1.2	1.2
4-Methylumbelliferil-β-D-glicuronic acid 10 mM (µL)	50	20	12.5
Incubation time (h) at 37 °C	2	4	4
Ethylenediamine 0.13 mol/L pH 11.3 (µL)	300	120	75

^a Reduced 2.5 times.

^b Reduced 4.0 times.

2.5. Determining GUSB's optimal pH

In order to determine GUSB's optimal pH, a 0.1 M sodium acetate buffer was prepared, which was used to solubilize the enzyme substrate at pH 2.0, 3.0, 4.0, and 5.0. After this first analysis, pH values were limited to 4.0, 4.2, 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2, and 5.4.

2.6. Determining GUSB's Km and Vmax

To determine the Michaelis-Menten curve (substrate curve), solutions of the 4-methylumbelliferyl-beta-D-glucuronic acid substrate were prepared at 1.25, 2.50, 5.0, 10.0, and 12.5 mM through dilution in pH 4.4 0.1 M sodium acetate buffer. After the substrate curve was obtained, linearity was observed and new substrate concentrations points were established (0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, and 1.50) to determine the reaction's Km and Vmax. Those parameters were calculated using the Lineweaver-Burk plot.

2.7. Studying the effect of temperature (thermostability) on GUSB activity

In order to study the effect of temperature on GUSB activity, first an inactivation temperature curve was built for the enzyme. The 1.2-mm blood-impregnated paper filter samples of healthy individuals underwent pre-incubation in a water bath (Marconi-MA 127) for 30 min at 40 °C, 50 °C, 60 °C, and 70 °C. After this period, enzyme activity was measured. The activity of the samples incubated at the aforementioned temperatures was compared with activity considered 100% (4 °C in pre-incubation for 30 min).

After the temperature curve was built, the temperature of 60 °C was chosen, whose samples best responded to inactivation, to proceed with the GUSB thermostability assays. For the GUSB thermostability assay, the samples were pre-incubated for 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, and 120 min at 60 °C prior to the assay to measure enzyme activity. The result of those samples incubated at 4 °C was considered 100% enzyme activity, i.e., total activity with no enzyme inactivation.

2.8. Establishing GUSB's reference range

GUSB's enzyme activity reference range was established based on 50 DBS samples of healthy individuals. The analyses were carried out using the miniaturized technique with the volume of reagents reduced fourfold.

2.9. Testing storage time and temperature

The storage time and temperature experiments were carried out by storing blood-impregnated paper filter samples from 12 individuals at –20 °C, 4 °C, 25 °C, and 37 °C and measuring the enzyme activity at 0, 7, 14, 30, 45, and 60 days of storage.

2.10. Statistical analysis

The data were expressed as means ± standard deviation. In order to assess the association among the techniques, Pearson correlation coefficient was employed. The selected technique was validated by calculating the intra-assay, inter-assay, and interpersonal coefficients of variation, while the kinetic parameters Km and Vmax were calculated using Lineweaver-Burk plot.

The thermostability results obtained from the samples were compared using one-way ANOVA followed by Bonferroni test and the storage time and temperature analyses were compared using two-way ANOVA at $p < 0.05$. All analyses were performed using the software GraphPad Prism version 5.03.

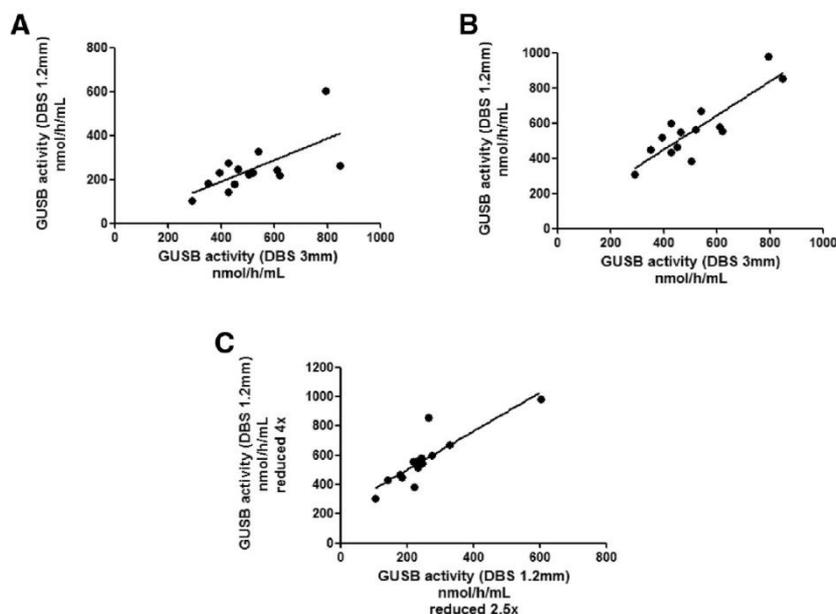


Fig. 1. Pearson correlation among the methods. A) 1.2 mm DBS with reagent volume reduced 2.5-fold \times 3 mm DBS; Pearson's $r = 0.6640$, $p < 0.0096$; B) 1.2 mm DBS with reagent volume reduced fourfold \times 3 mm DBS; Pearson's $r = 0.8654$, $p < 0.0001$; and C) 1.2 mm DBS with reagent volume reduced fourfold \times 1.2 mm DBS with reagent volume reduced 2.5-fold; Pearson's $r = 0.8639$, $p < 0.0001$.

3. Results

3.1. Correlation between 3 mm and 1.2 mm samples

The result of the correlation of 3 mm \times 1.2 mm DBS with reagent volume reduced 2.5-fold was significant (Pearson's $r = 0.6640$, $p < 0.0096$), with positive correlation (Fig. 1A). The test with 1.2 mm DBS with reagent volume reduced fourfold also had a significant positive correlation with the 3 mm DBS technique (Pearson's $r = 0.8654$, $p < 0.0001$) (Fig. 1B). A positive correlation was also obtained between the two miniaturized methods, i.e., 1.2 mm DBS reduced 2.5-fold \times 1.2 mm DBS reduced fourfold (Pearson's $r = 0.8639$, $p < 0.0001$) (Fig. 1C). Pearson's correlations were positive for both 2.5-fold and 4-fold reduction of reagents. Facing to these results, we decided to choose a 4-fold reduction to continue this work, because it is more favorable in terms of costs and quantity of reagents.

3.2. Validations (coefficients of variation)

In order to validate the technique to measure GUSB activity in 1.2 mm DBS, we measured three coefficients of variation. The following results were obtained: intra-assay coefficient: 9.3%, inter-assay coefficient: 11.9%, and interpersonal coefficient: 9.4%.

3.3. Optimal pH determination

By measuring the enzyme activity with 0.1 M sodium acetate buffer with pH 2.0, 3.0, 4.0, and 5.0 (Fig. 2A), we observed that pH 4.0 showed the highest enzyme activity. Fig. 2A shows that the technique does not work at pH 2.0 or 3.0. When the pH range studied was narrowed, it was found that the enzyme had its highest activity at pH 4.4, which was then considered the enzyme's optimal pH (Fig. 2B).

3.4. Determining GUSB's Km and Vmax

After the GUSB substrate curve was built, as seen in Fig. 3, its linearity was chosen to proceed with the study of the enzyme's Km and Vmax. GUSB's Km in DBS of healthy individuals was calculated at 1.25 mM while Vmax was 594.48 nmol/h/mL.

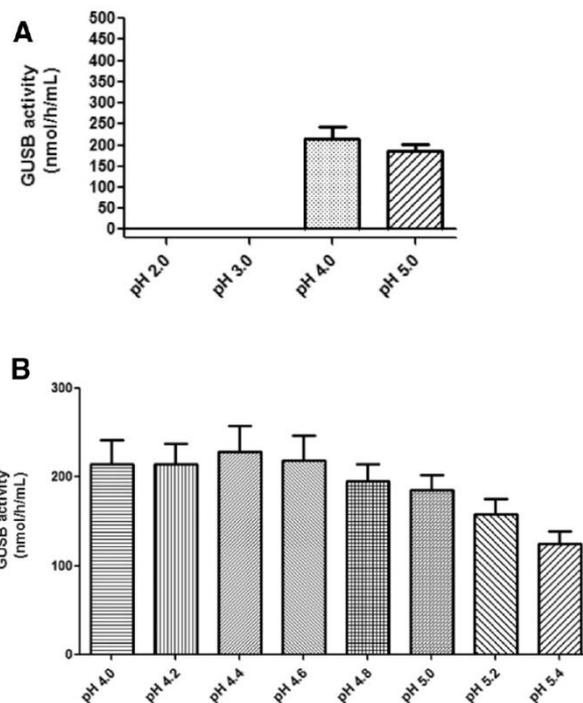


Fig. 2. Determination of the optimal pH of the beta-glucuronidase enzyme. A) broader pH range. B) narrower pH range.

3.5. Reference range of GUSB activity

The mean enzyme activity was 511.1 nmol/h/mL with standard deviation of 133.3 nmol/h/mL, for a minimum value of 174.4 nmol/h/mL and the maximum of 781.9 nmol/h/mL. The results of all individuals can be seen in Fig. 4.

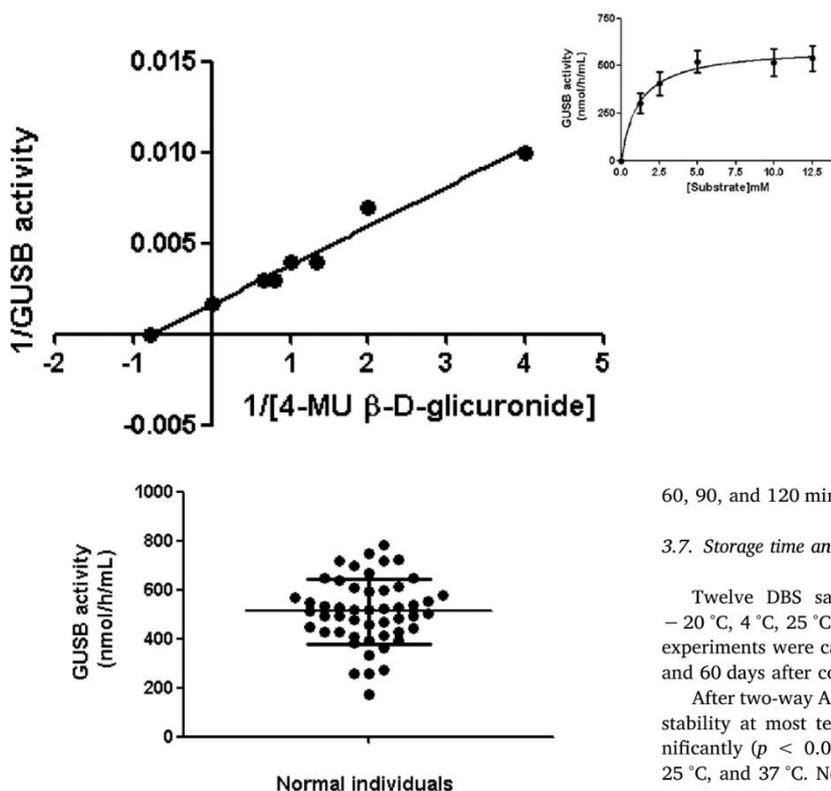


Fig. 3. Substrate curve of the beta-glucuronidase enzyme and determination of K_m and V_{max} of the beta-glucuronidase enzyme expressed according to Lineweaver-Burk plot.

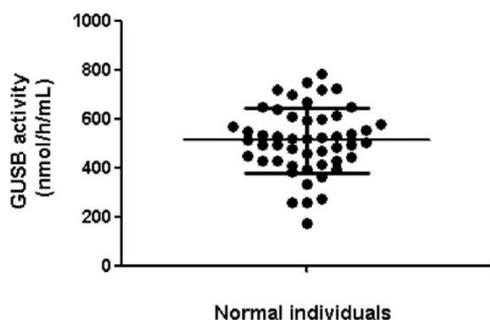


Fig. 4. Reference range of the beta-glucuronidase enzyme in healthy individuals.

3.6. Studying the effect of temperature (thermostability) on GUSB activity

The mean GUSB activities the DBS samples subjected to 30 min pre-incubation at 40 °C, 50 °C, 60 °C, and 70 °C were 111.10%, 99.6%, 84.3%, and 80.8%, respectively, compared to the activity considered 100% (4 °C in pre-incubation). This way, the temperature of 60 °C was determined for the study of heat inactivation.

GUSB mean residual activities after 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, and 120 min pre-incubation at 60 °C compared with the samples that did not undergo this thermal treatment (100% activity) were 119.6%, 102.5%, 93.8%, 84.3%, 75.7%, 44.3%, 21.2%, and 15.8%, respectively (Fig. 5). Enzyme activity continuously drops at the times studied between 5 and 120 min and GUSB activity inactivation was significant at

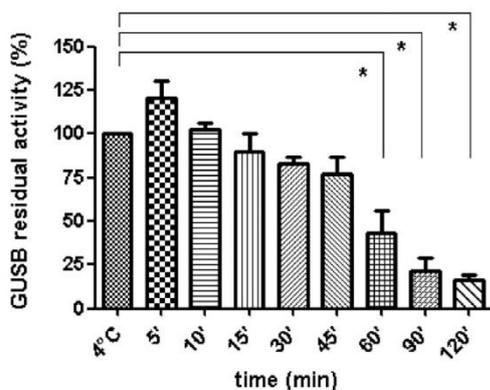


Fig. 5. Thermostability of the beta-glucuronidase enzyme at 60 °C. Statistically significant differences compared to 100% activity (4 °C) (* $p < 0.05$).

60, 90, and 120 min.

3.7. Storage time and temperature

Twelve DBS samples from healthy individuals were stored at -20 °C, 4 °C, 25 °C, and 37 °C until GUSB activity was measured. The experiments were carried out in 1.2 mm DBS samples 0, 7, 14, 30, 45, and 60 days after collection (Fig. 6).

After two-way ANOVA, the results obtained showed enzyme activity stability at most temperatures and times studied. GUSB activity significantly ($p < 0.05$) decreased only after 45 days of storage at 4 °C, 25 °C, and 37 °C. No significant difference was found in activity measured over the 60 days of storage at -20 °C and GUSB remained stable throughout this period at that temperature.

4. Discussion

This research was carried out aiming to reduce the use of reagents and blood-impregnated paper filter samples to measure GUSB activity, thus leading to lower cost in MPS VII diagnosis. To that end, we used 1.2 mm DBS and reduced the volume of reagents 2.5-fold and fourfold.

The correlation was significant between the GUSB activity results using 3 mm and 1.2 mm DBS with reagent volume reduced either 2.5-fold or fourfold. Such results show GUSB activity can be measured with a smaller DBS diameter and smaller volume of reagents, as has already been done for other lysosomal hydrolases [9,14]. Miniaturizing the MPS VII diagnosis technique allows the sample to be saved to screen for other inborn errors of metabolism, besides saving reagents, which lowers the cost of analysis.

The results obtained in the validation of the miniaturized technique indicate the three coefficients of variation of the intra-assay, inter-assay, and interpersonal analyses are within the acceptable range. That shows the precision and reproducibility of the technique employed and allows to exclude the possible variability caused by collection and DBS

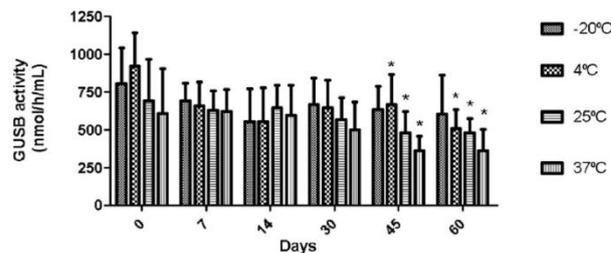


Fig. 6. Statistically different from 100% residual activity (day 0) at the same temperature (* $p < 0.05$).

punch. According to several authors, an acceptable coefficient of variation is up to 20% [10,15,16].

Since both methods with 1.2 mm DBS have a significantly positive correlation with the 3 mm method, the tests to determine optimal pH, kinetic parameters, enzyme thermostability, storage time and temperature, and the reference interval were carried out using the method whose reagent volume had been reduced fourfold.

The enzyme's optimal pH was determined at 4.4. The technique with 3 mm punch described by Civallero et al. [8] uses pH 4.8 for the enzyme assay. That value was chosen for being the same pH used in the technique to measure plasma GUSB activity. For the first time, optimal pH assays have been carried out for the measurement of enzyme activity in blood collected in DBS. Therefore, that was maintained as the pH of the technique.

GUSB's Km in DBS of healthy individuals was calculated at 1.25 mM while Vmax was 594.48 nmol/h/mL. The literature lacks studies reporting kinetic data for this enzyme, hence the values cannot be compared.

GUSB's thermostability was determined by studying the heat inactivation at 60 °C, the same pre-incubation temperature used for the enzyme in leukocytes of heterozygote individuals with Gaucher's disease [17]. The results obtained by one-way ANOVA followed by Bonferroni test show that, at 60 °C, gradual enzyme inactivation occurred from 5 to 120 min and that residual enzyme activity was significantly lower ($p < 0.05$) than at 4 °C (100% activity) from 60 min onwards. Given the near inexistence of living persons with MPS VII in our region, we could not compare the enzyme thermostability in samples of affected individuals. In the future, thermostability assays of the GUSB enzyme in heterozygote persons could be carried out. That would allow separating the groups of healthy individuals from affected ones and their heterozygotes due to whether or not the enzyme was inactivated. Similar studies have been carried out with other lysosomal enzymes (β -glucosidase, chitotriosidase, α -iduronidase), which enables the differentiation of persons who would not be identified by enzyme activity alone [17–19].

When GUSB activity was measured at different temperatures and storage times, we observed values remained stable. From the results presented, we observed that enzyme activity only drops after 45 days of storage at 37 °C. That allows the sample to be collected and stored until it is sent (in no more than 30 days) and, when the sample arrives at the laboratory, it can be stored until the analysis in a refrigerator or freezer. One study carried out with the enzyme arylsulfatase B, deficient in MPS VI, showed it is stable at those temperatures for up to 17 days (time analyzed) and that, when DBS samples were later analyzed at 180 days after collection, even if stored in a refrigerator or freezer, enzyme activity had significantly dropped [20]. GUSB may behave the same way at those temperatures after a longer storage period.

The normality range for GUSB obtained in this study in 1.2 mm DBS (174.4 to 781.9 nmol/h/mL) is closer to that found in plasma (30 to 300 nmol/h/mL) and leukocytes (23 to 151 nmol/h/mg protein) [21] than to that found using the technique by Civallero et al. [8] in 3 mm DBS (4.02 to 21.93 nmol/h/mL). As previously described for other lysosomal enzymes, activity in DBS was close to the one in plasma. In 2004, Wajner et al. described that chitotriosidase enzyme activity in plasma ranged from 8.85 to 132 nmol/h/mL and Goldim et al. [20] observed that, in DBS, it ranged from 0 to 44.5 nmol/h/mL, i.e., close ranges, as observed in the present research. The same was observed for the alpha-iduronidase enzyme. In plasma, its activity ranges from 4.70 to 18.10 nmol/h/mL [22] and, in DBS, from 4.28 to 25.68 nmol/h/mL [9]. From that standpoint, our results in DBS compared to those obtained in plasma match the literature regarding other lysosomal hydrolases. Moreover, this range may facilitate the identification of individuals with milder mutations that might have higher enzyme activities than individuals with severe mutations.

This research allowed a previously described technique for MPS VII diagnosis to be adapted for smaller amounts of sample and reagents.

That will facilitate the use of smaller amounts of samples, which may be used for other techniques and to save material. Given the importance of early MPS VII diagnosis due to the severity of the disease, using reliable diagnosis techniques in DBS is essential.

Acknowledgements

The authors thank CNPq (141795/2014-0) for the financial support and the donors and staff of the blood bank of the Clinics Hospital of Porto Alegre for the blood samples used in this study.

References

- [1] A. Donsante, B. Levy, C. Vogler, M.S. Sands, Clinical response to persistent, low-level beta-glucuronidase expression in the murine model of mucopolysaccharidosis type VII, *J. Inher. Metab. Dis.* 30 (2007) 227–238, <http://dx.doi.org/10.1007/s10545-007-0483-4>.
- [2] M.F. Coutinho, L. Lacerda, S. Alves, Glycosaminoglycan storage disorders: a review, *Biochem. Res. Int.* 2012 (2012) 471325, <http://dx.doi.org/10.1155/2012/471325>.
- [3] F.I. Khan, M. Shahbaaz, K. Bisetty, A. Waheed, W.S. Sly, F. Ahmad, M.I. Hassan, Large scale analysis of the mutational landscape in β -glucuronidase: a major player of mucopolysaccharidosis type VII, *Gene* 576 (2016) 36–44, <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2015.09.062>.
- [4] W.S. Sly, B.A. Quinton, W.H. McAlister, D.L. Rimoin, Beta glucuronidase deficiency: report of clinical, radiologic, and biochemical features of a new mucopolysaccharidosis, *J. Pediatr.* 82 (1973) 249–257, [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-3476\(73\)80162-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-3476(73)80162-3).
- [5] A.M. Montaña, N. Lock-hock, R.D. Steiner, B.H. Graham, M. Szlago, R. Greenstein, M. Pineda, A. Gonzalez-meneses, M. Çoker, D. Bartholomew, M.S. Sands, R. Wang, R. Giugliani, A. Macaya, G. Pastores, A.K. Ketko, F. Ezgü, A. Tanaka, L. Arash, M. Beck, R.E. Falk, K. Bhattacharya, J. Franco, K.K. White, G.A. Mitchell, L. Cimbalistiene, M. Holtz, W.S. Sly, Clinical course of sly syndrome (mucopolysaccharidosis type VII), *J. Med. Genet.* (2016) 403–418, <http://dx.doi.org/10.1136/jmedgenet-2015-103322>.
- [6] T. Shimada, S. Tomatsu, E. Yasuda, R.W. Mason, W.G. Mackenzie, Y. Shibata, F. Kubaski, R. Giugliani, S. Yamaguchi, Y. Suzuki, K. Orii, T. Orii, Chondroitin 6-Sulfate as a Novel Biomarker for Mucopolysaccharidosis IVA and VII, Springer Berlin, Heidelberg, 2014, pp. 15–24, <http://dx.doi.org/10.1007/978-0-2014-311>.
- [7] S. Nampoothiri, M. Kapannayil, K.R. Hiran, V. Sunitha, Sly disease: mucopolysaccharidosis type VII, *Indian Pediatr.* 45 (2008) 859–861.
- [8] G. Civallero, K. Michelin, J. de Mari, M. Viapiana, M. Burin, J.C. Coelho, R. Giugliani, Twelve different enzyme assays on dried-blood filter paper samples for detection of patients with selected inherited lysosomal storage diseases, *Clin. Chim. Acta* 372 (2006) 98–102, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2006.03.029>.
- [9] C.D. Castilhos, J. Mezzalira, M.P.S. Goldim, V.V. Daitx, C. da S. Garcia, C.V. Andrade, A.C. Breier, J. Cé, A.S. Mello, J.C. Coelho, Determination of the lysosomal hydrolase activity in blood collected on filter paper, an alternative to screen high risk populations, *Gene* 536 (2014) 344–347, <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2013.11.011>.
- [10] K.B. Müller, M.D. Rodrigues, V.G. Pereira, A.M. Martins, V. D'Almeida, Reference values for lysosomal enzymes activities using dried blood spots samples - a Brazilian experience, *Diagn. Pathol.* 5 (2010) 65, <http://dx.doi.org/10.1186/1746-1596-5-65>.
- [11] N.A. Chamoles, M.B. Blanco, D. Gaggioli, C. Casentini, Hurler-like phenotype: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper, *Clin. Chem.* 47 (2001) 2098–2102 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11719472>.
- [12] V.R. De Jesus, X.K. Zhang, J. Keutzer, O.A. Bodamer, A. Mühl, J.J. Orsini, M. Caggana, R.F. Vogt, W.H. Hannon, Development and evaluation of quality control dried blood spot materials in newborn screening for lysosomal storage disorders, *Clin. Chem.* 55 (2009) 158–164, <http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2008.111864>.
- [13] C.D. de Castilhos, J. Mezzalira, M.P.S. Goldim, J.C. Coelho, Influence of pre-analytical factors on alpha-galactosidase A, arylsulfatase B and alpha-glucosidase activities measured on dried blood spots on filter paper, *Clin. Biochem.* 44 (2011) 922–926, <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2011.03.138>.
- [14] M.P. de S. Goldim, C. da S. Garcia, C.D. de Castilhos, J.V. Daitx, J. Mezzalira, A.C. Breier, J. Cé, A. Mello, C.V. Andrade, N. Sartori, J.C. Coelho, Screening of high-risk Gaucher disease patients in Brazil using miniaturized dried blood spots and leukocyte techniques, *Gene* 508 (2012) 197–198, <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2012.07.011>.
- [15] P. Olivova, K. van der Veen, E. Cullen, M. Rose, X.K. Zhang, K.B. Sims, J. Keutzer, M.F. Browning, Effect of sample collection on alpha-galactosidase A enzyme activity measurements in dried blood spots on filter paper, *Clin. Chim. Acta* 403 (2009) 159–162, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2009.02.008>.
- [16] Z. Lukacs, P. Nieves Cobos, A. Keil, R. Hartung, E. Mengel, M. Beck, M. Deschauer, F. Hanisch, R. Santer, Dried blood spots in the diagnosis of lysosomal storage disorders-possibilities for newborn screening and high-risk population screening, *Clin. Biochem.* 44 (2011) 467–476, <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2011.03.008>.
- [17] K. Michelin, A. Wajner, H. Bock, Á. Fachel, R. Rosenberg, R. Flores Pires, M.L. Saraviva Pereira, R. Giugliani, J.C. Coelho, Biochemical properties of β -glucosidase in leukocytes from patients and obligated heterozygotes for Gaucher disease

- carriers, *Clin. Chim. Acta* 362 (2005) 101–109, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cccn.2005.06.010>.
- [18] A. Wajner, K. Michelin, M.G. Burin, R.F. Pires, M.L.S. Pereira, R. Giugliani, J.C. Coelho, Biochemical characterization of chitotriosidase enzyme: comparison between normal individuals and patients with Gaucher and with Niemann-Pick diseases, *Clin. Biochem.* 37 (2004) 893–897, <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2004.06.008>.
- [19] J. Mandelli, A. Wajner, R. Pires, R. Giugliani, J.C. Coelho, Detection of mucopolysaccharidosis type I heterozygotes based on the biochemical characteristics of leukocyte β -L-iduronidase, *Arch. Med. Res.* 33 (2002) 20–24, [http://dx.doi.org/10.1016/S0188-4409\(01\)00334-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0188-4409(01)00334-4).
- [20] C.D. de Castilhos, J. Mezzalira, M.P.S. Goldim, J.C. Coelho, Influence of pre-analytical factors on β -galactosidase A, arylsulfatase B and β -glucosidase activities measured on dried blood spots on filter paper, *Clin. Biochem.* 44 (2011) 922–926, <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2011.03.138>.
- [21] A.L. Beaudet, N.M. DiFerrante, G.D. Ferry, B.L. Nichols, C.E. Mullins, Variation in the phenotypic expression of beta-glucuronidase deficiency, *J. Pediatr.* 86 (1975) 388–394 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/803560> (accessed September 18, 2016).
- [22] J.J. Hopwood, V. Muller, A. Smithson, N. Baggett, A fluorometric assay using 4-methylumbelliferyl β -L-iduronide for the estimation of β -L-iduronidase activity and the detection of Hurler and Scheie syndromes, *Clin. Chim. Acta* 92 (1979) 257–265, [http://dx.doi.org/10.1016/0009-8981\(79\)90121-9](http://dx.doi.org/10.1016/0009-8981(79)90121-9).

Capítulo II

Artigo: Spectrofluorimetric Measurement of the Enzyme Activity of Alpha-Iduronidase, Arylsulfatase B, and Beta-Glucuronidase in DBS using Universal Extraction Buffer

Submetido à Clinica Chimica Acta

Cé, J., Coelho, J.C., 2018. Spectrofluorimetric Measurement of the Enzyme Activity of Alpha-Iduronidase, Arylsulfatase B, and Beta-Glucuronidase in DBS using Universal Extraction Buffer

Manuscript Number:

Title: Spectrofluorimetric Measurement of the Enzyme Activity of Alpha-Iduronidase, Arylsulfatase B, and Beta-Glucuronidase in DBS using Universal Extraction Buffer

Article Type: Research Paper

Keywords: mucopolysaccharidoses; alpha-L-iduronidase; arylsulfatase B; beta-glucuronidase; dried blood spots; universal extraction buffer.

Corresponding Author: Miss Jaqueline Cé,

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

First Author: Jaqueline Cé

Order of Authors: Jaqueline Cé; Janice Carneiro Coelho

Abstract: Mucopolysaccharidoses (MPS) are caused by deficiency in the enzyme activity of acid hydrolases, enzymes that catalyze the breakdown of glycosaminoglycans (GAGs) in lysosomes. This study aimed to measure the activity in DBS of deficient enzymes in MPS I (alpha-iduronidase - IDUA), VI (arylsulfatase B - ASB), and VII (beta-glucuronidase - GUSB) using universal extraction buffer (UEB) prepared with 20 mmol/L pH 7.0 sodium phosphate and to correlate this measurement with the one of the spectrofluorimetric technique individually standardized to each enzyme in 1.2 mm DBS in samples of healthy subjects. The mean enzyme activities studied after extraction with UEB were 14.65 nmol/h/mL, 22.51 nmol/h/mL, and 531.92 nmol/h/mL for IDUA, ASB, and GUSB, respectively, whereas the averages with the individual technique were 14.24 nmol/h/mL, 21.64 nmol/h/mL, and 545.64 nmol/h/mL for the same enzymes. After the correlation test, Pearson's coefficients were all positive (IDUA=0.9154, ASB=0.8880, and GUSB=0.9136). The results showed the activity of more than one enzyme can be measured in the same material after they are extracted in a proper buffer. That saves analysis time, use of sample, and amount of reagents, leading to quicker diagnosis, which is essential to initiate treatment earlier and, consequently, for better prognostic.

Suggested Reviewers: Ana Carolina Breier PhD
anacarolina.breier@gmail.com

Alexandre Silva de Mello
Melloas@gmail.com

Adriana Montano
montana@slu.edu

Porto Alegre, January 26th, 2018.

To the attention of Clinica Chimica Acta

Editors-in-Chief

Dear Editors,

We are submitting the manuscript "Spectrofluorimetric Measurement of the Enzyme Activity of Alpha-Iduronidase, Arylsulfatase B, and Beta-Glucuronidase in DBS using Universal Extraction Buffer" to publication in Clinica Chimica Acta.

In this research, we established the use of 20 mmol/L pH 7.0 sodium phosphate buffer (universal extraction buffer) to determine the activities of alpha-iduronidase, arylsulfatase B and beta-glucuronidase by measuring the enzymatic activity in blood collected on filter paper eluted in this buffer and correlated with spectrofluorometric technique already standardized for each enzyme in blood impregnated on 1.2mm filter paper in samples from healthy subjects.

The results obtained will be useful for other researchers working with lysosomal storage diseases can use this and adapt new diagnostic techniques of these disease.

Best regards,

Jaqueline Cé, MSc.

Janice C. Coelho, PhD.

Department of Biochemistry
Federal University of Rio Grande do Sul
Rua Ramiro Barcelos, 2600 anexo
90035-003 – Porto Alegre – RS, Brazil
e-mail: jaquelinece@gmail.com
phone: +55 51 33085549
fax: + 55 51 33085535

CCA AUTHOR CHECKLIST

This form is to be submitted with the manuscript. Please fill in and check boxes below.

Article Title: Spectrofluorimetric Measurement of the Enzyme Activity of Alpha-Iduronidase, Arylsulfatase B, and Beta-Glucuronidase in DBS using Universal Extraction Buffer

Corresponding Author: MSc Jaqueline Cé

- ✓ **Structured abstract**
- ✓ **Keywords**
- ✓ **References are in journal format. References in text and reference list correspond exactly.**
- ✓ **Quantities and units conform to international practice**

If this paper is a re-submission, please include:

Article Reference Number:

Abstract

Mucopolysaccharidoses (MPS) are caused by deficiency in the enzyme activity of acid hydrolases, enzymes that catalyze the breakdown of glycosaminoglycans (GAGs) in lysosomes. This study aimed to measure the activity in DBS of deficient enzymes in MPS I (alpha-iduronidase – IDUA), VI (arylsulfatase B – ASB), and VII (beta-glucuronidase – GUSB) using universal extraction buffer (UEB) prepared with 20 mmol/L pH 7.0 sodium phosphate and to correlate this measurement with the one of the spectrofluorimetric technique individually standardized to each enzyme in 1.2 mm DBS in samples of healthy subjects. The mean enzyme activities studied after extraction with UEB were 14.65 nmol/h/mL, 22.51 nmol/h/mL, and 531.92 nmol/h/mL for IDUA, ASB, and GUSB, respectively, whereas the averages with the individual technique were 14.24 nmol/h/mL, 21.64 nmol/h/mL, and 545.64 nmol/h/mL for the same enzymes. After the correlation test, Pearson's coefficients were all positive (IDUA=0.9154, ASB=0.8880, and GUSB=0.9136). The results showed the activity of more than one enzyme can be measured in the same material after they are extracted in a proper buffer. That saves analysis time, use of sample, and amount of reagents, leading to quicker diagnosis, which is essential to initiate treatment earlier and, consequently, for better prognostic.

Keywords: mucopolysaccharidoses, alpha-L-iduronidase, arylsulfatase B, beta-glucuronidase, dried blood spots, universal extraction buffer.

*Highlights

Highlights:

- Measuring ASB, IDUA, and GUSB activity in DBS with universal extraction buffer (UEB) was proposed
- Activities in UEB were compared with standard 1.2 mm DBS activities
- Both techniques have positive Pearson's correlation and the same mean activities
- Results shows that it is possible to measure the activities together after extraction
- With this technique, we reduced time and amount of sample and reagents, leading to quicker diagnostic

Spectrofluorimetric Measurement of the Enzyme Activity of Alpha-Iduronidase, Arylsulfatase B, and Beta-Glucuronidase in DBS using Universal Extraction Buffer

Jaqueline Cé and Janice Carneiro Coelho.

Graduate Program in Biological Sciences: Biochemistry, Department of Biochemistry, Institute of Basic Healthcare Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

Correspondence to: Jaqueline Cé, MSc

Departamento de Bioquímica
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Rua Ramiro Barcelos, 2600, anexo
Porto Alegre – RS – Brazil
90035-003
Phone: 55 51 33085549
Fax: 55 51 33085535
E-mail: jaquelinece@gmail.com

Abbreviations

4-MU: 4-methylumbelliferone

ASB: arylsulfatase B

DBS: Dried Blood Spots

LSD: lysosomal storage diseases

IEM: inborn errors of metabolism

GAGs: glycosaminoglycans

GUSB: beta-glucuronidase

IDUA: alpha-L-iduronidase

MPS I: mucopolysaccharidosis type I

MPS VI: mucopolysaccharidosis type VI

MPS VII: mucopolysaccharidosis type VII

MPS: mucopolysaccharidoses

MS/MS: tandem mass spectrometry

ERT: enzyme replacement therapy

UEB: Universal Extraction Buffer

Abstract

Mucopolysaccharidoses (MPS) are caused by deficiency in the enzyme activity of acid hydrolases, enzymes that catalyze the breakdown of glycosaminoglycans (GAGs) in lysosomes. This study aimed to measure the activity in DBS of deficient enzymes in MPS I (alpha-iduronidase – IDUA), VI (arylsulfatase B – ASB), and VII (beta-glucuronidase – GUSB) using universal extraction buffer (UEB) prepared with 20 mmol/L pH 7.0 sodium phosphate and to correlate this measurement with the one of the spectrofluorimetric technique individually standardized to each enzyme in 1.2 mm DBS in samples of healthy subjects. The mean enzyme activities studied after extraction with UEB were 14.65 nmol/h/mL, 22.51 nmol/h/mL, and 531.92 nmol/h/mL for IDUA, ASB, and GUSB, respectively, whereas the averages with the individual technique were 14.24 nmol/h/mL, 21.64 nmol/h/mL, and 545.64 nmol/h/mL for the same enzymes. After the correlation test, Pearson's coefficients were all positive (IDUA=0.9154, ASB=0.8880, and GUSB=0.9136). The results showed the activity of more than one enzyme can be measured in the same material after they are extracted in a proper buffer. That saves analysis time, use of sample, and amount of reagents, leading to quicker diagnosis, which is essential to initiate treatment earlier and, consequently, for better prognostic.

Keywords: mucopolysaccharidoses, alpha-L-iduronidase, arylsulfatase B, beta-glucuronidase, dried blood spots, universal extraction buffer.

1 Introduction

Mucopolysaccharidoses (MPS) are inborn errors of metabolism (IEM) and are part of the group of lysosomal storage diseases (LSD). They are caused by deficiency in the activity of acid hydrolases, enzymes that catalyze the breakdown of glycosaminoglycans (GAGs) in lysosomes [1]. Seven types of MPS are caused by deficiency or lack of activity of 11 different enzymes [2–4].

Mucopolysaccharidosis type I (MPS I) is caused by deficiency in the alpha-iduronidase lysosomal enzyme (IDUA, E.C. 3.2.1.76), which leads to storage of GAGs dermatan sulfate and heparan sulfate in the lysosomes of affected subjects [1]. Mucopolysaccharidosis type VI (MPS VI), or Maroteaux-Lamy syndrome, is caused by deficiency in the arylsulfatase B enzyme (ASB, E.C.3.1.6.12), causing the storage of only dermatan sulfate [1,5], while mucopolysaccharidosis type VII (MPS VII), called Sly syndrome, is caused by deficiency in the beta-glucuronidase enzyme beta-glucuronidase, which prevents the breakdown of glucuronic acid residues contained in GAGs dermatan sulfate, heparan sulfate, and chondroitin sulfate [6–9].

MPS have no cure, but treatment for these three types of MPS is available as enzyme replacement therapy (ERT), in which a human recombinant enzyme is produced and regularly injected in the blood of patients, which considerably improves their phenotype and quality of life [10].

Techniques to measure enzyme activity able to decrease the number of steps for MPS screening and that aim to simultaneously analyze the activity of more than one enzyme, resulting in quicker diagnosis, must be considered so that, by speeding up the diagnosis, patients can be referred earlier to the appropriate treatment. Techniques to measure enzyme activity in dried blood spots (DBS), both spectrofluorimetric and as tandem mass spectrometry (MS/MS) normally use one or more DBS punches to measure a single enzyme at a time. That increases the amount of biological material used, particularly when screening for more than one MPS. In order to facilitate and broaden the use of the same DBS sample for screening of more than one disease, some authors have proposed using Universal Extraction Buffer (UEB) using MS/MS techniques [11,12]. Such techniques use a buffer to elute a single DBS punch and determine the activity of more than one enzyme.

Although the use of these techniques in MS/MS has been publicized, their use in spectrofluorimetry to diagnose MPS has not been reported yet. The advantage of using this buffer in spectrofluorimetric techniques, particularly to screen for MPS, is that a single punch can be used to screen for more than one MPS, thus lowering the costs of the exam. Spectrofluorimetry is much more affordable, especially in laboratories that lack more expensive and complex equipment such as a mass spectrometer.

UEB is a solution used as single elution buffer to rehydrate DBS samples. Using this buffer to elute a DBS sample enables quantifying several enzymes from the same eluate, which reduces the volume of sample required for those assays, thus increasing the safety of results since elution reduces the variations caused by the non-homogenous distribution of blood in the filter paper [11,13]. The use of this type of buffer, made of 20 mmol/L pH 7.0 sodium phosphate, was described by Li et al. [14] to carry out a multiplex assay for five lysosomal enzymes using MS/MS.

Many screening studies on LSD have used UEB to investigate diseases such as Gaucher, Pompe, Fabry, mucopolysaccharidosis I, Krabbe, and Niemann-Pick A/B [13–17] to quantify lysosomal enzyme activities in DBS using MS/MS techniques.

Many factors are critical for efficient DBS elution, such as punch size, UEB volume, elution time and temperature, and storage time and temperature of the eluted samples. Conditions that provide specific enzyme activity compatible with the assay must be chosen individually and, as much as possible, with high reading of all enzymes being analyzed [14]. This study aimed to measure the activity in DBS of deficient enzymes in MPS I, VI, and VII using universal extraction buffer prepared with 20 mmol/L pH 7.0 sodium phosphate and to correlate this measurement with the one of the spectrofluorimetric technique individually standardized to each enzyme in 1.2 mm DBS in samples of healthy subjects.

2 Materials and Methods

2.1 Sample Collection and Storage

The study used 20 blood samples from volunteer subjects invited to take part in the research at the Blood Bank of the Clinics Hospital of Porto Alegre. 10 mL of blood were collected from each subject in a tube with heparin anticoagulant. The samples were homogenized and disposable Pasteur pipettes were used to pour two drops of blood onto each circle of the Whatman 903® filter paper card. The cards were dried at room temperature and stored in plastic containers with desiccant in a freezer at -20 °C until the analyses.

2.2 Enzyme Activity Measurement

The analyses in DBS with no UEB were performed in 1.2 mm paper punches (Harris Uni-Core 1.2 mm and 3.0-mm, St. Louis, MO, USA), which were placed in 96-well plates (OptiPlate-96 F, Perkin Elmer) to measure the activity of each of the enzymes. The techniques carried out with UEB used an adaptation of the procedure by Li et al. [14] using two 3 mm punches placed in 96-well plates added with 80 µL 20 mmol/L pH 7.0 sodium phosphate UEB. The plates were covered with aluminum foil and placed in an incubator (Marconi MA-127) under agitation for 1 h at 37 °C. After this period, the eluate of each sample was transferred to a new fluorimetric plate. The activities of the three enzymes studied were measured in this eluate.

The enzyme activities were measured according to the fluorimetric techniques described by Castilhos et al. [18] using 4-methylumbelliferyl α -L-iduronide substrate (Glycosynth, Warrington, England) for alpha-iduronidase and 4-methylumbelliferyl sulfate substrate (Sigma, St. Louis, MO, USA) for arylsulfatase B. GUSB enzyme activity measurement was performed using the fluorimetric technique adapted by Cé et al. [19] using the artificial 4-methylumbelliferyl-beta-D-glucuronic acid substrate (Sigma, St. Louis, MO, USA).

All analyses were performed in duplicate in 96-well fluorimetric plates (OptiPlate-96 F, Perkin Elmer) and fluorescence was read with 365 nm

excitation and 450 nm emission in a Spectramax M5 device (SpectraMax M5 Multi-Mode Microplate Readers - Molecular Devices). The enzyme activities were expressed as nmol/h/mL.

2.3 Statistical Analyses

The data were expressed as means \pm standard deviation. Pearson's correlation coefficient was used to show the association between the techniques while T-test for dependent samples was employed to show the means determined by both techniques do not differ. All analyses were performed using the software GraphPad Prism version 5.03 and the statistical significance was set to $p < 0.05$.

3 Results

3.1 Mean Enzyme Activities

Mean IDUA activity was 14.24 ± 5.13 nmol/h/mL in 1.2 mm DBS and 14.65 ± 4.35 nmol/h/mL in the DBS samples eluted in UEB. The mean ASB activity in 1.2 mm DBS was 21.64 ± 7.46 nmol/h/mL whereas the activity of DBS samples eluted in UEB was 22.51 ± 5.09 nmol/h/mL. The results found for GUSB were 545.64 ± 138.00 nmol/h/mL in 1.2 mm DBS and 531.92 ± 121.05 nmol/h/mL in samples eluted in UEB.

3.2 Correlation between 1.2 mm DBS and DBS Samples Eluted in UEB

A positive correlation was obtained between 1.2 mm DBS and samples eluted in UEB for the IDUA enzyme (Figure 1). The result of Pearson's correlation was $r = 0.9154$ ($p < 0.0001$). The correlation between the ASB measurement (Figure 2) in 1.2 mm DBS and samples eluted in UEB was also positive and significant (Pearson's $r = 0.8880$, $p < 0.0001$). The analysis of GUSB activity in 1.2 mm DBS also yielded a positive correlation (Figure 3) with the DBS samples eluted in UEB (Pearson's $r = 0.9136$, $p < 0.0001$).

3.3 Comparison between the Means of 1.2 mm DBS Samples and DBS Samples Eluted in UEB

A comparison of the mean activity in 1.2 mm DBS and DBS samples eluted in UEB using T-test for dependent samples shows no significant difference between the techniques for all enzymes analyzed (Table 1).

4 Discussion

In this study, UEB use and the manner of elution was adapted to spectrofluorimetric techniques to screen for MPS I, VI, and VII in DBS. By eluting a single punch, aliquots could be used for the three techniques of enzyme activity measurement, thus reducing the amount of sample used and increasing the safety of the results since elution decreases the variations caused by the non-homogenous distribution of blood in the filter paper [11,13].

The use of UEB in spectrofluorimetric techniques was adapted from the use of UEB in MS/MS technique [14]. In recent years, several studies on newborn screening have been carried out with multiplex assays in MS/MS, including the investigation of LSDs [12,13,15–17,20–25]. The use of UEB for elution of DBS punches was initially standardized in MS/MS for Fabry, Gaucher, Krabbe, Niemann-Pick A/B, and Pompe diseases [21] and is currently also used for MPS I in high-demand newborn screening programs. Despite reports that this methodology has been developed in MS/MS for MPS II, IVA, and VI, there are no reports of this screening with other types of MPS [15,20].

MS/MS is an expensive methodology that is not available in most research or small laboratories, mainly in developing countries, and requires complex sample preparation. It has been described that this methodology has the same positive predictive value as the spectrofluorimetric techniques that use 4-methylumbelliferone [26].

The enhancement and development of therapies and their greater availability for the LSD, along with the development of precise diagnosis methods, has led to the quick identification of affected individuals, thus

preventing and minimizing irreversible damages caused by the progression of these diseases [27]. Hence, the development of newborn screening programs with precise techniques aiming to detect treatable diseases before they become symptomatic [21,28], with each laboratory establishing its reference values able to differentiate healthy individuals from affected ones [21], has become essential.

Simultaneous screening for several MPS without the need for automated systems in a single sample may save time, reagents, and labor, besides being less costly [15]. The use of DBS samples in screening provides ease of transport [29], has low cost, and reduces the possibility of contamination [28]. In addition, lysosomal enzymes may remain stable for up to a few years at room temperature [17], which facilitates the transportation and storage of samples in screening laboratories [30].

For the detection of activity of IDUA, ASB, and GUSB in DBS, the punches were rehydrated in 20 mmol/L pH 7.0 sodium phosphate buffer for the extraction of the enzymes and the techniques using 96-well plates with the eluate. This buffer is called universal extraction buffer (UEB).

The enzyme activities obtained with the eluate were compared with those obtained with the standardized techniques that have been well established in the literature using 1.2 mm DBS punches directly. The mean activities found in both methods were statistically equivalent, which indicates enzyme activities can be measured by extracting the sample with UEB. The results of the correlation tests also showed that both techniques are similar, once again confirming that the technique based on the elution of DBS samples in UEB can be safely used to determine the activities of the enzymes studied.

This research, therefore, showed that using a lower amount of DBS and extraction of the sample with a proper buffer enables measuring several enzymes by more than one spectrofluorimetric technique in the same sample or eluate. That saves analysis time, sample use, and requires a lower amount of reagents. Furthermore, less time is required to arrive at a quick and precise diagnostic, which is essential to initiate treatment. We hope this type of analysis can be also used to screen for other LSD in the future.

Acknowledgements

We thank CNPq (process 141795/2014-0) for the financial support of the study and the donors and staff of the Blood Bank of the Clinics Hospital of Porto Alegre for the blood samples used in the research.

References

- [1] E.F. Neufeld, J. Muenzer, The Mucopolysaccharidoses, in: A.L. Beaudet, B. Vogelstein, K.W. Kinzler, S.E. Antonarakis, A. Ballabio, K.M. Gibson, G. Mitchell (Eds.), *Online Metab. Mol. Bases Inherit. Dis.*, The McGraw-Hill Companies, Inc., New York, NY, 2014.
<http://ommbid.mhmedical.com/content.aspx?aid=1102893978>.
- [2] A.C. Breier, J. Cé, J. Mezzalira, V. V. Daitx, V.C. Moraes, M.P.S. Goldim, J.C. Coelho, Alpha-L-iduronidase and arylsulfatase B in dried blood spots on filter paper: Biochemical parameters and time stability, *Clin. Biochem.* 50 (2017) 431–435. doi:10.1016/j.clinbiochem.2016.12.007.
- [3] P.N. Cobos, C. Steglich, R. Santer, Z. Lukacs, A. Gal, Dried blood spots allow targeted screening to diagnose mucopolysaccharidosis and mucopolidosis., *JIMD Rep.* 15 (2015) 123–32.
doi:10.1007/8904_2014_308.
- [4] S. Tomatsu, T. Fujii, M. Fukushi, T. Oguma, T. Shimada, M. Maeda, K. Kida, Y. Shibata, H. Futatsumori, A.M. Montaña, R.W. Mason, S. Yamaguchi, Y. Suzuki, T. Orii, Newborn screening and diagnosis of mucopolysaccharidoses., *Mol. Genet. Metab.* 110 (2013) 42–53.
doi:10.1016/j.ymgme.2013.06.007.
- [5] J. Politei, A. Schenone, M. Blanco, M. Szlago, Mucopolisacaridosis VI: aspectos clínicos, diagnósticos y del tratamiento con terapia de reemplazo enzimático, *Arch Argent Pediatr.* 112 (2014) 258–262.
doi:10.5546/aap.2014.258.
- [6] A.M. Montaña, N. Lock-Hock, R.D. Steiner, B.H. Graham, M. Szlago, R. Greenstein, M. Pineda, A. Gonzalez-Meneses, M. Çoker, D. Bartholomew, M.S. Sands, R. Wang, R. Giugliani, A. Macaya, G. Pastores, A.K. Ketko, F. Ezgü, A. Tanaka, L. Arash, M. Beck, R.E. Falk, K. Bhattacharya, J. Franco, K.K. White, G.A. Mitchell, L. Cimbalistiene, M. Holtz, W.S. Sly, Clinical course of sly syndrome (mucopolysaccharidosis type VII), *J. Med. Genet.* 53 (2016) 403–418. doi:10.1136/jmedgenet-2015-103322.
- [7] M.F. Coutinho, L. Lacerda, S. Alves, Glycosaminoglycan storage

- disorders: A review, *Biochem. Res. Int.* 2012 (2012) 471325.
doi:10.1155/2012/471325.
- [8] W.S. Sly, B.A. Quinton, W.H. McAlister, D.L. Rimoin, Beta glucuronidase deficiency: Report of clinical, radiologic, and biochemical features of a new mucopolysaccharidosis, *J. Pediatr.* 82 (1973) 249–257.
doi:10.1016/S0022-3476(73)80162-3.
- [9] S. Nampoothiri, M. Kappanayil, K.R. Hiran, V. Sunitha, Sly Disease: Mucopolysaccharidosis Type VII., *Indian Pediatr.* 45 (2008) 859–861.
- [10] F. Poswar, G. Baldo, R. Giugliani, Phase I and II clinical trials for the mucopolysaccharidoses, *Expert Opin. Investig. Drugs.* 26 (2017) 1331–1340. doi:10.1080/13543784.2017.1397130.
- [11] Y. Li, K. Brockmann, F. Turecek, C.R. Scott, M.H. Gelb, Tandem Mass Spectrometry for the Direct Assay of Enzymes in Dried Blood Spots: Application to Newborn Screening for Krabbe Disease, *Clin. Chem.* 50 (2004) 638–640. doi:10.1373/clinchem.2003.028381.
- [12] D.H. Chace, T.A. Kalas, A biochemical perspective on the use of tandem mass spectrometry for newborn screening and clinical testing, *Clin. Biochem.* 38 (2005) 296–309. doi:10.1016/j.clinbiochem.2005.01.017.
- [13] T.A. Duffey, G. Bellamy, S. Elliott, A.C. Fox, M. Glass, F. Turecek, M.H. Gelb, C.R. Scott, A tandem mass spectrometry triplex assay for the detection of fabry, pompe, and mucopolysaccharidosis-I (Hurler), *Clin. Chem.* 56 (2010) 1854–1861. doi:10.1373/clinchem.2010.152009.
- [14] Y. Li, C.R. Scott, N.A. Chamoles, A. Ghavami, B.M. Pinto, F. Turecek, M.H. Gelb, Direct multiplex assay of lysosomal enzymes in dried blood spots for newborn screening, *Clin. Chem.* 50 (2004) 1785–1796.
doi:10.1373/clinchem.2004.035907.Direct.
- [15] T.F. Metz, T.P. Mechtler, J.J. Orsini, M. Martin, B. Shushan, J.L. Herman, R. Ratschmann, C.B. Item, B. Streubel, K.R. Herkner, D.C. Kasper, Simplified newborn screening protocol for lysosomal storage disorders, *Clin. Chem.* 57 (2011) 1286–1294. doi:10.1373/clinchem.2011.164640.
- [16] X.K. Zhang, C.S. Elbin, W.-L. Chuang, S.K. Cooper, C.A. Marashio, C. Beauregard, J.M. Keutzer, Multiplex enzyme assay screening of dried blood spots for lysosomal storage disorders by using tandem mass spectrometry., *Clin. Chem.* 54 (2008) 1725–8.

doi:10.1373/clinchem.2008.104711.

- [17] M.H. Gelb, F. Turecek, C.R. Scott, N.A. Chamoles, Direct multiplex assay of enzymes in dried blood spots by tandem mass spectrometry for the newborn screening of lysosomal storage disorders, *J. Inherit. Metab. Dis.* 29 (2006) 397–404. doi:10.1007/s10545-006-0265-4.
- [18] C.D. Castilhos, J. Mezzalira, M.P.S. Goldim, V. V. Daitx, C. da S. Garcia, C. V. Andrade, A.C. Breier, J. Cé, A.S. Mello, J.C. Coelho, Determination of the lysosomal hydrolase activity in blood collected on filter paper, an alternative to screen high risk populations, *Gene*. 536 (2014) 344–347. doi:10.1016/j.gene.2013.11.101.
- [19] J. Cé, M.T. Rodrigues, E.T. Käfer, V. da Costa Moraes, J.C. Coelho, Beta-glucuronidase activity in dried blood spots: Reduced technique with biochemical parameters determined, *Clin. Biochem.* (2017). doi:10.1016/j.clinbiochem.2017.09.022.
- [20] A.B. Kumar, S. Masi, F. Ghomashchi, N.K. Chennamaneni, M. Ito, C.R. Scott, F. Turecek, M.H. Gelb, Z. Spacil, Tandem mass spectrometry has a larger analytical range than fluorescence assays of lysosomal enzymes: Application to newborn screening and diagnosis of mucopolysaccharidoses types II, IVA, and VI, *Clin. Chem.* 61 (2015) 1363–1371. doi:10.1373/clinchem.2015.242560.
- [21] D.C. Lehotay, P. Hall, J. Lepage, J.C. Eichhorst, M.L. Etter, C.R. Greenberg, LC-MS/MS progress in newborn screening, *Clin. Biochem.* 44 (2011) 21–31. doi:10.1016/j.clinbiochem.2010.08.007.
- [22] J.I. Navarrete-Martínez, A.E. Limón-Rojas, M. de J. Gaytán-García, J. Reyna-Figueroa, G. Wakida-Kusunoki, M. del R. Delgado-Calvillo, C. Cantú-Reyna, H. Cruz-Camino, D.E. Cervantes-Barragán, Newborn screening for six lysosomal storage disorders in a cohort of Mexican patients: Three-year findings from a screening program in a closed Mexican health system, *Mol. Genet. Metab.* 121 (2017) 16–21. doi:10.1016/j.ymgme.2017.03.001.
- [23] P. Harmatz, K.E. Mengel, R. Giugliani, V. Valayannopoulos, S.P. Lin, R. Parini, N. Guffon, B.K. Burton, C.J. Hendriksz, J. Mitchell, A. Martins, S. Jones, N. Guelbert, A. Vellodi, C. Hollak, P. Slasor, C. Decker, The Morquio A Clinical Assessment Program: Baseline results illustrating

- progressive, multisystemic clinical impairments in Morquio A subjects, *Mol. Genet. Metab.* 109 (2013) 54–61. doi:10.1016/j.ymgme.2013.01.021.
- [24] R.S. Sista, T. Wang, N. Wu, C. Graham, A. Eckhardt, T. Winger, V. Srinivasan, D. Bali, D.S. Millington, V.K. Pamula, Multiplex newborn screening for Pompe, Fabry, Hunter, Gaucher, and Hurler diseases using a digital microfluidic platform, *Clin. Chim. Acta.* 424 (2013) 12–18. doi:10.1016/j.cca.2013.05.001.
- [25] S. Tortorelli, C.T. Turgeon, D.K. Gavrilov, D. Oglesbee, K.M. Raymond, P. Rinaldo, D. Matern, Simultaneous testing for 6 lysosomal storage disorders and x-adrenoleukodystrophy in dried blood spots by tandem mass spectrometry, *Clin. Chem.* 62 (2016) 1248–1254. doi:10.1373/clinchem.2016.256255.
- [26] H.C. Liao, C.C. Chiang, D.M. Niu, C.H. Wang, S.M. Kao, F.J. Tsai, Y.H. Huang, H.C. Liu, C.K. Huang, H.J. Gao, C.F. Yang, M.J. Chan, W. De Lin, Y.J. Chen, Detecting multiple lysosomal storage diseases by tandem mass spectrometry - A national newborn screening program in Taiwan, *Clin. Chim. Acta.* 431 (2014) 80–86. doi:10.1016/j.cca.2014.01.030.
- [27] A.B. Burlina, G. Polo, L. Salviati, G. Duro, C. Zizzo, A. Dardis, B. Bembi, C. Cazzorla, L. Rubert, R. Zordan, R.J. Desnick, A.P. Burlina, Newborn screening for lysosomal storage disorders by tandem mass spectrometry in North East Italy, (2017). doi:10.1007/s10545-017-0098-3.
- [28] M. Wagner, D. Tonoli, E. Varesio, G. Hopfgartner, The use of mass spectrometry to analyze dried blood spots, *Mass Spectrom. Rev.* 35 (2016) 361–368. doi:10.1002/mas.21441.
- [29] A. Sharma, S. Jaiswal, M. Shukla, J. Lal, Dried blood spots: Concepts, present status, and future perspectives in bioanalysis, *Drug Test. Anal.* 6 (2014) 399–414. doi:10.1002/dta.1646.
- [30] C.D. de Castilhos, J. Mezzalira, M.P.S. Goldim, J.C. Coelho, Influence of pre-analytical factors on alpha-galactosidase A, arylsulfatase B and alpha-glucosidase activities measured on dried blood spots on filter paper, *Clin. Biochem.* 44 (2011) 922–926. doi:10.1016/j.clinbiochem.2011.03.138.

Figure captions

Figure 1: Correlation between 1.2 mm DBS and DBS samples eluted in UEB regarding the measure of IDUA activity. Pearson's $r = 0.9154$, $p < 0.0001$.

Figure 2: Correlation between 1.2 mm DBS and DBS samples eluted in UEB regarding the measure of ASB activity. Pearson's $r = 0.8880$, $p < 0.0001$.

Figure 3: Correlation between 1.2 mm DBS and DBS samples eluted in UEB regarding the measure of GUSB activity. Pearson's $r = 0.9136$, $p < 0.0001$.

Table 1

Table 1: Comparison between means of alpha-iduronidase, arylsulfatase B and beta-glucuronidase activity in 1.2mm DBS and DBS samples eluted in UEB.

	IDUA		ASB		GUSB	
	1.2 mm	UEB	1.2 mm	UEB	1.2 mm	UEB
Mean (nmol/h/mL)	14.24	14.65	21.64	22.51	545.64	531.92
SD (nmol/h/mL)	5.13	4.35	7.46	5.09	138.00	121.05
T-test	0.87		0.99		1.25	
p>	0.40		0.34		0.23	

Figure 1

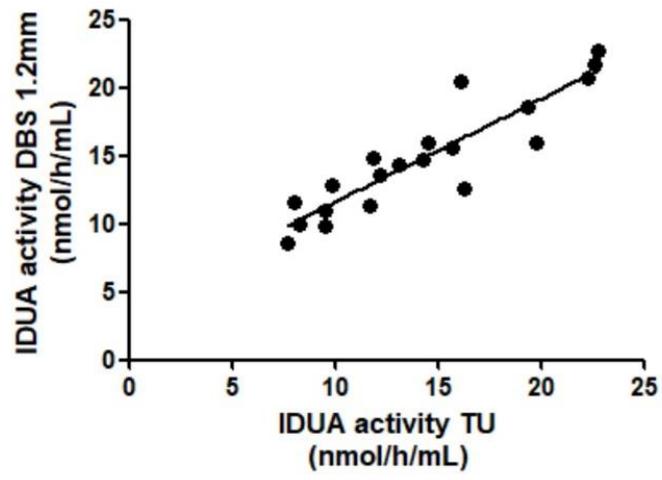


Figure 1:

Figure 2

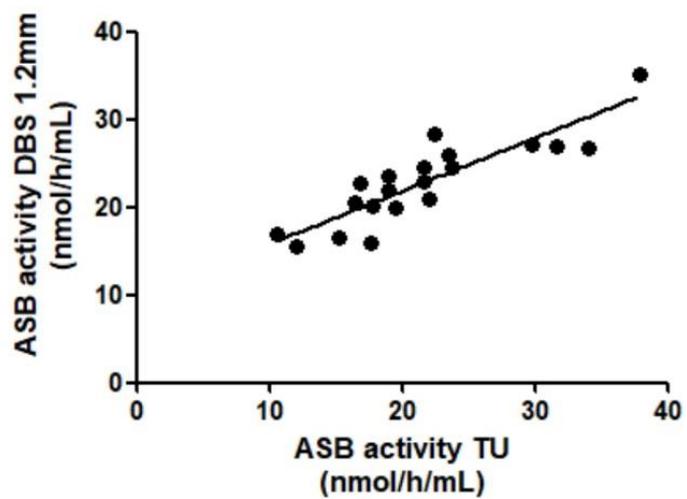


Figure 2:

Figure 3

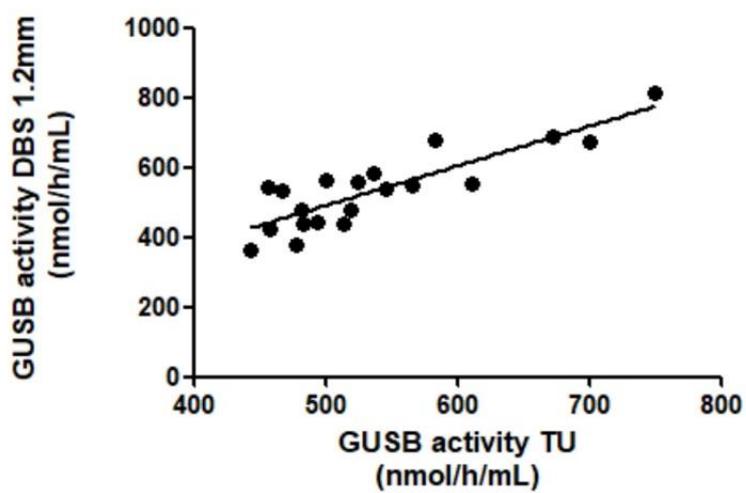


Figure 3:

Capítulo III

Artigo: Analyses of oxidative stress biomarker in Mucopolysaccharidosis VI compared with Mucopolysaccharidosis I and healthy controls

Publicado em Gene Reports

Cé, J., de Mello, A.S., da Costa Moraes, V., Kafer, E., Frusciante, M., Kneib, L., Funchal, C., Dani, C., Coelho, J.C., 2016. Analyses of oxidative stress biomarkers in Mucopolysaccharidosis VI compared with Mucopolysaccharidosis I and healthy controls. *Gene Reports*, 5:130–133. doi:10.1016/j.genrep.2016.10.005



Analyses of oxidative stress biomarkers in Mucopolysaccharidosis VI compared with Mucopolysaccharidosis I and healthy controls



Jaqueline Cé^{a,*}, Alexandre Silva de Mello^b, Vitória da Costa Moraes^a, Eduarda Kafer^a, Marina Frusciante^b, Luciana Kneib^b, Cláudia Funchal^b, Caroline Dani^b, Janice Carneiro Coelho^a

^a Graduate Program in Biological Sciences: Biochemistry, Department of Biochemistry, Institute of Basic Healthcare Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Research Center, Methodist University Centre – IPA, Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 September 2016

Accepted 6 October 2016

Available online 7 October 2016

Keywords:

Mucopolysaccharidosis
Oxidative stress
Inborn errors of metabolism
MPS I
MPS VI

ABSTRACT

High levels of reactive oxygen species have been associated with oxidative stress and inflammation and are related to changes in cellular characteristics caused by altered metabolic pathways of individuals with inborn errors of metabolism. Mucopolysaccharidosis (MPS) are characterized by biomolecular and tissue damage that results in the accumulation of undegraded glycosaminoglycans in cells of various organs and systems. The aim of this study was to measure superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in the plasma of individuals with MPS VI and compare these parameters with those of individuals with MPS I and healthy controls. The biomarkers of oxidative stress were evaluated in the plasma of individuals with MPS I and MPS VI and of healthy controls. The antioxidant capacity of blood plasma was measured by assessing SOD and CAT enzyme contents. The SOD results were 0.88 ± 0.77 USOD/mg protein in the control group 0.89 ± 0.56 USOD/mg protein in MPS I and 0.71 ± 0.49 USOD/mg protein in MPS VI. The CAT activity in the control group was 83.24 ± 36.24 UCAT/mg protein, 17.30 ± 13.98 UCAT/mg protein in MPS I, and 36.79 ± 19.30 UCAT protein in MPS VI. The TBARS analysis results were 1.23 ± 0.52 nmol/mg protein for the control group, 3.86 ± 1.52 nmol/mg protein for MPS I, and 3.13 ± 1.19 mol/mg de protein for MPS VI. In conclusion the results show that SOD enzyme activity did not change in either MPS, however, CAT activity decreased and a larger amount of TBARS was observed, which suggests both types of MPS are susceptible to oxidative damage.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Mucopolysaccharidosis (MPS) are characterized by biomolecular and tissue damage that results in the accumulation of undegraded glycosaminoglycans (GAGs) in the cells of various organs and systems. Seven types of MPS are classified according to the deficient enzyme and the degree of clinical compromise [1].

Mucopolysaccharidosis type I (MPS I) is caused by deficiency of the lysosomal enzyme alpha-iduronidase (IDUA, E.C. 3.2.1.76) and is subdivided into Hurler syndrome, Hurler-Scheie syndrome, or Scheie syndrome, which are the severe, intermediate, and mild forms of the disease, respectively. IDUA deficiency leads to storage of

glycosaminoglycans dermatan sulfate and heparan sulfate in the lysosomes of affected persons [1,2], which causes hepatosplenomegaly, coarse facial features, cornea opacity, and, in Hurler syndrome, cognitive disorder, among other clinical signs [3].

Mucopolysaccharidosis type VI (MPS VI) or Maroteaux-Lamy syndrome is caused by deficiency of the enzyme arylsulfatase B (ASB, E.C. 3.1.6.12), leading to the storage of only glycosaminoglycan dermatan sulfate [1]. Persons with this type of MPS may have skeletal dysplasia, motor dysfunction, kyphosis, and cardiac defects [3].

High levels of reactive oxygen species (ROS) have been associated with oxidative stress (OS) and inflammation and are related to changes in cellular characteristics caused by changes in metabolic pathways of individuals with inborn errors of metabolism (IEM) [4–6]. Studies in the literature associate oxidative stress with lysosomal storage diseases [7–11]. The involvement of ROS with MPS has been described for type I [2,12,13], type II [14,15], type IIIA [16], type IIIB [17], and type IVA [4].

Among the main antioxidant defenses of the organism are the superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) enzymes [18]. SOD converts a superoxide anion into hydrogen peroxide (H_2O_2) and oxygen (O_2) as a substrate for catalase, which converts H_2O_2 into water and one oxygen

Abbreviations: MPS, Mucopolysaccharidosis; GAGs, glycosaminoglycans; MPS I, Mucopolysaccharidosis type I; IDUA, alpha-iduronidase; MPS VI, Mucopolysaccharidosis type VI; ASB, arylsulfatase B; ROS, reactive oxygen species; OS, oxidative stress; SOD, superoxide dismutase; CAT, catalase; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances; HC, healthy controls; ERT, enzyme replacement therapy; MDA, malondialdehyde.

* Corresponding author at: Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600, anexo, Porto Alegre, RS CEP 90035-003, Brazil. E-mail address: jaquelinece@gmail.com (J. Cé).

molecule for the action of glutathione peroxidase [14,19,20]. The biomarker used to determine lipid peroxidation is the measure of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) [21].

The aim of this study was to measure the activity of superoxide dismutase, catalase, and thiobarbituric acid reactive substances in the plasma of individuals with MPS VI and compare these parameters with those of individuals with MPS I and healthy controls.

2. Materials and methods

The samples comprised three groups: MPS I ($n = 8$), MPS VI ($n = 8$), and healthy individuals ($n = 16$, eight MPS I controls and eight MPS VI controls). The individuals were 10 years old on average (2 to 24 years old). Sample size was estimated as eight samples to make up each group under analysis (individuals affected by MPS I and VI and volunteer health individuals) using the statistical software MiniTab® 16. The standard deviation of alpha-iduronidase enzyme activity in individuals with MPS I was considered at 5% margin of error.

The blood samples used as healthy controls (16) were collected from blood donors at the blood bank of the Clinics Hospital of Porto Alegre by the team in charge of blood collection. Eight samples were collected from MPS I and MPS VI patients. These samples were properly identified with numbers so as to preserve the identity of the donors. Informed consent was obtained from all participants. The study was approved (number 850.927) by the Research Ethics Committee of Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brazil.

In order to obtain plasma and leukocytes, 10 mL of blood were collected from each individual into tubes with heparin anticoagulant. The plasma was obtained through centrifugation at $358 \times g$ for 10 min at room temperature (Baby Centrifuge Mod 206, FANEM, São Paulo, Brazil). The remaining blood was used to separate leukocytes according to the technique by Skoog and Beck [22]. Both plasma and leukocyte samples were stored at -20°C .

2.1. Total protein quantification

Total proteins were quantified according to the colorimetric technique described by Lowry et al. [23] in leukocytes to measure ASB enzyme activity and in plasma for the oxidative stress tests.

2.2. Enzyme activity measurement

Enzyme activities were measured according to the fluorimetric techniques described by Hopwood et al. [24] using the substrate 4-Methylumbelliferyl α -L-iduronide for alpha-iduronidase in plasma samples and according to de Castilhos et al. [25] using the substrate 4-nitrocatechol-sulfate for arylsulfatase B in leukocytes samples expresses as nmol/h/mg protein. Both techniques are fluorimetric and the fluorescences were read at 365 nm excitation and 450 nm emission (SpectraMax M5, Molecular Devices).

2.3. Oxidative stress analysis

Three oxidative stress biomarkers were evaluated in the plasma of individuals with MPS I and MPS VI and of healthy controls (HC). The antioxidant capacity of blood plasma was measured by the enzymatic activity of enzymes superoxide dismutase and catalase, while the damage to lipids (lipid peroxidation) was measured by the presence of thiobarbituric acid-reactive substances.

2.3.1. Superoxide dismutase

Activity of the antioxidant enzyme SOD was assessed by quantifying the rate of inhibition of adrenochrome formation in a medium containing 1 mM adrenaline and 50 mM glycine through spectrophotometry at 480 nm absorbance (spectrophotometer SP-2200, Bioespectro) [26]. SOD activity was determined as the amount of enzyme that inhibits

the oxidation of 50% of epinephrine [27]. The results were expressed as USOD/mg protein.

2.3.2. Catalase

The spectrophotometric method described by Aebi [28] was used to determine CAT activity. This technique measured the rate of H_2O_2 breakdown through the decrease of absorbance at 240 nm (spectrophotometer SP-2200, Bioespectro). One enzyme unit was defined as $1 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ consumed per minute and the specific activity was expressed as UCAT/mg protein [5,14,29].

2.3.3. Thiobarbituric acid reactive substances

TBARS production during an acid-heating reaction was used as lipid peroxidation index, as described by Wills [30]. The samples remained under stirring with 10% trichloroacetic acid and 0.67% thiobarbituric acid and were then heated in a boiling water bath for 15 min in sealed tubes. The reading at 535 nm absorbance and the data obtained were expressed as nmol/mg protein.

2.4. Statistical analysis

Student's *t*-test was used to compare results of IDUA activity in plasma between controls and MPS I and ASB activity in leukocytes between controls and MPS VI. One-way ANOVA followed by the Tukey's post-hoc test was used to analyze the results of plasma SOD, CAT, and TBARS. Statistical analyses were performed using the software GraphPad Prism version 5.03 (GraphPad Software Inc., California, USA) and the level of significance was set at $p < 0.05$.

3. Results

To confirm the inclusion of individuals in the three groups analyzed, we measured the IDUA and ASB activity. IDUA's enzyme activity in the plasma of healthy individuals was 9.48 ± 3.46 nmol/h/mL (5.20 to 14.13), while individuals with MPS I had activity values of 0.18 ± 0.29 nmol/h/mL (0 to 0.65). The MPS I group significantly differed from the control group ($p < 0.05$; Fig. 1A). When the ASB enzyme was analyzed in leukocytes, it was found that healthy individuals had approximately three-fold ($p < 0.05$) more activity (99.05 ± 13.48 nmol/h/mg protein; 78.36 to 112.16) than those with MPS VI (35.16 ± 22.02 nmol/h/mg protein; 5.61 to 69.06). These results can be seen in Fig. 1B.

No significant differences were found among the control (0.88 ± 0.77 USOD/mg protein), MPS I (0.89 ± 0.56 USOD/mg protein), and MPS VI (0.71 ± 0.49 USOD/mg protein) groups when SOD activity was determined (Fig. 2).

CAT activity was reduced in the MPS groups (Fig. 3). CAT activity results significantly differed between the control (83.24 ± 36.74 UCAT/mg protein) and MPS I (17.30 ± 13.98 UCAT/mg protein) groups and between the control and MPS VI (36.79 ± 19.30 UCAT/mg protein) groups.

Significant difference was found in TBARS analysis between the control (1.23 ± 0.52 nmol/mg protein) and MPS I (3.86 ± 1.52 nmol/mg protein) groups and between the control and MPS VI (3.13 ± 1.19 nmol/mg protein) groups (Fig. 4), which shows greater TBARS production in the MPS groups.

4. Discussion

Antioxidants are substances that prevent the formation or neutralize free radicals. The organism has natural systems to fight off free radicals, either enzymatic or non-enzymatic, which work side-by-side to protect our cells and organs against free radical damage [20,31].

Oxidative stress (OS) is the imbalance in free radical production that may be neutralized by the antioxidant defenses in the organism [32,33]. ROS may cause cell-damage chain reactions and have been related to

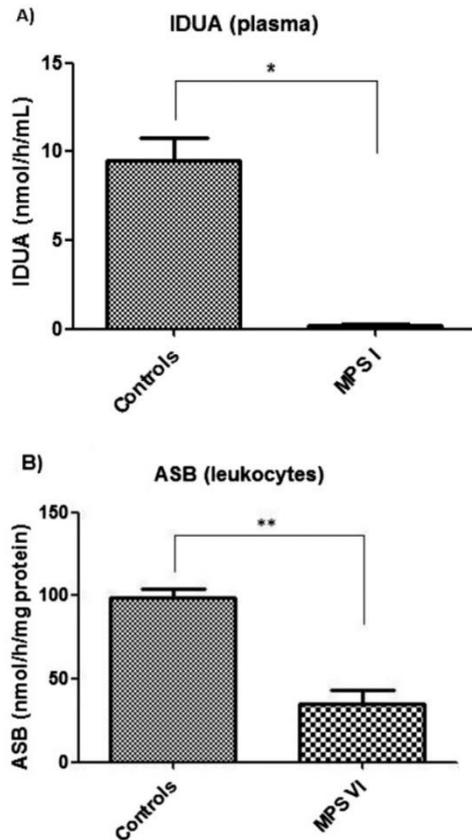


Fig. 1. A) Measurement of alpha-iduronidase activity in the plasma of healthy controls and patients with MPS I (mean \pm SD); B) Measurement of arylsulfatase B activity in leukocytes of healthy controls and patients with MPS VI (mean \pm SD). Statistically significant difference * ($p < 0.001$) and ** ($p < 0.0001$).

several human diseases [14,18], including inborn errors of metabolism [34].

Lysosomes are highly susceptible to OS since ROS may induce lipid peroxidation that will destabilize the lysosomal membrane and release its content into the cell cytoplasm [35]. That makes investigating the effects of ROS in lysosomal storage diseases very important. Individuals with MPS may experience an increase in antioxidant defenses to reestablish homeostasis in the organism as a response to GAG storage [13].

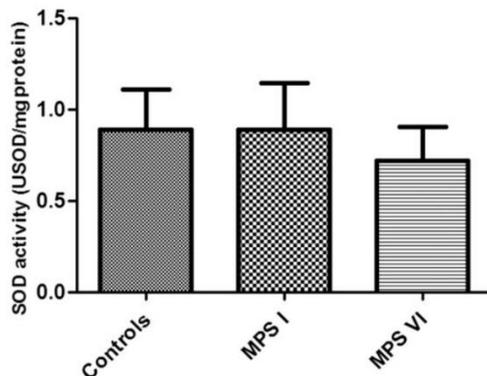


Fig. 2. SOD activity in the plasma of healthy controls and patients with MPS I and MPS VI. Data expressed as mean \pm SD.

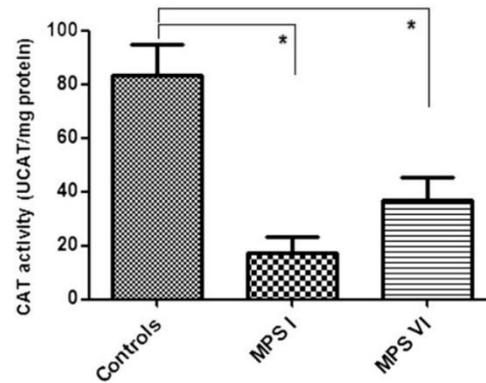


Fig. 3. CAT activity in the plasma of control, MPS I, and MPS VI groups. Data expressed as mean \pm SD. *Statistically significant difference ($p < 0.05$).

Current studies relate oxidative stress with some types of MPS, mostly on MPS I [4,12–14]. The present study sought to observe and compare whether these alterations occur in the most common MPS types in Brazil [36], i.e., MPS VI and MPS I, both of which may be treated by enzyme replacement therapy (ERT).

An analysis of the results of IDUA and ASB activities in the controls and individuals with MPS I and VI show that those with MPS have deficient enzyme activity and that the values of healthy individuals were within the normality range [37,38].

The assessment of SOD enzyme activity showed no significant difference among the groups studied, which matches the results by Pereira et al. [12], who reported no change in SOD activity in individuals with MPS I prior to ERT. Other studies on other types of MPS (MPS II – Filippon et al. [14]) or even other IEMs (phenylketonuria – Sirtori et al., [6]) also reported no altered SOD activity. On the other hand, increased SOD activity was observed in MPS IVA [4] and in individuals with Gaucher's disease [8]. Unaltered SOD activity levels in individuals with MPS I and VI shows that the capacity to act as first enzymatic antioxidant defense is not impaired.

CAT activity is reduced in individuals with MPS I and VI compared to healthy controls, which may indicate that the antioxidant capacity is decreased in those types of MPS. It has been observed by Pereira et al. [12], that the CAT activity in patients with MPS I during TRE is increased in relation to baseline level, although there is no comparison with activity in healthy individuals [12,14].

The present research found a higher amount of TBARS in the MPS studied compared with the healthy controls, which suggests an increase in lipid peroxidation, which is capable of inducing changes in integrity,

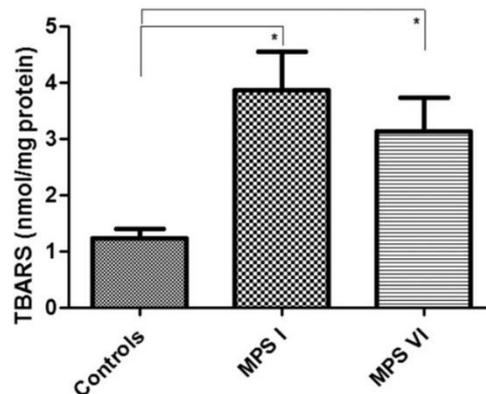


Fig. 4. TBARS amount in the plasma of healthy controls and patients with MPS I and MPS VI. Data expressed as mean \pm SD. *Statistically significant difference ($p < 0.05$).

fluidity and permeability and functional loss of biomembranes, thus generating potentially toxic products [7,17]. In the study by Pereira et al., [12], TBARS levels were also increased in individuals with MPS I compared with healthy controls and no significant differences in those levels were found during ERT, which remained high and, thus, suggested peroxidation. When studying MPS II, Negretto et al., [15] and Filipponi et al., [14] observed that malondialdehyde (MDA) levels were increased prior to ERT and, despite significantly decreasing during treatment, they remained above those of controls. Since TBARS reflects the content of MDA, a byproduct of lipid breakdown during lipid peroxidation [34], it can be predicted that MPS I and VI, as well as other IEMs, induce lipid peroxidation, likely secondarily to the generation of free radicals.

To the extent of our knowledge, this is the first study relating oxidative stress parameters and MPS VI, showing the apparent involvement of OS with the evolution of clinical manifestations in MPS. The findings allow concluding that MPS VI behaves as MPS I. No difference was found between these two types of MPS and they cannot be distinguished by the oxidative stress parameters investigated in the present study. That may be related to the type of GAG stored in those two MPS types. No changes in SOD activity was found in either MPS, however, CAT activity decreased and a larger amount of TBARS was observed, which suggests both types of MPS are susceptible to oxidative damage.

Acknowledgements

The authors thank CNPq (301638/2013-6) for the financial support and the donors and staff of the blood bank of the Clinics Hospital of Porto Alegre for the blood samples used in this study.

References

- Newfeld, E.F., Muenzer, J., 2001. The mucopolysaccharidosis. *Metab. E Mol. Bases Inher. Dis.* The McGraw-Hill Companies.
- Campos, D., Monaga, M., 2012. Mucopolysaccharidosis type I: current knowledge on its pathophysiological mechanisms. *Metab. Brain Dis.* 27, 121–129. <http://dx.doi.org/10.1007/s11011-012-9302-1>.
- Suarez-guerrero, J.L., José, P., Gómez, I., Sebastian, J., Flórez, A., Adolfo, G., 2015. Mucopolisaccharidosis: características clínicas, diagnóstico y de manejo. *Rev. Chil. Pediatr.*
- Donida, B., Marchetti, D.P., Biancini, G.B., Deon, M., Manini, P.R., da Rosa, H.T., Moura, D.J., Saffi, J., Bender, F., Burin, M.G., Coitinho, A.S., Giugliani, R., Vargas, C.R., 2015. Oxidative stress and inflammation in mucopolysaccharidosis type IVA patients treated with enzyme replacement therapy. *Biochim. Biophys. Acta* 1852, 1012–1019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbdis.2015.02.004>.
- Preissler, T., Bristot, I.J., May, B., Costa, L., Fernandes, E.K., Rieger, E., Bortoluzzi, V.T., De Franceschi, I.D., Dutra-filho, C.S., 2015. Phenylalanine Induces Oxidative Stress and Decreases the Viability of Rat Astrocytes: Possible Relevance for the Pathophysiology of Neurodegeneration in Phenylketonuria. <http://dx.doi.org/10.1007/s11011-015-9763-0>.
- Sirtori, L.R., Dutra-Filho, C.S., Fitarelli, D., Sitta, A., Haeser, A., Barschak, A.G., Wajner, M., Coelho, D.M., Llesuy, S., Belló-Klein, A., Giugliani, R., Deon, M., Vargas, C.R., 2005. Oxidative stress in patients with phenylketonuria. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 1740, 68–73. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbdis.2005.02.005>.
- Ribas, G.S., Pires, R., Coelho, J.C., Rodrigues, D., Mescka, C.P., Vanzin, C.S., Biancini, G.B., Negretto, G., Wayhs, C.A., Wajner, M., Vargas, C.R., 2012. Oxidative stress in Niemann-Pick type C patients: a protective role of N-butyl-deoxyjirimycin therapy. *Int. J. Dev. Neurosci.* 30, 439–444. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2012.07.002>.
- Mello, A.S., da Silva Garcia, C., de Souza Machado, F., da Silva Medeiros, N., Wohlenberg, M.F., Marinho, J.P., Dani, C., Funchal, C., Coelho, J.C., 2015. Oxidative stress parameters of Gaucher disease type I patients. *Mol. Genet. Metab.* 4, 1–5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgmr.2015.05.001>.
- Roversi, F.M., Galdieri, L.C., Grego, B.H.C., Souza, F.G., Micheletti, C., Martins, A.M., D'Almeida, V., 2006. Blood oxidative stress markers in Gaucher disease patients. *Clin. Chim. Acta* 364, 316–320. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2005.07.022>.
- Chimenti, C., Scopelliti, F., Vulpis, E., Tafani, M., Villanova, L., Verardo, R., De Paulis, R., Russo, M.A., Frustaci, A., 2015. Increased oxidative stress contributes to cardiomyocyte dysfunction and death in patients with Fabry disease cardiomyopathy. *Hum. Pathol.* 46, 1760–1768. <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2015.07.017>.
- Müller, K.B., Galdieri, L.C., Pereira, V.G., Martins, A.M., D'Almeida, V., 2012. Evaluation of oxidative stress markers and cardiovascular risk factors in Fabry disease patients. *Genet. Mol. Biol.* 35, 418–423. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572012005000031>.
- Pereira, V.G., Martins, A.M., Micheletti, C., D'Almeida, V., 2008. Mutational and oxidative stress analysis in patients with mucopolysaccharidosis type I undergoing enzyme replacement therapy. *Clin. Chim. Acta* 387, 75–79. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2007.09.008>.
- Reolon, G.K., Reinke, A., De Oliveira, M.R., Braga, L.M., Camassola, M., Andrades, M.v., Moreira, J.C.F., Nardi, N.B., Roesler, R., Dal-Pizzol, F., 2009. Alterations in oxidative markers in the cerebellum and peripheral organs in MPS I Mice. *Cell. Mol. Neurobiol.* 29, 443–448. <http://dx.doi.org/10.1007/s10571-008-9335-5>.
- Filipponi, L., Vanzin, C.S., Biancini, G.B., Pereira, I.N., Manfredini, V., Sitta, A., do C.R. Peralba, M., Schwartz, I.V.D., Giugliani, R., Vargas, C.R., 2011. Oxidative stress in patients with mucopolysaccharidosis type II before and during enzyme replacement therapy. *Mol. Genet. Metab.* 103, 121–127. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2011.02.016>.
- Negretto, G.W., Deon, M., Biancini, G.B., Burin, M.G., Giugliani, R., Vargas, C.R., 2014. Glycosaminoglycans can be associated with oxidative damage in mucopolysaccharidosis II patients submitted to enzyme replacement therapy. *Cell Biol. Toxicol.* 30, 189–193. <http://dx.doi.org/10.1007/s10565-014-9284-3>.
- Arfi, A., Richard, M., Gandolphe, C., Bonnefont-Rousselot, D., Théron, P., Scherman, D., 2011. Neuroinflammatory and oxidative stress phenomena in MPS IIIA mouse model: the positive effect of long-term aspirin treatment. *Mol. Genet. Metab.* 103, 18–25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2011.01.015>.
- Villani, G.R.D., Di Domenico, C., Musella, A., Cecere, F., Di Napoli, D., Di Natale, P., 2009. Mucopolysaccharidosis IIIB: oxidative damage and cytotoxic cell involvement in the neuronal pathogenesis. *Brain Res.* 1279, 99–108. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2009.03.071>.
- Halliwell, B., 1994. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 344, 721–724. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(94\)92211-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(94)92211-X).
- Kolling, J., Scherer, E.B.S., Siebert, C., Marques, E.P., dos Santos, T.M., Wyse, A.T.S., 2014. Creatine prevents the imbalance of redox homeostasis caused by homocysteine in skeletal muscle of rats. *Gene* 545, 72–79. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2014.05.005>.
- Rahman, K., 2007. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin. Interv. Aging* 2, 219–236. <http://dx.doi.org/>.
- Vasconcelos, S.M.L., Goulart, M.O.F., Moura, J.B.D.F., Manfredini, V., Benfato, M.D.S., Kubota, L.T., 2007. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim Nova* 30, 1323–1338. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000500046>.
- Skoog, W.A., Beck, W.S., 1956. Studies on the fibrinogen, dextran and phytohemagglutinin methods of isolating leukocytes. *Blood* 11, 436–454.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275. [http://dx.doi.org/10.1016/0304-3894\(92\)87011-4](http://dx.doi.org/10.1016/0304-3894(92)87011-4).
- Hopwood, J.J., Muller, V., Smithson, A., Baggett, N., 1979. A fluorometric assay using 4-methylumbelliferyl alpha-l-iduronide for the estimation of alpha-iduronidase activity and the detection of hurler and Scheie syndromes. *Clin. Chim. Acta* 92, 257–265. [http://dx.doi.org/10.1016/0009-8981\(79\)90121-9](http://dx.doi.org/10.1016/0009-8981(79)90121-9).
- Castilhos, 2011 - 1.pdf, (n.d.).
- Bannister, J.V., Calabrese, L., 1987. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem. Anal.* 32, 279–312.
- Marcelino, T.B., Longoni, A., Kudo, K.Y., Stone, V., Rech, A., De Assis, A.M., Scherer, E.B.S., Da Cunha, M.J., Wyse, A.T.S., Pettenuzzo, L.F., Leipnitz, G., Matté, C., 2013. Evidences that maternal swimming exercise improves antioxidant defenses and induces mitochondrial biogenesis in the brain of young Wistar rats. *Neuroscience* 246, 28–39. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.04.043>.
- Aebi, H., 1984. Oxygen Radicals in Biological Systems. Elsevier [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3).
- Ristoff, E., Larsson, A., 2002. Oxidative stress in inborn errors of metabolism: lessons from glutathione deficiency. *J. Inher. Metab. Dis.* 25, 223–226. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1015634032042>.
- Wills, E.D., 1966. Mechanisms of lipid peroxide formation in animal tissues. *Biochem. J.* 99, 667–676 (doi:D - NLM: PMC1265056 EDAT- 1966/06/01 MHDA- 1966/06/01 00:01 CRDT- 1966/06/01 00:00 PST - publish).
- Barbosa, K.B.F., Costa, N.M.B., De Cássia Gonçalves Alfenas, R., De Paula, S.O., Minim, V.P.R., Bressan, J., 2010. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. *Eur. Nutr.* 23, 629–643. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>.
- Hayashi, M., Miyata, R., Tanuma, N., 2012. Oxidative stress in developmental brain disorders. In: Ahmad, S.I. (Ed.), *Neurodegener. Dis.* Landes Bioscience and Springer Science + Business Media, pp. 278–290.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44–84. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>.
- Barschak, A.G., Sitta, A., Deon, M., De Oliveira, M.H., Haeser, A., Dutra-Filho, C.S., Wajner, M., Vargas, C.R., 2006. Evidence that oxidative stress is increased in plasma from patients with maple syrup urine disease. *Metab. Brain Dis.* 21, 279–286. <http://dx.doi.org/10.1007/s11011-006-9030-5>.
- Terman, A., Kurz, T., Gustafsson, B., Brunk, U.T., 2006. Lysosomal labilization. *IUBMB Life.* 58, 531–539. <http://dx.doi.org/10.1080/15216540600904885>.
- Coelho, J.C., Wajner, M., Burin, M.G., Vargas, C.R., Giugliani, R., 1997. Selective screening of 10,000 high-risk Brazilian patients for the detection of inborn errors of metabolism. *Eur. J. Pediatr.* 156, 650–654. <http://dx.doi.org/10.1007/s004310050685>.
- Civallero, G., Michelin, K., de Mari, J., Viapiana, M., Burin, M., Coelho, J.C., 2006. Gi, twelve different enzyme assays on dried-blood filter paper samples for detection of patients with selected inherited lysosomal storage diseases. *Clin. Chim. Acta* 372, 98–102. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009898106002191> accessed February 12, 2014.
- Castilhos, C.D., Mezzalana, J., Goldim, M.P.S., Daitx, V.V., da S. Garcia, C., Andrade, C.V., Breier, A.C., Cé, J., Mello, A.S., Coelho, J.C., 2014. Determination of the lysosomal hydrolase activity in blood collected on filter paper, an alternative to screen high risk populations. *Gene* 536, 344–347. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2013.11.101>.

DISCUSSÃO

As MPS não possuem cura. Os tratamentos disponíveis hoje em dia, visam prevenir a progressão dos sintomas além de serem paliativos no manejo da dor e complicações (Lawrence et al., 2014).

Os sinais clínicos, incluindo hepatoesplenomegalia, diminuição de visão e audição, dificuldade de respiração pelo excesso de muco nas vias aéreas, displasia esquelética, rigidez articular, anormalidades cardíacas, além do comprometimento do sistema nervoso central em alguns tipos de MPS, por serem comuns aos diferentes tipos dessas doenças, dificultam a diferenciação clínica de qual tipo de MPS o paciente é portador (Poswar et al., 2017). Sendo assim, métodos laboratoriais eficazes e capazes de diferenciar o tipo de MPS em questão, são importantes, de modo a ser introduzido o tratamento mais adequado, que vai variar de acordo com a deficiência enzimática apresentada.

Por serem doenças crônicas e progressivas (Neufeld e Muenzer, 2014), quanto mais precoce for o diagnóstico das MPS, mais rápido pode ser introduzido o tratamento com o objetivo de melhorar a qualidade de vida ou mesmo impedir a progressão da doença (Breier et al., 2014). Mesmo nos casos em que ocorre comprometimento neurológico, onde é sabido que a TRE não tem capacidade de atravessar a barreira hemato-encefálica (Poswar et al., 2017), o tratamento precoce auxiliaria na prevenção das manifestações cardíacas e esqueléticas inerentes a essas doenças.

A maneira de impedir que essas doenças genéticas cheguem, portanto, a causar danos irreversíveis nos indivíduos afetados é diagnosticá-las por meio de técnicas rápidas e precisas que permitam a fácil identificação com um baixo custo de análise. Para que essas enfermidades possam ser triadas em grande

escala, a utilização do SPF é priorizado, pois permite o envio dessas amostras por longas distâncias, é estável em ampla faixa de temperatura e é protegido de interferência de umidade (Sharma et al., 2014; Wagner et al., 2016).

Técnicas para o diagnóstico de MPS I, VI e IVA já foram padronizadas e tiveram seus parâmetros bioquímicos analisados com a utilização de picotes de SPF de 1,2 mm (Breier et al., 2017; Castilhos et al., 2014). Outras MPS ainda não tiveram suas técnicas modificadas e adaptadas, o que facilitaria a análise e diminuiria os custos do diagnóstico.

Nesse estudo, nós padronizamos a técnica de medida da atividade da enzima GUSB para o diagnóstico da MPS VII em SPF de 1,2 mm e caracterizamos alguns parâmetros como $V_{m\acute{a}x}$, K_m e resposta da atividade enzimática à temperatura, de modo que esses dados possam auxiliar, futuramente, na diferenciação entre esses indivíduos e heterozigotos ou indivíduos normais. Também padronizamos a medida da atividade dessa enzima, bem como de outras duas enzimas deficientes em outros tipos de MPS, como a ASB (MPS VI) e a IDUA (MPS I), em SPF após extração do mesmo em tampão de extração universal e por último, diferenciamos pacientes com MPS I daqueles com MPS VI e de indivíduos normais quanto à resposta ao EO, como mais um biomarcador no diagnóstico dessas doenças. Esperamos que os resultados aqui obtidos e abaixo discutidos, sirvam para auxiliar em um melhor entendimento das MPS e auxiliem também no diagnóstico dessas doenças.

Iniciamos nosso estudo padronizando a técnica para medida da atividade da GUSB em SPF de 1,2 mm de diâmetro, visando a diminuição da utilização de reagentes e quantidade de amostra de SPF, obtendo assim um menor custo na realização das análises de diagnóstico.

Assim, correlacionamos as análises realizadas com picotes de SPF de 3 mm (técnica original, previamente padronizada por Civallero et al., 2006) com a nova técnica utilizando picotes de SPF de 1,2 mm levando em consideração a diminuição na quantidade de reagentes em 2,5 e 4 vezes. Obtivemos correlação positiva significativa entre os resultados da medida da atividade da GUSB entre o SPF de 3 mm e o SPF de 1,2 mm com os reagentes da técnica reduzidos tanto 2,5 quanto 4 vezes. Esses resultados nos mostram que é possível realizar a medida da atividade da GUSB com um diâmetro menor do SPF e uma redução no volume dos reagentes, assim como já foi feito com outras hidrolases lisossômicas (Castilhos et al., 2014; Goldim et al., 2012). Essa miniaturização da técnica de diagnóstico de MPS VII permite a economia de amostra, que pode então ser utilizada na triagem de outros EIM, e de reagentes, diminuindo o custo da análise.

Os resultados obtidos na validação da técnica miniaturizada indicam que os três coeficientes de variação das análises intraensaio (9,3%), interensaio (11,9%) e interpessoal (9,4%) estão dentro do valor aceitável. Isso demonstra a precisão e a reprodutibilidade da técnica utilizada. De acordo com vários autores um coeficiente de variação aceitável é de até 20% (Lukacs et al., 2011; Müller et al., 2010; Olivova et al., 2009).

Com a técnica com SPF 1,2 mm tendo correlação significativamente positiva com o método de 3 mm e estando validada de acordo com os coeficientes de variação, seguimos nossos estudos caracterizando a enzima em relação ao pH ótimo, parâmetros cinéticos, termoestabilidade enzimática, tempo de estoque e temperatura de armazenamento e à determinação do intervalo de

referência. Para isso, escolhemos a redução de 4 vezes nos reagentes por representar maior economia dos mesmos.

Foi determinado o pH de 4,4 como pH ótimo da enzima. A técnica com picote de 3 mm descrita por Civallero et al. (2006), utiliza como pH para o ensaio enzimático o pH 4,8, utilizado por tratar-se do mesmo pH utilizado na técnica de medida de atividade da GUSB em plasma. Pela primeira vez, estudos de pH ótimo são realizados na medida da atividade enzimática em sangue colhido em SPF. O pH de 4,4 foi, então, utilizado nas demais análises da técnica com SPF 1,2mm.

O Km da GUSB em SPF de indivíduos saudáveis foi calculado em 1,25 mM e a V_{máx} encontrada foi de 594,48 nmol/h/mL. Não há na literatura outros trabalhos citando dados cinéticos para essa enzima, não sendo possível a comparação.

A termoestabilidade da GUSB foi determinada através do estudo da inativação pelo calor à temperatura de 60 °C, mesma temperatura de pré-incubação utilizada para a enzima beta-glicosidase em leucócitos de indivíduos afetados e heterozigotos de Doença de Gaucher (Michelin et al., 2005). Os resultados obtidos por ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni nos permitiram observar que à 60 °C, desde 5 até 120 minutos, ocorreu uma inativação gradual da enzima, e a atividade enzimática residual foi significativamente menor ($p < 0.05$) que a atividade da enzima à 4 °C (100% de atividade) a partir de 60 minutos. Não foi possível, devido à quase inexistência de indivíduos afetados vivos com MPS VII em nossa região, compararmos a termoestabilidade da enzima em amostras de afetados. Em um futuro, estudos de termoestabilidade da enzima GUSB em heterozigotos obrigatórios poderiam

ser realizados. Isso permitiria separar os grupos de indivíduos saudáveis de afetados e seus heterozigotos devido à inativação ou não da enzima. Estudos semelhantes já foram realizados com outras enzimas lisossômicas (beta-glicosidase, quitotriosidase, alfa-iduronidase) permitindo a distinção de indivíduos que, somente pela medida da atividade enzimática, não seriam identificados (Mandelli et al., 2002; Michelin et al., 2005; Wajner et al., 2004).

Quando medimos a atividade da GUSB em várias temperaturas e tempos de armazenamento, observamos uma estabilidade da atividade da mesma. Pelos resultados apresentados, observamos que o decaimento da atividade da enzima só vai se dar após 45 dias de armazenamento a uma temperatura de 37 °C. Isso permite que a amostra seja colhida e guardada até o momento do envio (não mais do que 30 dias) e quando a amostra chegar ao laboratório possa ser estocada, até o momento da análise, em geladeira ou freezer. Um trabalho realizado com a enzima arilsulfatase B, deficiente na MPS VI, mostrou que a mesma é estável nessas temperaturas, até 17 dias (tempo analisado) e quando as amostras de SPF foram depois analisadas aos 180 dias após a coleta, mesmo em geladeira ou freezer, houve uma diminuição significativa de sua atividade enzimática (de Castilhos et al., 2011). Pode ser que a GUSB se comporte da mesma maneira, nessas temperaturas, após um período maior de estocagem.

O intervalo de normalidade para a GUSB obtido nesse trabalho (174,4 a 649,0 nmol/h/mL) está mais próximo ao encontrado em plasma (30 a 300 nmol/h/mL) e em leucócitos (23 a 151 nmol/h/mg de proteína) (Beaudet et al., 1975), do que aquele encontrado na técnica de Civallero et al., (2006) em SPF de 3 mm (4,02 a 21,93 nmol/h/mL). Assim como já descrito para outras enzimas lisossômicas, a atividade em SPF ficou próxima aquela em plasma. Em 2004,

Wajner et al., descreveram que a atividade da enzima quitotriosidase em plasma variava de 8,85 a 132 nmol/h/mL e Goldim et al. (2012), observaram que em SPF ela variava de 0 a 44,5 nmol/mL, intervalos próximos, assim como aqui observado. O mesmo foi observado para a enzima alfa-iduronidase. Em plasma a mesma possui um intervalo de 4,70 a 18,10 nmol/h/mL (Hopwood et al., 1979) e em SPF varia de 4,28 a 25,68 nmol/h/mL (Castilhos et al., 2014). Observando por esta perspectiva, nossos resultados em SPF em relação aqueles obtidos em plasma, estão de acordo com o descrito na literatura para outras hidrolases lisossômicas.

Esse trabalho permitiu a adaptação de uma técnica já descrita para o diagnóstico de MPS VII para quantidades menores de amostra e reagentes. Isso implicará no uso de menores quantidades de amostras, que poderão ser utilizadas para outras técnicas e na economia de material. Sendo o diagnóstico precoce da MPS VII muito importante devido à gravidade da doença, o uso de técnicas confiáveis de diagnóstico em SPF torna-se essencial.

Após a padronização da técnica de medida de atividade da GUSB em SPF de 1,2mm, utilizamos essa metodologia juntamente com as técnicas já padronizadas, nesse diâmetro de picote, para a medida da atividade das enzimas IDUA e ASB, na introdução de uma nova metodologia: a eluição da amostra de SPF em TU preparado com Fosfato de Sódio 20 mmol/L pH 7,0.

Para a detecção da atividade da IDUA, ASB e GUSB em SPF, os picotes foram reidratados em tampão Fosfato de Sódio 20 mmol/L pH 7,0 para a extração das enzimas e as técnicas realizadas em placas de 96 poços com o eluído.

As atividades enzimáticas obtidas com o eluído foram comparadas aquelas obtidas com as técnicas já padronizadas e bem estabelecidas na literatura, que utilizam diretamente picotes de SPF de 1,2 mm. As atividades médias encontradas em ambos os métodos foram estatisticamente equivalentes, o que indica que a realização das medidas das atividades enzimáticas podem ser realizadas utilizando-se a extração da amostra com o TU. Os resultados dos testes de correlação também evidenciaram que ambas as técnicas são semelhantes, mais uma vez reforçando que a técnica utilizada a partir da eluição das amostras de SPF em TU pode ser utilizada com segurança para a determinação das atividades enzimáticas das enzimas estudadas.

O uso do TU em técnicas espectrofluorimétricas foi adaptado da utilização do TU em técnica de MS/MS (Li et al., 2004b). Nos últimos anos vários estudos em triagem neonatal foram realizados com ensaios *multiplex* em MS/MS, incluindo a investigação de DLDs (Chace e Kalas, 2005; Duffey et al., 2010; Gelb et al., 2006; Harmatz et al., 2013; Kumar et al., 2015; Lehotay et al., 2011; Metz et al., 2011; Navarrete-Martínez et al., 2017; Sista et al., 2013; Tortorelli et al., 2016; Zhang et al., 2008). A utilização do TU para a eluição dos picotes de SPF foi inicialmente padronizado em MS/MS para doenças de Fabry, Gaucher, Krabbe, Niemann-Pick A/B e Pompe (Lehotay et al., 2011) e hoje em dia é aplicado também para MPS I em programas de triagem neonatal com alta demanda. Apesar de relatado que foi desenvolvida essa metodologia em MS/MS para MPS II, IVA e VI, não há relatos dessa triagem com outros tipos de MPS (Kumar et al., 2015; Metz et al., 2011).

MS/MS é uma metodologia cara e com preparo complexo das amostras, não disponível na maioria dos laboratórios de pesquisa de pequeno porte,

principalmente em países em desenvolvimento. Tem sido descrito que essa metodologia tem um valor preditivo positivo igual a técnicas espectrofluorimétricas que utilizam 4-Metilumbeliferona (4-MU), como no nosso caso (Liao et al., 2014).

O aprimoramento e desenvolvimento de terapias e o aumento da disponibilidade dessas para as DLDs, juntamente com o desenvolvimento de métodos de diagnóstico precisos, levou a uma rápida identificação de indivíduos afetados prevenindo e minimizando danos irreversíveis causados pela progressão dessas doenças (Burlina et al., 2017). Tornou-se então fundamental, o desenvolvimento de programas de triagem neonatal com técnicas precisas, com o objetivo de detectar doenças tratáveis antes que se tornem sintomáticas (Lehotay et al., 2011; Wagner et al., 2016). Deste modo é imprescindível que cada laboratório estabeleça seus valores de *cut off* capazes de diferenciar indivíduos normais de afetados (Lehotay et al., 2011).

A triagem de diversas MPS simultaneamente sem a necessidade de sistemas automatizados em uma única amostra pode poupar tempo, consumo de reagentes e trabalho, além de ser menos dispendioso (Metz et al., 2011). A utilização de amostras de SPF nessas triagens permite a facilidade de transporte (Sharma et al., 2014), tem um baixo custo e reduz a possibilidade de contaminação (Wagner et al., 2016), além de que enzimas lisossomais podem manter-se estáveis por até alguns anos em temperatura ambiente (Gelb et al., 2006), o que além do envio, facilita o estoque de amostras nos laboratórios de triagem (de Castilhos et al., 2011).

Esse trabalho, portanto, mostrou que se utilizamos uma menor quantidade de SPF e uma extração da amostra com tampão adequado, é possível realizar-

se a medida de várias enzimas por mais de uma técnica espectrofluorimétrica em uma mesma amostra ou eluído. Isso economiza tempo de análise, uso de amostra e uma menor quantidade de reagentes aumentando a segurança dos resultados uma vez que a eluição reduz as variações causadas pela distribuição não homogênea do sangue pelo papel filtro (Duffey et al., 2010; Li et al., 2004a). O fato de diminuirmos o tempo para chegarmos a um diagnóstico rápido e preciso é essencial ao início do tratamento. Esperamos que esse tipo de análise possa ser futuramente utilizado também para a triagem de outras DLDs.

Após a realização do diagnóstico e a implementação do tratamento, outra tarefa cabe ao laboratório, aquela de acompanhar esse tratamento e observar se ele está sendo eficiente. Para tanto, os marcadores bioquímicos são fundamentais.

Algumas DLDs possuem marcadores bem estabelecidos, como a medida da atividade da enzima quitotriosidase na Doença de Gaucher, cuja atividade diminui com a implementação e eficácia do tratamento (Wajner et al., 2004).

Nas MPS, um marcador bioquímico utilizado é a medida da quantidade de GAGs na urina. É sabido que os GAGs diminuem com o tratamento, mas essa diminuição tende a atingir um platô. Após algum tempo de tratamento, a quantidade de GAGs permanecerá a mesma (Breier et al., 2016, 2014; Neufeld e Muenzer, 2014). Então, novos marcadores bioquímicos necessitam ser estabelecidos para essas doenças.

O EO é o desequilíbrio na produção de radicais livres que pode ser neutralizado pelas defesas antioxidantes do organismo (Hayashi et al., 2012; Valko et al., 2007). As EROS podem causar reações em cadeia de lesão celular

e já foram relacionados a várias doenças humanas (Filippon et al., 2011; Halliwell, 1994) incluindo os EIM (Barschak et al., 2006).

Os lisossomos são muito suscetíveis ao EO, pois as EROS podem induzir peroxidação lipídica desestabilizando a membrana lisossomal e liberando seu conteúdo no citoplasma da célula (Terman et al., 2006), por esse motivo a importância em investigar os efeitos das EROS nas DLDs. Em indivíduos com MPS pode ocorrer o aumento das defesas antioxidantes para o reestabelecimento da homeostase do organismo em resposta ao acúmulo de GAGs (Reolon et al., 2009). Atualmente existem trabalhos relacionando o EO em alguns tipos de MPS, sendo a maioria dos estudos em MPS I (Donida et al., 2015; Filippon et al., 2011; Pereira et al., 2008; Reolon et al., 2009). Nosso trabalho buscou observar e comparar se essas alterações ocorrem na MPS VI, que junto com a MPS I são os tipos mais frequentes no Brasil (Coelho et al., 1997) e possuem tratamento por TRE.

Foi observado que na avaliação da atividade da enzima SOD não houve diferença significativa entre os grupos estudados, o que corrobora com os resultados encontrados por Pereira et al., (2008). Esses pesquisadores mostraram que não havia alteração na atividade da SOD em indivíduos com MPS I antes da TRE. Em outros trabalhos, com outros tipos de MPS (MPS II - Filippon et al., 2011) ou mesmo outros EIM (Fenilcetonúria – Sirtori et al., 2005), também foi verificado que a atividade da SOD não está alterada. Por outro lado, um aumento na atividade da SOD foi observado na MPS IVA (Donida et al., 2015), e em indivíduos afetados com Doença de Gaucher (Mello et al., 2015). A não alteração nos níveis de atividade da SOD nos indivíduos com MPS I e VI

demonstra que a capacidade em agir como primeira defesa antioxidante enzimática não está prejudicada.

A atividade da CAT está diminuída em indivíduos afetados com MPS I e VI em relação aos controles saudáveis, o que pode sugerir que a capacidade antioxidante se encontra diminuída nesses tipos de MPS. Foi observado por Pereira et al., (2008) que a atividade da CAT em pacientes com MPS I durante TRE está aumentada em relação ao nível basal, embora não haja comparação com a atividade em indivíduos saudáveis (Filippon et al., 2011; Pereira et al., 2008).

Em nosso trabalho observamos uma maior quantidade de TBARS nas duas MPS estudadas quando comparado aos controles saudáveis, o que sugere um aumento na peroxidação lipídica, a qual é capaz de induzir mudanças de integridade, fluidez, permeabilidade e perda funcional de biomembranas, consequentemente gerando produtos potencialmente tóxicos (Ribas et al., 2012; Villani et al., 2009). No estudo de Pereira et al., (2008) os níveis de TBARS também se encontravam aumentados em indivíduos com MPS I, quando comparado à indivíduos saudáveis e não houve mudanças significativas nesses níveis durante a TRE. Durante essa terapia, os níveis se mantiveram altos sugerindo a peroxidação. Em estudos com MPS II, Negretto et al., (2014) e Filippon et al., (2011) observaram que os níveis de malonaldeído (MDA) estavam aumentados antes da TRE e apesar de diminuírem significativamente durante o tratamento, mantiveram-se maiores quando comparados aos controles. Considerando que o TBARS reflete o conteúdo de MDA, um produto final de quebra de lipídios na lipoperoxidação (Barschak et al., 2006), pode-se prever

que MPS I e VI, assim como outros EIM, induzem a peroxidação lipídica, provavelmente secundariamente a geração de radicais livres.

Em nosso conhecimento esse é o primeiro estudo relacionando parâmetros de EO e MPS VI, mostrando o aparente envolvimento do EO com a evolução das manifestações clínicas em MPS. Com os resultados encontrados podemos concluir que a MPS VI comporta-se como a MPS I, pois não foram encontradas diferenças entre essas duas MPS, não podendo distingui-las pelos parâmetros de EO abordados nesse trabalho. Isso pode estar relacionado ao tipo de GAG acumulado nessas duas MPS. Em ambas não ocorreu alteração na atividade da enzima SOD, porém a atividade de CAT diminuiu e foi observado uma maior quantidade de TBARS, sugerindo que ambos tipos de MPS são suscetíveis ao dano oxidativo. Trabalhos com o objetivo de se observar respostas à TRE em relação ao EO devem ser realizados na MPS VI. Assim, talvez possamos observar se esse parâmetro pode ser considerado um biomarcador durante a terapia.

CONCLUSÕES

1. Foi aprimorada a técnica de medida de atividade da beta-glicuronidase, reduzindo a quantidade de reagentes em 4 vezes utilizando-se o picote de sangue impregnado em papel filtro de 1,2 mm.
2. Os seguintes parâmetros bioquímicos da GUSB foram determinados:
pH ótimo: 4,4
Km: 1,25 mM
Vmáx: 594,48 nmol/h/mL
Termoestabilidade: inativação significativa da enzima a partir de 60 minutos a 60 °C
Tempo e temperatura de armazenamento do SPF: até 30 dias à 4, 25 e 37 °C, acima de 60 dias à - 20°C
3. Foi estabelecido o seguinte intervalo de referência da beta-glicuronidase para SPF de 1,2mm de indivíduos saudáveis: 174,4 nmol/h/mL a 781,9 nmol/h/mL com média de 511,1 nmol/h/mL \pm 133,3 nmol/h/mL
4. As enzimas alfa-iduronidase, arilsulfatase B e beta-glicuronidase foram medidas em SPF eluído em Tampão Universal preparado com Fosfato de Sódio 20 mmol/L pH 7,0. As seguintes médias de atividade foram determinadas para indivíduos saudáveis: a média da atividade de IDUA foi de 14,65 \pm 4,35 nmol/h/mL, ASB de 22,51 \pm 5,09 nmol/h/mL e GUSB de 531,92 \pm 121,05 nmol/h/mL em amostras eluídas em TU.

5. A correlação entre a medida da atividade das enzimas em tampão universal com a técnica espectrofluorimétrica já padronizada para cada enzima em sangue impregnado em papel filtro de 1,2 mm em amostras de indivíduos saudáveis foi significativamente positiva.

6. Foram analisados parâmetros bioquímicos envolvidos em estresse oxidativo no plasma de indivíduos com MPS VI e comparados com MPS I e controles saudáveis. A medida da atividade da SOD não diferiu entre os grupos, a atividade de CAT encontrava-se diminuída tanto em MPS VI quanto em MPS I e a dosagem de TBARS estava aumentada em ambas as MPS em relação aos controles

PERSPECTIVAS

- Aprimorar as demais técnicas de diagnóstico de MPS com a medida da atividade enzimática das hidrolases deficientes em sangue impregnado em papel filtro 1,2 mm;
- Utilizar o tampão universal preparado com Fosfato de Sódio 20 mmol/L pH 7,0 para a triagem simultânea de outras MPS;
- Analisar a resposta à TRE em relação ao estresse oxidativo, na MPS VI;
- Estudar as propriedades bioquímicas da GUSB em heterozigotos de modo a diferencia-los de afetados utilizando-se esses parâmetros para auxílio no diagnóstico;
- Estudar a resposta ao estresse oxidativo nos indivíduos heterozigotos para MPS I e VI comparando-a com a de indivíduos afetados.

REFERÊNCIAS

- Arfi, A., Richard, M., Gandolphe, C., Bonnefont-Rousselot, D., Thérond, P., Scherman, D., 2011. Neuroinflammatory and oxidative stress phenomena in MPS IIIA mouse model: The positive effect of long-term aspirin treatment. *Mol. Genet. Metab.* 103, 18–25. doi:10.1016/j.ymgme.2011.01.015
- Auray-Blais, C., Lavoie, P., Zhang, H., Gagnon, R., Clarke, J.T.R., Maranda, B., Young, S.P., An, Y., Millington, D.S., 2012. An improved method for glycosaminoglycan analysis by LC-MS/MS of urine samples collected on filter paper. *Clin. Chim. Acta* 413, 771–778. doi:10.1016/j.cca.2012.01.012
- Ballabio, A., Gieselmann, V., 2009. Lysosomal disorders: From storage to cellular damage. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1793, 684–696. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.12.001
- Barschak, A.G., Sitta, A., Deon, M., De Oliveira, M.H., Haeser, A., Dutra-Filho, C.S., Wajner, M., Vargas, C.R., 2006. Evidence that oxidative stress is increased in plasma from patients with maple syrup urine disease. *Metab. Brain Dis.* 21, 279–286. doi:10.1007/s11011-006-9030-5
- Beudet, A.L., DiFerrante, N.M., Ferry, G.D., Nichols, B.L., Mullins, C.E., 1975. Variation in the phenotypic expression of beta-glucuronidase deficiency. *J. Pediatr.* 86, 388–94.
- Bobillo Lobato, J., Hidalgo, M.J., Jiménez Jiménez, L.M., Sanchez-Alcazar, J.A., Battino, M., 2016. Biomarkers in Lysosomal Storage Diseases. *Diseases* 4, 1–17. doi:10.3390/diseases4040040
- Breier, A.C., Cé, J., Coelho, J.C., 2016. Use of a commercial agarose gel for analysis of urinary glycosaminoglycans in mucopolysaccharidoses. *Brazilian J. Pharm. Sci.* 52, 693–698. doi:10.1590/S1984-82502016000400013
- Breier, A.C., Cé, J., Coelho, J.C., 2014. Correlation of the levels of glycosaminoglycans between urine and dried urine in filter paper samples and their stability over time under different storage temperatures. *Clin. Chim. Acta* 433, 49–53. doi:10.1016/j.cca.2014.02.022
- Breier, A.C., Cé, J., Mezzalira, J., Daitx, V. V., Moraes, V.C., Goldim, M.P.S., Coelho, J.C., 2017. Alpha-L-iduronidase and arylsulfatase B in dried blood spots on filter paper: Biochemical parameters and time stability. *Clin.*

- Biochem. 50, 431–435. doi:10.1016/j.clinbiochem.2016.12.007
- Burlina, A.B., Polo, G., Salviati, L., Duro, G., Zizzo, C., Dardis, A., Bembi, B., Cazzorla, C., Rubert, L., Zordan, R., Desnick, R.J., Burlina, A.P., 2017. Newborn screening for lysosomal storage disorders by tandem mass spectrometry in North East Italy. doi:10.1007/s10545-017-0098-3
- Campos, D., Monaga, M., 2012. Mucopolysaccharidosis type I: Current knowledge on its pathophysiological mechanisms. *Metab. Brain Dis.* doi:10.1007/s11011-012-9302-1
- Castilhos, C.D., Mezzalira, J., Goldim, M.P.S., Daitx, V. V., Garcia, C. da S., Andrade, C. V., Breier, A.C., Cé, J., Mello, A.S., Coelho, J.C., 2014. Determination of the lysosomal hydrolase activity in blood collected on filter paper, an alternative to screen high risk populations. *Gene* 536, 344–347. doi:10.1016/j.gene.2013.11.101
- Chace, D.H., Kalas, T.A., 2005. A biochemical perspective on the use of tandem mass spectrometry for newborn screening and clinical testing. *Clin. Biochem.* doi:10.1016/j.clinbiochem.2005.01.017
- Chamoles, N.A., Blanco, M.B., Gaggioli, D., Casentini, C., 2001. Hurler-like phenotype: Enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. *Clin. Chem.* 47, 2098–2102.
- Champe, P.C., Harvey, R.A., Ferrier, D.R., 2007. *Bioquímica ilustrada*, 3ed ed, Bioquímica ilustrada. Artmed, Porto Alegre.
- Chimenti, C., Scopelliti, F., Vulpis, E., Tafani, M., Villanova, L., Verardo, R., De Paulis, R., Russo, M.A., Frustaci, A., 2015. Increased oxidative stress contributes to cardiomyocyte dysfunction and death in patients with Fabry disease cardiomyopathy. *Hum. Pathol.* 46, 1760–1768. doi:10.1016/j.humpath.2015.07.017
- Civallero, G., Michelin, K., de Mari, J., Viapiana, M., Burin, M., Coelho, J.C., Giugliani, R., 2006. Twelve different enzyme assays on dried-blood filter paper samples for detection of patients with selected inherited lysosomal storage diseases. *Clin. Chim. Acta* 372, 98–102. doi:10.1016/j.cca.2006.03.029
- Clarke, L.A., Winchester, B., Giugliani, R., Tylki-Szymańska, A., Amartino, H., 2012. Biomarkers for the mucopolysaccharidoses: Discovery and clinical utility. *Mol. Genet. Metab.* 106, 395–402. doi:10.1016/j.ymgme.2012.05.003

- Cobos, P.N., Steglich, C., Santer, R., Lukacs, Z., Gal, A., 2015. Dried blood spots allow targeted screening to diagnose mucopolysaccharidosis and mucolipidosis. *JIMD Rep.* 15, 123–32. doi:10.1007/8904_2014_308
- Coelho, J.C., Wajner, M., Burin, M.G., Vargas, C.R., Giugliani, R., 1997. Selective screening of 10,000 high-risk Brazilian patients for the detection of inborn errors of metabolism. *Eur. J. Pediatr.* doi:10.1007/s004310050685
- Coppa, G. V., Buzzega, D., Zampini, L., MacCari, F., Galeazzi, T., Padella, L., Santoro, L., Gabrielli, O., Volpi, N., 2012. Agarose-gel electrophoresis for the diagnosis of mucopolysaccharidoses. *Clin. Chem. Lab. Med.* 50, 589–592. doi:10.1515/cclm.2011.798
- Coutinho, M., Santos, J., Matos, L., Alves, S., 2016. Genetic Substrate Reduction Therapy: A Promising Approach for Lysosomal Storage Disorders. *Diseases* 4, 33. doi:10.3390/diseases4040033
- Coutinho, M.F., Lacerda, L., Alves, S., 2012. Glycosaminoglycan storage disorders: A review. *Biochem. Res. Int.* 2012, 471325. doi:10.1155/2012/471325
- de Castilhos, C.D., Mezzalira, J., Goldim, M.P.S., Coelho, J.C., 2011. Influence of pre-analytical factors on alpha-galactosidase A, arylsulfatase B and alpha-glucosidase activities measured on dried blood spots on filter paper. *Clin. Biochem.* 44, 922–926. doi:10.1016/j.clinbiochem.2011.03.138
- Donida, B., Marchetti, D.P., Biancini, G.B., Deon, M., Manini, P.R., da Rosa, H.T., Moura, D.J., Saffi, J., Bender, F., Burin, M.G., Coitinho, A.S., Giugliani, R., Vargas, C.R., 2015. Oxidative stress and inflammation in mucopolysaccharidosis type IVA patients treated with enzyme replacement therapy. *Biochim. Biophys. Acta* 1852, 1012–9. doi:10.1016/j.bbadis.2015.02.004
- Duffey, T.A., Bellamy, G., Elliott, S., Fox, A.C., Glass, M., Turecek, F., Gelb, M.H., Scott, C.R., 2010. A tandem mass spectrometry triplex assay for the detection of fabry, pompe, and mucopolysaccharidosis-I (Hurler). *Clin. Chem.* 56, 1854–1861. doi:10.1373/clinchem.2010.152009
- El-Hattab, A.W., 2015. Inborn Errors of Metabolism. *Clin. Perinatol.* doi:10.1016/j.clp.2015.02.010
- Ferreira, C.R., Gahl, W.A., 2017. Lysosomal storage diseases. *Transl. Sci. Rare Dis.* 2, 1–71. doi:10.3233/TRD-160005

- Filippon, L., Vanzin, C.S., Biancini, G.B., Pereira, I.N., Manfredini, V., Sitta, A., Peralba, M. do C.R., Schwartz, I.V.D., Giugliani, R., Vargas, C.R., 2011. Oxidative stress in patients with mucopolysaccharidosis type II before and during enzyme replacement therapy. *Mol. Genet. Metab.* 103, 121–127. doi:10.1016/j.ymgme.2011.02.016
- Futerman, A.H., van Meer, G., 2004. The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 554.
- Gelb, M.H., Turecek, F., Scott, C.R., Chamoles, N.A., 2006. Direct multiplex assay of enzymes in dried blood spots by tandem mass spectrometry for the newborn screening of lysosomal storage disorders. *J. Inherit. Metab. Dis.* 29, 397–404. doi:10.1007/s10545-006-0265-4
- Giugliani, R., Federhen, A., Vairo, F., Vanzella, C., Pasqualim, G., da Silva, L.M.R., Giugliani, L., de Boer, A.P.K., de Souza, C.F.M., Matte, U., Baldo, G., 2016. Emerging drugs for the treatment of mucopolysaccharidoses. *Expert Opin. Emerg. Drugs* 21, 9–26. doi:10.1517/14728214.2016.1123690
- Goldim, M.P. de S., Garcia, C. da S., de Castilhos, C.D., Daitx, V.V., Mezzalira, J., Breier, A.C., Cé, J., Mello, A., Andrade, C.V., Sartori, N., Coelho, J.C., 2012. Screening of high-risk Gaucher disease patients in Brazil using miniaturized dried blood spots and leukocyte techniques. *Gene* 508, 197–198. doi:10.1016/j.gene.2012.07.011
- Halliwell, B., 1994. Free radicals, antioxidants, and human disease: Curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 344, 721–724. doi:10.1016/S0140-6736(94)92211-X
- Harmatz, P., Mengel, K.E., Giugliani, R., Valayannopoulos, V., Lin, S.P., Parini, R., Guffon, N., Burton, B.K., Hendriksz, C.J., Mitchell, J., Martins, A., Jones, S., Guelbert, N., Vellodi, A., Hollak, C., Slasor, P., Decker, C., 2013. The Morquio A Clinical Assessment Program: Baseline results illustrating progressive, multisystemic clinical impairments in Morquio A subjects. *Mol. Genet. Metab.* 109, 54–61. doi:10.1016/j.ymgme.2013.01.021
- Hayashi, M., Miyata, R., Tanuma, N., 2012. Oxidative stress in developmental brain disorders, in: Ahmad, S.I. (Ed.), *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, pp. 278–290. doi:10.1007/978-1-4614-0653-2_21
- Hopwood, J.J., Muller, V., Smithson, A., Baggett, N., 1979. A fluorometric assay

- using 4-methylumbelliferyl α -L-iduronide for the estimation of α -L-iduronidase activity and the detection of Hurler and Scheie syndromes. *Clin. Chim. Acta* 92, 257–265. doi:10.1016/0009-8981(79)90121-9
- Karam, Giugliani, R., Schwartz, I.V.D., 2001. Introdução e aspectos clínicos, in: CARAKUSHANSKY, G. (Ed.), *Doenças Genéticas Em Pediatria*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 155–158.
- Kolling, J., Scherer, E.B.S., Siebert, C., Marques, E.P., dos Santos, T.M., Wyse, A.T.S., 2014. Creatine prevents the imbalance of redox homeostasis caused by homocysteine in skeletal muscle of rats. *Gene* 545, 72–79. doi:10.1016/j.gene.2014.05.005
- Kumar, A.B., Masi, S., Ghomashchi, F., Chennamaneni, N.K., Ito, M., Scott, C.R., Turecek, F., Gelb, M.H., Spacil, Z., 2015. Tandem mass spectrometry has a larger analytical range than fluorescence assays of lysosomal enzymes: Application to newborn screening and diagnosis of mucopolysaccharidoses types II, IVA, and VI. *Clin. Chem.* 61, 1363–1371. doi:10.1373/clinchem.2015.242560
- Lampe, C., Bellettato, C.M., Karabul, N., Scarpa, M., 2013. Mucopolysaccharidoses and other lysosomal storage diseases. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 39, 431–455. doi:10.1016/j.rdc.2013.03.004
- Lawrence, R., Brown, J.R., Lorey, F., Dickson, P.I., Crawford, B.E., Esko, J.D., 2014. Glycan-based biomarkers for mucopolysaccharidoses. *Mol. Genet. Metab.* 111, 73–83. doi:10.1016/j.ymgme.2013.07.016
- Lehman, T.J.A., Miller, N., Norquist, B., Underhill, L., Keutzer, J., 2011. Diagnosis of the mucopolysaccharidoses. *Rheumatology* 50, v41-8. doi:10.1093/rheumatology/ker390
- Lehotay, D.C., Hall, P., Lepage, J., Eichhorst, J.C., Etter, M.L., Greenberg, C.R., 2011. LC-MS/MS progress in newborn screening. *Clin. Biochem.* doi:10.1016/j.clinbiochem.2010.08.007
- Li, Y., Brockmann, K., Turecek, F., Scott, C.R., Gelb, M.H., 2004a. Tandem Mass Spectrometry for the Direct Assay of Enzymes in Dried Blood Spots: Application to Newborn Screening for Krabbe Disease. *Clin. Chem.* 50, 638–640. doi:10.1373/clinchem.2003.028381
- Li, Y., Scott, C.R., Chamoles, N.A., Ghavami, A., Pinto, B.M., Turecek, F., Gelb, M.H., 2004b. Direct multiplex assay of lysosomal enzymes in dried blood

- spots for newborn screening [WWW Document]. doi:10.1373/clinchem.2004.035907.Direct
- Liao, H.C., Chiang, C.C., Niu, D.M., Wang, C.H., Kao, S.M., Tsai, F.J., Huang, Y.H., Liu, H.C., Huang, C.K., Gao, H.J., Yang, C.F., Chan, M.J., Lin, W. De, Chen, Y.J., 2014. Detecting multiple lysosomal storage diseases by tandem mass spectrometry - A national newborn screening program in Taiwan. *Clin. Chim. Acta* 431, 80–86. doi:10.1016/j.cca.2014.01.030
- Lukacs, Z., Nieves Cobos, P., Keil, A., Hartung, R., Mengel, E., Beck, M., Deschauer, M., Hanisch, F., Santer, R., 2011. Dried blood spots in the diagnosis of lysosomal storage disorders-Possibilities for newborn screening and high-risk population screening. *Clin. Biochem.* 44, 476–467. doi:10.1016/j.clinbiochem.2011.03.008
- Mak, C.M., Lee, H.C.H., Chan, A.Y.W., Lam, C.W., 2013. Inborn errors of metabolism and expanded newborn screening: Review and update. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 50, 142–162. doi:http://dx.doi.org/10.3109/10408363.2013.847896
- Mandelli, J., Wajner, A., Pires, R., Giugliani, R., Coelho, J.C., 2002. Detection of mucopolysaccharidosis type I heterozygotes based on the biochemical characteristics of leukocyte ??-L-iduronidase. *Arch. Med. Res.* doi:10.1016/S0188-4409(01)00334-4
- Martell, L., Lau, K., Mei, M., Burnett, V., Decker, C., Foehr, E.D., 2011. Biomarker analysis of Morquio syndrome: identification of disease state and drug responsive markers. *Orphanet J. Rare Dis.* 6, 84. doi:10.1186/1750-1172-6-84
- Mello, A.S., da Silva Garcia, C., de Souza Machado, F., da Silva Medeiros, N., Wohlenberg, M.F., Marinho, J.P., Dani, C., Funchal, C., Coelho, J.C., 2015. Oxidative stress parameters of Gaucher disease type I patients. *Mol. Genet. Metab. Reports* 4, 1–5. doi:10.1016/j.ymgmr.2015.05.001
- Metz, T.F., Mechtler, T.P., Orsini, J.J., Martin, M., Shushan, B., Herman, J.L., Ratschmann, R., Item, C.B., Streubel, B., Herkner, K.R., Kasper, D.C., 2011. Simplified newborn screening protocol for lysosomal storage disorders. *Clin. Chem.* 57, 1286–1294. doi:10.1373/clinchem.2011.164640
- Michelin, K., Wajner, A., Bock, H., Fachel, Â., Rosenberg, R., Flores Pires, R., Saraiva Pereira, M.L., Giugliani, R., Coelho, J.C., 2005. Biochemical

- properties of β -glucosidase in leukocytes from patients and obligated heterozygotes for Gaucher disease carriers. *Clin. Chim. Acta* 362, 101–109. doi:10.1016/j.cccn.2005.06.010
- Montaño, A.M., Lock-Hock, N., Steiner, R.D., Graham, B.H., Szlago, M., Greenstein, R., Pineda, M., Gonzalez-Meneses, A., Çoker, M., Bartholomew, D., Sands, M.S., Wang, R., Giugliani, R., Macaya, A., Pastores, G., Ketko, A.K., Ezgü, F., Tanaka, A., Arash, L., Beck, M., Falk, R.E., Bhattacharya, K., Franco, J., White, K.K., Mitchell, G.A., Cimbališiene, L., Holtz, M., Sly, W.S., 2016. Clinical course of sly syndrome (mucopolysaccharidosis type VII). *J. Med. Genet.* 53, 403–418. doi:10.1136/jmedgenet-2015-103322
- Muenzer, J., 2014. Early initiation of enzyme replacement therapy for the mucopolysaccharidoses. *Mol. Genet. Metab.* 111, 63–72. doi:10.1016/j.ymgme.2013.11.015
- Muenzer, J., 2004. The mucopolysaccharidoses: A heterogeneous group of disorders with variable pediatric presentations. *J. Pediatr.* 144, S27-34. doi:10.1016/j.jpeds.2004.01.052
- Müller, K.B., Galdieri, L.C., Pereira, V.G., Martins, A.M., D'Almeida, V., 2012. Evaluation of oxidative stress markers and cardiovascular risk factors in Fabry Disease patients. *Genet. Mol. Biol.* 35, 418–423. doi:10.1590/S1415-47572012005000031
- Müller, K.B., Rodrigues, M.D., Pereira, V.G., Martins, A.M., D'Almeida, V., 2010. Reference values for lysosomal enzymes activities using dried blood spots samples - a Brazilian experience. *Diagn. Pathol.* 5, 65. doi:10.1186/1746-1596-5-65
- Nampoothiri, S., Kappanayil, M., Hiran, K.R., Sunitha, V., 2008. Sly Disease: Mucopolysaccharidosis Type VII. *Indian Pediatr.* 45, 859–861.
- Navarrete-Martínez, J.I., Limón-Rojas, A.E., Gaytán-García, M. de J., Reyna-Figueroa, J., Wakida-Kusunoki, G., Delgado-Calvillo, M. del R., Cantú-Reyna, C., Cruz-Camino, H., Cervantes-Barragán, D.E., 2017. Newborn screening for six lysosomal storage disorders in a cohort of Mexican patients: Three-year findings from a screening program in a closed Mexican health system. *Mol. Genet. Metab.* 121, 16–21. doi:10.1016/j.ymgme.2017.03.001
- Negretto, G.W., Deon, M., Biancini, G.B., Burin, M.G., Giugliani, R., Vargas, C.R.,

2014. Glycosaminoglycans can be associated with oxidative damage in mucopolysaccharidosis II patients submitted to enzyme replacement therapy. *Cell Biol. Toxicol.* 30, 189–193. doi:10.1007/s10565-014-9284-3
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2008. *Lehninger Principles of Biochemistry*, 5ed. ed, Lehninger Principles of Biochemistry. W.H. Freeman and company, New York, NY.
- Neufeld, E.F., Muenzer, J., 2014. The Mucopolysaccharidoses, in: Beaudet, A.L., Vogelstein, B., Kinzler, K.W., Antonarakis, S.E., Ballabio, A., Gibson, K.M., Mitchell, G. (Eds.), *The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. The McGraw-Hill Companies, Inc., New York, NY.
- Olivova, P., der Veen, K. van, Cullen, E., Rose, M., Zhang, X.K., Sims, K.B., Keutzer, J., Browning, M.F., 2009. Effect of sample collection on alfa-galactosidase A enzyme activity measurements in dried blood spots on filter paper. *Clin. Chim. Acta* 403, 159–162. doi:10.1016/j.cca.2009.02.008
- Pereira, V.G., Martins, A.M., Micheletti, C., D'Almeida, V., 2008. Mutational and oxidative stress analysis in patients with mucopolysaccharidosis type I undergoing enzyme replacement therapy. *Clin. Chim. Acta* 387, 75–79. doi:10.1016/j.cca.2007.09.008
- Politei, J., Schenone, A., Blanco, M., Szlago, M., 2014. Mucopolisacaridosis VI: aspectos clínicos, diagnósticos y del tratamiento con terapia de reemplazo enzimático. *Arch Argent Pediatr* 112, 258–262. doi:10.5546/aap.2014.258
- Poswar, F., Baldo, G., Giugliani, R., 2017. Phase I and II clinical trials for the mucopolysaccharidoses. *Expert Opin. Investig. Drugs*. doi:10.1080/13543784.2017.1397130
- Preissler, T., Bristot, I.J., Costa, B.M.L., Fernandes, E.K., Rieger, E., Bortoluzzi, V.T., de Franceschi, I.D., Dutra-Filho, C.S., Moreira, J.C.F., Wannmacher, C.M.D., 2016. Phenylalanine induces oxidative stress and decreases the viability of rat astrocytes: possible relevance for the pathophysiology of neurodegeneration in phenylketonuria. *Metab. Brain Dis.* 31, 529–537. doi:10.1007/s11011-015-9763-0
- Rahman, K., 2007. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin. Interv. Aging* 2, 219–236. doi:http://dx.doi.org/
- Reolon, G.K., Reinke, A., De Oliveira, M.R., Braga, L.M., Camassola, M., Andrades, M.É., Moreira, J.C.F., Nardi, N.B., Roesler, R., Dal-Pizzol, F.,

2009. Alterations in oxidative markers in the cerebellum and peripheral organs in MPS i Mice. *Cell. Mol. Neurobiol.* 29, 443–448. doi:10.1007/s10571-008-9335-5
- Reuser, A.J., Verheijen, F.W., Bali, D., van Diggelen, O.P., Germain, D.P., Hwu, W.L., Lukacs, Z., Mühl, A., Olivova, P., Piraud, M., Wuyts, B., Zhang, K., Keutzer, J., 2011. The use of dried blood spot samples in the diagnosis of lysosomal storage disorders - Current status and perspectives. *Mol. Genet. Metab.* 104, 144–148. doi:10.1016/j.ymgme.2011.07.014
- Ribas, G.S., Pires, R., Coelho, J.C., Rodrigues, D., Mescka, C.P., Vanzin, C.S., Biancini, G.B., Negretto, G., Wayhs, C.A., Wajner, M., Vargas, C.R., 2012. Oxidative stress in Niemann-Pick type C patients: a protective role of N-butyl-deoxynojirimycin therapy. *Int J Dev Neurosci* 30, 439–444. doi:10.1016/j.ijdevneu.2012.07.002
- Rodrigues, M.D.B., de Oliveira, A.C., Müller, K.B., Martins, A.M., D’Almeida, V., 2009. Chitotriosidase determination in plasma and in dried blood spots: a comparison using two different substrates in a microplate assay. *Clin. Chim. Acta.* 406, 86–8. doi:10.1016/j.cca.2009.05.022
- Roversi, F.M., Galdieri, L.C., Grego, B.H.C., Souza, F.G., Micheletti, C., Martins, A.M., D’Almeida, V., 2006. Blood oxidative stress markers in Gaucher disease patients. *Clin Chim Acta* 364, 316–320. doi:10.1016/j.cca.2005.07.022
- Saudubray, J.-M., Charpentier, C., 2014. Clinical Phenotypes: Diagnosis/Algorithms, in: Beaudet, A.L., Vogelstein, B., Kinzler, K.W., Antonarakis, S.E., Ballabio, A., Gibson, K.M., Mitchell, G. (Eds.), *The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. The McGraw-Hill Companies, Inc., New York, NY.
- Schwartz, I. V., 2001. Mucopolissacaridoses, in: CARAKUSHANSKY, G. (Ed.), *Doenças Genéticas Em Pediatria*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 180–184.
- Sharma, A., Jaiswal, S., Shukla, M., Lal, J., 2014. Dried blood spots: Concepts, present status, and future perspectives in bioanalysis. *Drug Test. Anal.* 6, 399–414. doi:10.1002/dta.1646
- Sirtori, L.R., Dutra-Filho, C.S., Fitarelli, D., Sitta, A., Haeser, A., Barschak, A.G., Wajner, M., Coelho, D.M., Llesuy, S., Belló-Klein, A., Giugliani, R., Deon, M.,

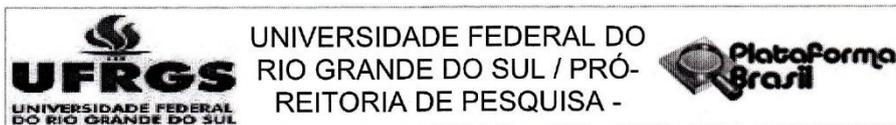
- Vargas, C.R., 2005. Oxidative stress in patients with phenylketonuria. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1740, 68–73. doi:10.1016/j.bbadis.2005.02.005
- Sista, R.S., Wang, T., Wu, N., Graham, C., Eckhardt, A., Winger, T., Srinivasan, V., Bali, D., Millington, D.S., Pamula, V.K., 2013. Multiplex newborn screening for Pompe, Fabry, Hunter, Gaucher, and Hurler diseases using a digital microfluidic platform. *Clin. Chim. Acta* 424, 12–18. doi:10.1016/j.cca.2013.05.001
- Sly, W.S., Quinton, B.A., McAlister, W.H., Rimoin, D.L., 1973. Beta glucuronidase deficiency: Report of clinical, radiologic, and biochemical features of a new mucopolysaccharidosis. *J. Pediatr.* 82, 249–257. doi:10.1016/S0022-3476(73)80162-3
- Smith, C., Marks, A.D., Lieberman, M., 2007. *Bioquímica Médica Básica de Marks*, 2 ed. ed. Editora Artmed.
- Terman, A., Kurz, T., Gustafsson, B., Brunk, U.T., 2006. Lysosomal labilization. *IUBMB Life* 58, 531–539. doi:10.1080/15216540600904885
- Tomatsu, S., Fujii, T., Fukushi, M., Oguma, T., Shimada, T., Maeda, M., Kida, K., Shibata, Y., Futatsumori, H., Montaña, A.M., Mason, R.W., Yamaguchi, S., Suzuki, Y., Orii, T., 2013. Newborn screening and diagnosis of mucopolysaccharidoses. *Mol. Genet. Metab.* 110, 42–53. doi:10.1016/j.ymgme.2013.06.007
- Tortorelli, S., Turgeon, C.T., Gavrilov, D.K., Oglesbee, D., Raymond, K.M., Rinaldo, P., Matern, D., 2016. Simultaneous testing for 6 lysosomal storage disorders and x-adrenoleukodystrophy in dried blood spots by tandem mass spectrometry. *Clin. Chem.* 62, 1248–1254. doi:10.1373/clinchem.2016.256255
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int.J Biochem Cell Biol.* 39, 44–84. doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001
- Vasconcelos, S.M.L., Goulart, M.O.F., Moura, J.B.D.F., Manfredini, V., Benfato, M.D.S., Kubota, L.T., 2007. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim. Nova* 30, 1323–

1338. doi:10.1590/S0100-40422007000500046

- Villani, G.R.D., Domenico, C. Di, Musella, A., Cecere, F., Napoli, D. Di, Natale, P. Di, 2009. Mucopolysaccharidosis IIIB: Oxidative damage and cytotoxic cell involvement in the neuronal pathogenesis. *Brain Res.* 1279, 99–108. doi:10.1016/j.brainres.2009.03.071
- Wagner, M., Tonoli, D., Varesio, E., Hopfgartner, G., 2016. The use of mass spectrometry to analyze dried blood spots. *Mass Spectrom. Rev.* doi:10.1002/mas.21441
- Wajner, A., Michelin, K., Burin, M.G., Pires, R.F., Pereira, M.L.S., Giugliani, R., Coelho, J.C., 2004. Biochemical characterization of chitotriosidase enzyme: Comparison between normal individuals and patients with Gaucher and with Niemann-Pick diseases. *Clin. Biochem.* 37, 893–897. doi:10.1016/j.clinbiochem.2004.06.008
- Wenger, D.A., Coppola, S., Liu, S.L., 2003. Insights into the diagnosis and treatment of lysosomal storage diseases. *Arch. Neurol.* 60, 322–328. doi:10.1001/archneur.60.3.322
- Wood, T., Bodamer, O.A., Burin, M.G., D’Almeida, V., Fietz, M., Giugliani, R., Hawley, S.M., Hendriksz, C.J., Hwu, W.L., Ketteridge, D., Lukacs, Z., Mendelsohn, N.J., Miller, N., Pasquali, M., Schenone, A., Schoonderwoerd, K., Winchester, B., Harmatz, P., 2012. Expert recommendations for the laboratory diagnosis of MPS VI. *Mol. Genet. Metab.* 106, 73–82. doi:10.1016/j.ymgme.2012.02.005
- Zhang, X.K., Elbin, C.S., Chuang, W.-L., Cooper, S.K., Marashio, C.A., Beauregard, C., Keutzer, J.M., 2008. Multiplex enzyme assay screening of dried blood spots for lysosomal storage disorders by using tandem mass spectrometry. *Clin. Chem.* 54, 1725–8. doi:10.1373/clinchem.2008.104711

ANEXOS

ANEXO 1 - APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: TRIAGEM LABORATORIAL DE MUCOPOLISSACARIDOSES I, II, VI e VII: APERFEIÇOAMENTO DE TÉCNICAS FLUORIMÉTRICAS DE DIAGNÓSTICO COM A UTILIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE SANGUE IMPREGNADO EM PAPEL FILTRO ELUÍDAS EM TAMPÃO UNIVERSAL

Pesquisador: Janice Carneiro Coelho

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 34939414.0.0000.5347

Instituição Proponente: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 850.927

Data da Relatoria: 09/10/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de Doutorado, vinculado ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica da UFRGS. Mucopolissacaridoses (MPS) são erros inatos do metabolismo, decorrentes de deficiência na atividade de enzimas que catalisam a degradação de glicosaminoglicanos (GAG). Há sete tipos, e esta pesquisa se propõe a avaliar MPS dos tipos I, II, VI e VII, causadas pela deficiência, respectivamente, de -iduronidase, iduronato-2-sulfatase, arilsulfatase B e -glicuronidase. O diagnóstico definitivo de MPS é feito por meio da observação da deficiência da atividade enzimática, juntamente com a presença de achados clínicos e concentração elevada de GAG na urina. Técnicas de medida da atividade enzimática em sangue impregnado em papel filtro (SPF) foram desenvolvidas e padronizadas, porém são utilizadas apenas como metodologia de triagem. O uso do tampão universal (TU) é uma alternativa, que, além de possibilitar a quantificação de proteínas, permite a determinação da atividade de diversas enzimas, a partir do mesmo eluato, diminuindo os custos do exame. A padronização dessa metodologia em técnicas fluorimétricas tornará a triagem de MPS mais acessível.

Objetivo da Pesquisa:

Esta pesquisa tem por objetivos gerais estabelecer o uso do tampão fosfato de sódio 20 mmol/L,

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha **CEP:** 90.040-060
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br

pH 7,0 (tampão universal), e estudar parâmetros bioquímicos para aperfeiçoar técnicas fluorimétricas de medida de atividade enzimática em sangue impregnado em papel filtro das enzimas envolvidas nas mucopolissacaridoses dos tipos I, II, VI e VII'.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos e benefícios estão adequadamente descritos no projeto de pesquisa, no TCLE e na Plataforma Brasil.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de projeto de pesquisa que visa estabelecer a metodologia de eluição de sangue, impregnado em papel filtro, em tampão fosfato 20 mmol/L (pH=7), para utilização em medida da atividade de enzimas relacionadas a mucopolissacaridoses. Serão analisadas amostras de sangue de indivíduos adultos, de dois grupos: (a) saudáveis voluntários (controles) e (b) de indivíduos com mucopolissacaridoses, de tipos I, II, VI ou VII. Quanto ao primeiro grupo, as amostras serão obtidas de doadores voluntários, convidados a participar da pesquisa, por meio de abordagem direta, no Banco de Sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Foi anexado Termo de Concordância do Banco de Sangue do HCPA para a realização da pesquisa. O recrutamento dos participantes com mucopolissacaridose dos tipos I, II, VI e VII será feito por e-mail, com a intermediação da Associação Gaúcha de Mucopolissacaridoses (AGMPS). As amostras de sangue serão coletadas por uma das pesquisadoras do projeto, com formação biomédica, que irá ao encontro desses indivíduos. Foram anexados, ao projeto, Termo de Concordância da Associação Gaúcha de Mucopolissacaridoses e texto a ser enviado aos membros da referida associação.

Foi realizado cálculo de tamanho amostral, com estimativa de 8 indivíduos afetados com cada um dos tipos de MPS – I, II, VI e VII – e 8 indivíduos saudáveis voluntários, em cada análise (4 grupos controles). Para tal, foi utilizado o programa Minitab®, considerando o desvio padrão encontrado na literatura para a atividade enzimática da -iduronidase, enzima deficiente em indivíduos afetados com Mucopolissacaridose I, e margem de erro de 5%.

No projeto e na Plataforma, cronograma e orçamento estão adequadamente apresentados. O descarte de materiais e de resíduos foi adequadamente descrito.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram anexados TCLE e Parecer Circunstanciado de aprovação do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, vinculado do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS. Foram anexados Termo de Concordância do Banco de Sangue do HCPA e Termo de Concordância da Associação Gaúcha de Mucopolissacaridoses.

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha **CEP:** 90.040-060
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO SUL / PRÓ-
REITORIA DE PESQUISA -



Continuação do Parecer: 850.927

Recomendações:

Recomenda-se aprovação pelo CEP-UFRGS.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O presente projeto atende ao que está previsto na Resolução do Conselho Nacional de Saúde número 466, de 12 de dezembro de 2012, sendo, portanto, recomendada sua aprovação pelo CEP/UFRGS.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado

PORTO ALEGRE, 30 de Outubro de 2014

Assinado por:

MARIA DA GRAÇA CORSO DA MOTTA
(Coordenador)

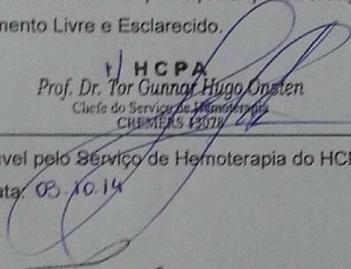
Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha CEP: 90.040-060
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-4085 E-mail: etica@propesq.ufrgs.br

ANEXO 2 - TERMO DE CONCORDÂNCIA BANCO DE SANGUE -HCPA

Termo de Concordância - HCPA

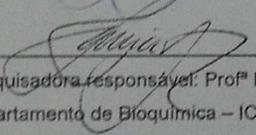
Concordo com a coleta de 10 amostras de sangue contendo 10 mL cada a cada semestre de duração do estudo, durante quatro semestres a partir de janeiro de 2015, para a realização do projeto "Triagem laboratorial de mucopolissacarídeos I, II, VI e VII: aperfeiçoamento de técnicas fluorimétricas de diagnóstico com a utilização de amostras de sangue impregnado em papel filtro eluídas em tampão universal" que está sendo desenvolvido pela doutoranda Jaqueline Cé do Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do ICBS/UFRGS. As amostras solicitadas serão para uso deste projeto como grupo controle durante as dosagens enzimáticas em leucócitos, plasma e sangue impregnado em papel filtro.

Outrossim, fui informado que, como já realizado em estudos anteriores, serão entregues às coletadoras os tubos heparinizados para obtenção do material previamente solicitado ao participante por abordagem direta e assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.


HCPA
Prof. Dr. Tor Gunnar Hugo Onsten
Chefe do Serviço de Hemoterapia
CUNIVERS 43079

Responsável pelo Serviço de Hemoterapia do HCPA:

Local e data: 03.10.14


Pesquisadora responsável: Prof.ª Dr.ª Janice Carneiro Coelho
Departamento de Bioquímica – ICBS – UFRGS

ANEXO 3 - TERMO DE CONCORDÂNCIA ASSOCIAÇÃO GAÚCHA DE MPS

Termo de Concordância - Associação Gaúcha de MPS

Concordo em divulgar, por meio de cartaz, às famílias gaúchas com portadores de MPS o projeto de doutorado "Triagem laboratorial de mucopolissacarídeos I, II, VI e VII: aperfeiçoamento de técnicas fluorimétricas de diagnóstico com a utilização de amostras de sangue impregnado em papel filtro eluídas em tampão universal". Este cartaz terá o objetivo de convidá-las a participarem do projeto que está sendo desenvolvido pela doutoranda Jaqueline Cé do Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do ICBS/UFRGS

Fui informada que este projeto tem por objetivo principal melhorar o diagnóstico desta doença e que as amostras de sangue solicitadas serão para uso exclusivo do mesmo. As amostras serão processadas para medida de atividades enzimáticas em leucócitos, plasma e sangue impregnado em papel filtro.



Presidente da Associação Gaúcha de MPS: Deise Zanin

Local e data: *Boaiaras, 02 outubro de 2011.*



Pesquisadora responsável: Profª Drª Janice Carneiro Coelho
Departamento de Bioquímica – ICBS – UFRGS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar de um trabalho intitulado “Triagem laboratorial de mucopolissacaridoses I, II, VI e VII: aperfeiçoamento de técnicas fluorimétricas de diagnóstico com a utilização de amostras de sangue impregnado em papel filtro eluídas em tampão universal”.

Esse estudo será de importância para o estabelecimento de novas formas de diagnóstico de doenças genéticas raras chamadas Mucopolissacaridoses, tendo por objetivo aperfeiçoar e desenvolver novos métodos de identificação da doença.

As Mucopolissacaridoses provocam principalmente dificuldades de movimentação e crescimento, além de afetar diversos órgãos causando o mau funcionamento de fígado e baço, por exemplo. Não há como reverter os sintomas já instalados, mas com o tratamento adequado, pode-se impedir que eles progridam. Nem todas as mucopolissacaridoses têm tratamento específico, desse modo o diagnóstico precoce da doença permite que sejam realizados procedimentos que forneçam uma melhor qualidade de vida às pessoas acometidas por essa enfermidade.

O estudo será desenvolvido no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo – Doenças Lisossômicas de Depósito do Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e tem como pesquisadora responsável a Prof^a. PhD. Janice Carneiro Coelho e como executadora a doutoranda Jaqueline Cé do Programa de Pós Graduação em Bioquímica da UFRGS. Em qualquer etapa do estudo você terá acesso aos pesquisadores responsáveis para o esclarecimento de eventuais dúvidas através do telefone (51) 33085549. Além disso, o Comitê de Ética em pesquisa da UFRGS, telefone (51) 33083738, também poderá ser contatado, caso você tenha dúvidas e deseje esclarecimentos adicionais sobre a pesquisa.

Procedimentos a serem realizados/Riscos individuais

Está sendo solicitada a doação de cerca de 10mL de sangue. Isto pode causar dor e desconforto momentâneo ou provocar o desenvolvimento de hematoma no local da coleta. Não há benefícios diretos aos participantes, os benefícios do estudo serão o desenvolvimento e aprimoramento de métodos para o diagnóstico das mucopolissacaridoses.

Fica claro que sua participação na pesquisa é voluntária, sendo que você poderá desistir de fazer parte do trabalho a qualquer momento, sem qualquer tipo de constrangimento, restrições ou consequências por parte dos pesquisadores. No caso de aceite, fica claro que não haverá benefício financeiro pela sua participação.

Confidencialidade

O material será utilizado apenas para fins de pesquisa, sendo garantido que as informações obtidas serão confidenciais, pois as amostras de sangue receberão um número sequencial pelo qual serão identificadas, deste modo a identidade dos participantes será desconhecida pela equipe do trabalho de pesquisa no momento das análises.

Pelo presente, declaro que fui devidamente informado sobre o projeto de pesquisa de forma clara da liberdade de não participar do estudo e tive minhas dúvidas esclarecidas. Concordo, voluntariamente, em participar deste estudo e estou ciente que receberei uma cópia desse termo de consentimento livre e esclarecido, onde se encontra o objetivo do projeto e os contatos dos pesquisadores e do comitê de ética em pesquisa da UFRGS.

Identificação do voluntário

Nome: _____

Local e Data: _____, ____/____/____

Pesquisadora responsável: Prof^a. PhD. Janice Carneiro Coelho

Pesquisadora executora: Jaqueline Cé

Assinatura Pesquisadora

Assinatura participante