

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

**MARLI VIAPIANA CAMELIER**

**AVALIAÇÃO DO USO DE AMOSTRAS DE LEUCÓCITOS IMPREGNADOS EM  
PAPEL FILTRO PARA O DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS LISOSSÔMICAS**

**Porto Alegre**

**2016**

**AVALIAÇÃO DO USO DE AMOSTRAS DE LEUCÓCITOS  
IMPREGNADOS EM PAPEL FILTRO PARA O DIAGNÓSTICO DE  
DOENÇAS LISSÔMICAS**

**MARLI VIAPIANA CAMELIER**

**Tese apresentada como requisito parcial para  
obtenção do título de Doutor em Medicina: Ciências  
Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do  
Sul, programa de Pós-Graduação em Medicina:  
Ciências Médicas.**

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

**Coorientador: Dr. Gabriel Civallero**

**Porto Alegre**

**2016**

CIP - Catalogação na Publicação

VIAPIANA CAMELIER, MARLI  
AVALIAÇÃO DO USO DE AMOSTRAS DE LEUCÓCITOS  
IMPREGNADOS EM PAPEL FILTRO PARA O DIAGNÓSTICO DE  
DOENÇAS LISOSSÔMICAS / MARLI VIAPIANA CAMELIER. --  
2016.  
97 f.

Orientador: ROBERTO GIUGLIANI.  
Coorientador: GABRIEL CIVALLERO.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-  
Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto  
Alegre, BR-RS, 2016.

1. Doenças Lisossômicas. 2. Mucopolissacaridose  
tipo IVA. 3. Doença de Krabbe. 4. Doença de Gaucher.  
5. Doença de Pompe. I. GIUGLIANI, ROBERTO, orient.  
II. CIVALLERO, GABRIEL, coorient. III. Título.

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

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Artur Francisco Schumacher Schuh, PPGCM-UFRGS

Carolina Fischinger Moura de Souza, HCPA

Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira, PUCRS

Dr. Jonas Alex Morales Saute, HCPA

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

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, que me conduz sempre ao melhor caminho e no tempo certo, para as realizações na minha vida.

Aos meus irmãos e sobrinhos, por toda dedicação a mim e apoio nos momentos difíceis.

Ao Fernando, por estar ao meu lado e ter-me incentivado na realização deste doutorado, pelo seu carinho e dedicação.

Aos meus filhos Lucas Antônio e João Pedro, por tudo que aprendi com eles e ainda vou aprender.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto Giugliani, pela oportunidade, pelo reconhecimento, pela orientação, por ter-me proporcionado as condições necessárias à realização deste projeto e pelo incentivo na realização de mais esta conquista.

Ao meu coorientador, Dr. Gabriel Civallero, pela amizade e apoio, por ter-me acompanhado desde o início do projeto, diariamente no laboratório de EIM, auxiliando-me e orientando-me com muita sabedoria.

A todos os colegas do Serviço de Genética Médica, do HCPA, pelos bons momentos de convívio e pelo fundamental apoio e parceria em todos os momentos.

Aos meus amigos e colegas do curso de pós-graduação em Ciências médicas e da UFRGS, em especial à Divair Doneda, Shirlei Salort e Isabel Bandeira, pela amizade e apoio, tão importantes neste momento de minha vida.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelas oportunidades que recebi, por toda minha formação acadêmica e profissional, pelo mestrado e pela oportunidade em obter mais este título.

Ao programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas, pela orientação e auxílio na realização deste projeto.

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

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

Desde já, agradeço aos membros da banca por terem aceitado o convite.  
A todos, meus sinceros agradecimentos!

*“A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios. Por isso, cante, ria, dance, chore e viva intensamente cada momento de sua vida, antes que a cortina se feche e a peça termine sem aplausos”.*

Charles Chaplin



## RESUMO

**Introdução:** As Doenças lisossômicas (DLs) são condições genéticas, herdadas na sua maioria de forma autossômica recessiva, caracterizadas usualmente pela deficiência de enzimas lisossômicas específicas, envolvidas na síntese, degradação, armazenamento ou transporte de macromoléculas necessárias para o funcionamento normal do organismo. Nas situações mais típicas, o substrato não degradado acumula-se progressivamente nos lisossomos, com repercussões estruturais e funcionais, levando a sinais e sintomas característicos. Os pacientes apresentam um amplo espectro de manifestações clínicas, que podem incluir disfunção de órgãos, anormalidades esqueléticas, envolvimento neuronal, entre outras. O diagnóstico é usualmente obtido pela identificação da deficiência enzimática específica em leucócitos obtidos do sangue periférico, usualmente realizado em laboratórios de referência. O transporte da amostra pode ser um obstáculo quando o serviço requisitante está situado longe do centro de referência ou em outro país, situação em que a amostra de sangue pode chegar ao laboratório já sem condições de ser analisada. **Objetivo:** Este estudo teve como objetivo principal, tornar disponível um método mais simples, seguro e acessível que utiliza amostras de leucócitos impregnados em papel filtro (LIPF) como uma nova ferramenta para o diagnóstico bioquímico de pacientes com DLs. **Métodos:** O estudo envolveu amostras de pacientes com diagnóstico previamente confirmado de DLs (amostra de conveniência, por se tratarem de doenças raras, com incidências individuais ao redor de 1:100.000 recém-nascidos vivos). Foram incluídos no estudo os pacientes com diagnóstico já estabelecido de DLs selecionadas (MPS IVA, Doença de Krabbe, Doença de Gaucher e Doença de Pompe), independente do sexo e/ou idade, atendidos no Serviço de Genética Médica do HCPA, que concordaram em participar do estudo. O grupo de referência negativo foi constituído pelas amostras de 50 indivíduos hígidos, adultos, de ambos os sexos.

**Resultados:** Os resultados obtidos nos ensaios enzimáticos de pacientes com MPS IVA, Doença de Krabbe, Doença de Gaucher e Doença de Pompe, indicaram que as enzimas analisadas em amostras de LIPF permitiram a identificação de todos os pacientes, com sensibilidade de 100%. Os testes de estabilidade realizados nas amostras de LIPF indicaram que as amostras, quando mantidas a 4°C, se mostram estáveis por pelo menos 30 dias.

**Conclusões:** Nas condições utilizadas, amostras de LIPF se mostraram adequadas para a identificação segura de pacientes com MPS tipo IVA, Doença de Krabbe, Doença de Gaucher e Doença de Pompe. As amostras de leucócitos secos em papel filtro são mais estáveis e seguras para o transporte, indicando que possa ser esta uma importante ferramenta para facilitar a identificação de pacientes com DLDs, especialmente daqueles que vivem em áreas que tem dificuldades para a remessa de amostras líquidas para serviços de referência.

**Palavras-chave:** Doenças Lisossômicas, Mucopolissacaridose tipo IVA, Doença de Krabbe, Doença de Gaucher, Doença de Pompe, Sangue Impregnado em Papel Filtro, Enzimas Lisossômicas.

## ABSTRACT

**Background:** Lysosomal Disorders (LDs) are genetic conditions, mostly inherited in autosomal recessive fashion, usually characterized by a deficiency of specific lysosomal enzymes involved in the synthesis, degradation, storage or transportation of macromolecules necessary for normal functioning of the organism. Typically, the non-degraded substrate is progressively accumulated in lysosomes, with structural and functional repercussions, leading to characteristic signs and symptoms. Affected patients present a wide range of clinical manifestations, which may include organ dysfunction, skeletal anomalies, neuronal involvement, etc. The diagnosis is normally made through identification of the specific enzyme deficiency in white blood cells from a sample of peripheral blood, usually performed in reference laboratories. The transporting of a liquid sample can be a problem when the test orderer is located far from the reference center or in a foreign country, as often the blood sample arrives at the laboratory in poor condition and cannot be properly analyzed. **Aim:** The main aim of this study was to make available a new technique that is simpler, safer and more accessible, using leukocytes impregnated on filter paper (LIFP) as a new tool for the biochemical diagnosis of patients with LSDs. **Methods:** This study involved samples of patients with previously confirmed diagnosis of selected LSDs (a convenience sample, as these are rare diseases, with individual incidences around 1:100.000 live newborns). Patients with an established diagnosis of MPS IVA, Krabbe Disease, Gaucher's disease and Pompe disease regardless of sex and/or age, cared for at the Genetics Service of HCPA and who agreed to participate were included in the study. The negative reference group comprised blood samples from 50 healthy adults of both genders.

**Results:** The results obtained in the enzymatic assays of patients with MPS IVA, Krabbe Disease, Gaucher's disease, and Pompe disease indicated that the analyzed enzymes in LIFP samples allowed the identification of all patients, with sensitivity of 100%. The stability tests performed in LIFP samples indicated that samples, when maintained at 4°C, were stable for at least 30 days. **Conclusions:** In the conditions used, LIFP samples were shown to be adequate for a reliable identification of patients with MPS IVA, Krabbe Disease, Gaucher's disease, and Pompe disease. Blood samples on filter paper are more stable and reliable for transportation, indicating that this may be an important tool to facilitate the identification of patients with LSDs, particularly those living in areas with difficulties for the shipment of liquid samples to reference services.

**Keywords:** Lysosomal Storage Disorders, MPS IVA, Krabbe Disease, Gaucher's disease, Pompe disease, Blood Impregnated on Filter Paper, Lysosomal Enzymes

## **LISTA DE TABELAS DA TESE**

Tabela 1: Classificação das doenças lisossômicas.....	24
Tabela 2: Marco teórico do diagnóstico bioquímico (método enzimático fluorimétrico) das DLs estudadas e algumas DLs relacionadas.....	48

## **LISTA DE TABELAS DOS ARTIGOS**

Table 1: GALC activity in DLFP samples and leukocytes from KD patients and healthy controls. ....	73
Table 2: Incubation conditions for lysosomal enzyme assays in DLFP samples. ....	74
Table 3: Intra and inter- assay CVs values for GALC in DLFP samples (from normal subjects).....	75

Tab. 1: Enzyme activity in DLFP samples and leukocytes from LSDs patients, and healthy controls. ....	85
Tab. 2: Incubation conditions for lysosomal enzyme assays in DLFP samples.....	86
Tab. 3: Intra and inter-assay CVs values for lysosomal enzymes in DLFP samples (from normal subjects).....	88

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxograma da estratégia de Busca de Referências Bibliográficas. ....	21
Figura 2: Rota metabólica dos glicoesfingolípídios e distúrbios associados. ....	25

## LISTA DE FIGURAS DOS ARTIGOS

Figure 1: Activity of GALC in DLFP samples and leukocytes from KD patients and healthy controls. Activities are expressed as nanomoles/17h/mg proteins. X-axis represents the N number.....	72
Fig. 1: Enzyme activity in DLFP samples and leukocytes from Pompe patients and healthy controls. Activities are expressed as nanomol/h/mg protein. X- axis represents the N number.....	82
Fig. 2: Enzyme activity in DLFP samples and leukocytes from Gaucher patients and healthy controls. Activities are expressed as nanomol/h/mg protein. X- axis represents the N number.....	83
Fig. 3: Enzyme activity in DLFP samples and leukocytes from Morquio A patients and healthy controls. Activities are expressed as nanomol/17h/mg protein. X- axis represents the N number.....	84

## **LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

**CS** – Condroitin sulfato

**DG** - Doença de Gaucher

**DL**- Doença Lisossômica

**DPN**- Diagnóstico pré-natal

**DS**- Dermatan sulfato

**EIM**- Erros Inatos do Metabolismo

**GAGS**- Glicosaminoglicanos

**GALNS**- N-acetilgalactosamina-6-sulfatase

**GBA**-  $\beta$ -glicosidase ácida

**HS**- Heparan sulfato

**HCPA**- Hospital de Clínicas de Porto Alegre

**LEIM**-Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo

**LIPF**- Leucócitos impregnados em papel filtro

**MPS**- Mucopolissacaridoses

**MPS IVA**- Mucopolissacaridose tipo IVA

**OLS**- Oligossacarídeos

**QS**- Queratan sulfato

**RN**- Recém-nascido

**SIPF**- Sangue impregnado em papel filtro

**SNC**- Sistema nervoso central

**SNP**- Sistema nervoso periférico

**SOLS**- Sialiloligossacarídeos

**TCLE**-Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**TRE**- Terapia de reposição enzimática

**TRS**- Terapia de redução do substrato

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	17
1.1.	ERROS INATOS DO METABOLISMO .....	17
1.2.	DOENÇAS LISSÔMICAS (DLs).....	18
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1.	ESTRATÉGIA DE BUSCA DA INFORMAÇÃO .....	20
2.2.	DOENÇAS LISSÔMICAS (DLs).....	22
2.2.1	Diagnóstico das DLs.....	26
2.2.1.1	Detecção de Portadores .....	26
2.2.1.2	Diagnóstico Pré – Natal (DPN).....	27
2.2.2	Tratamento das DLs .....	28
2.3.	MUCOPOLISSACARIDOSES (MPS).....	28
2.3.1	Etiologia.....	29
2.3.2	Aspectos Clínicos .....	30
2.3.3	Diagnóstico.....	30
2.3.4	Tratamento .....	30
2.3.5	Mucopolissacaridose Tipo IVA (MPS IVA).....	31
2.3.5.1	Etiologia .....	32
2.3.5.2	Aspectos Clínicos.....	32
2.3.5.3	Incidência.....	33
2.3.5.4	Diagnóstico .....	33
2.3.5.5	Tratamento.....	34
2.4.	ESFINGOLIPIDOSES .....	34
2.4.1	Doença de Krabbe.....	35
2.4.1.1	Etiologia .....	35
2.4.1.2	Aspectos Clínicos.....	35

2.4.1.3	Incidência.....	36
2.4.1.4	Diagnóstico .....	36
2.4.1.5	Tratamento.....	37
2.4.2	Doença de Gaucher.....	38
2.4.2.1	Etiologia .....	38
2.4.2.2	Classificação .....	39
2.4.2.3	Aspectos Clínicos.....	39
2.4.2.4	Incidência.....	41
2.4.2.5	Diagnóstico .....	41
2.4.2.6	Tratamento.....	42
2.4.2.6.1	Terapia de Redução de Substrato (TRS).....	42
2.5.	GLICOGENOSES .....	43
2.5.1	Doença de Pompe .....	43
2.5.1.1	Etiologia .....	44
2.5.1.2	Classificação .....	44
2.5.1.3	Aspectos Clínicos.....	44
2.5.1.4	Incidência.....	45
2.5.1.5	Diagnóstico .....	46
2.5.1.6	Tratamento.....	47
3	MARCO TEÓRICO .....	48
4	JUSTIFICATIVA .....	49
5	OBJETIVOS .....	50
5.1.	OBJETIVO PRIMÁRIO.....	50
5.2.	OBJETIVOS SECUNDÁRIOS.....	50
6	REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA.....	51
7	ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS 1 .....	64
8	ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS 2.....	76

9	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	89
10	ANEXOS.....	90
	ANEXO 1: Carta de aprovação do projeto de pesquisa.....	90
	ANEXO 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Pacientes (TCLE) .....	91
	ANEXO 3: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Controles (TCLE).....	95



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1. ERROS INATOS DO METABOLISMO

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

O termo EIM foi proposto por Archibald Garrod (1), através de seus estudos sobre a alcaptonúria, pentosúria, albinismo e cistinúria. Ele observou que os indivíduos afetados apresentavam concentração anormal de metabólitos intermediários, sugerindo a presença de um defeito em algum ponto do metabolismo dessas moléculas. Tais distúrbios foram atribuídos à atividade deficiente ou ausente de uma enzima responsável por um passo específico de uma rota metabólica, cujo bloqueio levava ao acúmulo do substrato e/ou falta do produto (2).

Os EIM correspondem à cerca de 10% de todas as doenças genéticas, podendo envolver defeitos na síntese, degradação, armazenamento ou transporte de moléculas biologicamente ativas (3). Os EIM, ainda que individualmente raros, são freqüentes em seu conjunto, com uma incidência global estimada em 1:1.000 recém-nascidos vivos (RNs). Em grupos de alto risco, como RNs agudamente enfermos, esse número pode ser 10 a 20 vezes maior (4,5).

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

1) EIM envolvendo distúrbios do transporte. Exemplo: Deficiência de dissacaridases.

2) EIM envolvendo distúrbios de armazenamento e degradação. Exemplo: Doenças lisossômicas de depósito.

3) EIM envolvendo distúrbio de síntese. Exemplo: Hiperplasia adrenal congênita.

4) EIM envolvendo distúrbios do metabolismo intermediário. Exemplo: Hiperfenilalaninemia e tirosinemia (6).

Embora a confirmação diagnóstica seja usualmente obtida pela demonstração da baixa atividade de uma enzima específica, várias razões podem motivar a deficiência enzimática, como por exemplo:

a) A enzima codificada por um gene mutante pode não ser produzida ou ser produzida com atividade catalítica reduzida;

b) Pode resultar de uma mutação envolvendo o gene que regula a síntese da enzima;

c) A enzima pode ser degradada a uma velocidade exagerada, levando à redução da quantidade de enzima ativa disponível;

d) A mutação pode afetar a síntese de cofator necessário para a atividade enzimática (7).

## **1.2. DOENÇAS LISSÔMICAS (DLs)**

As DLs são um grupo de EIM causadas pela deficiência de enzimas lisossômicas específicas, envolvidas na degradação, armazenamento e transporte de macromoléculas biológicas, levando ao acúmulo progressivo de seus substratos no interior dos lisossomos (usualmente polímeros complexos), podendo ter ação tóxica sobre os componentes celulares. O acúmulo de substratos no lisossomo provoca mudanças bioquímicas e sintomas característicos (8).

O aparelho lisossômico funciona como um sistema digestivo intracelular, onde as enzimas hidrolíticas, com pH ácido, são responsáveis, entre outras funções, pela degradação de macromoléculas. O catabolismo ocorre geralmente em cascata: Cada passo é catalisado por uma enzima específica, em que o produto de uma reação forma o substrato da próxima (9).

O diagnóstico bioquímico das DLs é geralmente obtido através da medida da atividade enzimática específica, onde se constata a deficiência da enzima. Embora esse diagnóstico seja obtido, usualmente, com amostras de leucócitos ou fibroblastos

cultivados, esse tipo de amostra tem sido um desafio quando necessita viajar a longas distâncias até chegar aos laboratórios de referência e muitas vezes, as amostras chegam sem condições de serem analisadas. Nos últimos anos, muitos esforços têm sido realizados para minimizar o problema de transporte de amostras líquidas e o uso de amostras secas em papel filtro tem sido frequente, especialmente amostras de sangue impregnado em papel filtro (SIPF).

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1. ESTRATÉGIA DE BUSCA DA INFORMAÇÃO**

Esta revisão está focada nos aspectos relacionados às DLs, envolvendo aspectos clínicos e diagnóstico. As seguintes DLs foram estudadas: Doença de Morquio A (Mucopolissacaridose tipo IVA), Doença de Krabbe, Doença de Gaucher e Doença de Pompe. A estratégia de busca envolveu a base de dados do PubMed e SciELO. A busca da informação foi realizada através dos termos: Lysosomal storage disease; diagnoses of DLs; Enzyme assay; Dried-leukocytes; Morquio A disease; Krabbe disease; Gaucher disease; Pompe disease.

Foram revisados 173 abstracts, dos quais 133 artigos foram selecionados. Na primeira busca, os artigos mais recentes foram estudados e a partir destes, os artigos mais antigos foram selecionados das referências dos primeiros, por serem considerados relevantes. Com o objetivo de facilitar a revisão da literatura, os artigos foram selecionados por doenças e o resultado da busca de referências bibliográficas está sumarizado na figura 1.

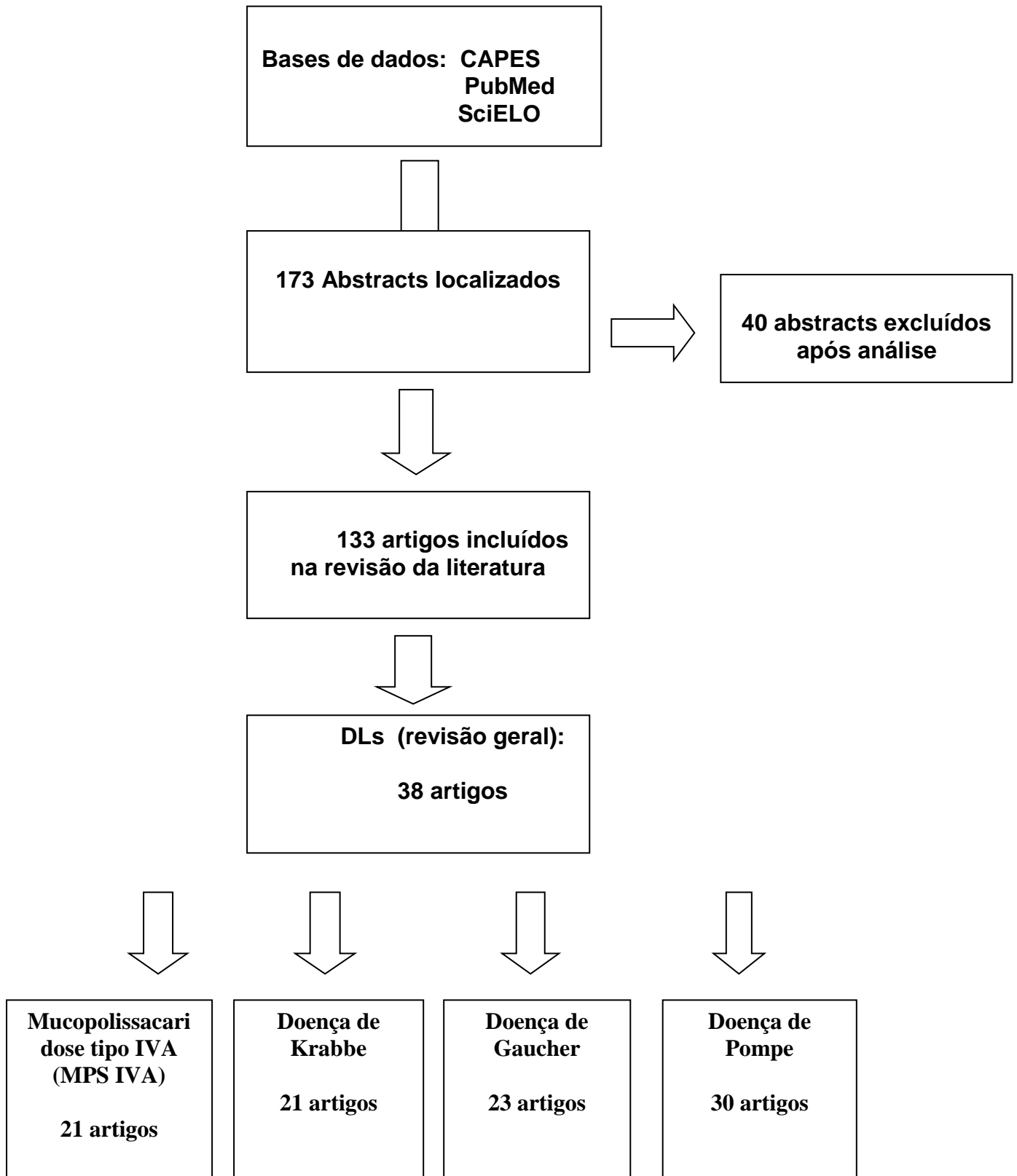


Figura 1: Fluxograma da estratégia de Busca de Referências Bibliográficas.

## 2.2. DOENÇAS LISSÔMICAS (DLs)

As DLs são doenças progressivas, graves e predominantemente incuráveis, com um amplo espectro de manifestações clínicas, que podem incluir anormalidades esqueléticas, disfunção de órgãos, envolvimento neurológico, acúmulo de substâncias nos tecidos, tais como glicosaminoglicanos (GAGs), entre outras manifestações (10). O risco de repetição das DLs é de 25% a cada gestação de casais heterozigotos para a doença. Até recentemente, estas doenças geralmente não tinham tratamento, na maioria delas, o diagnóstico permitia apenas medidas preventivas, tais como o aconselhamento genético, a detecção de heterozigotos e o diagnóstico pré-natal (DPN). Entretanto, o surgimento da terapia de reposição enzimática (TRE), como tratamento, melhorou significativamente o prognóstico dos pacientes com algumas destas condições (11).

A maioria das doenças lisossômicas é causada pela presença de mutações patogênicas que ocorrem nos genes que codificam as enzimas. Apesar de cada uma das DLs resultar de mutações em um gene diferente, e como consequência, em uma enzima específica, as DLs compartilham características em comum, como o acúmulo de substratos não degradados no interior dos lisossomos, causando disfunção celular e orgânica (12).

Os lisossomos, descritos por De Duve e Wattiaux em 1963, são organelas citoplasmáticas delimitadas por membranas próprias que não contém DNA ou ribossomos e se encontram presentes em todas as células eucarióticas (13,14).

As DLs, quando suspeitadas pelo médico, necessitam ser avaliadas por protocolos especiais. O protocolo de investigação das DLs inclui a cromatografia de GAGs urinários (para mucopolissacaridoses), as cromatografias de oligossacarídeos (OLS) e sialiloligossacarídeos (SOLS) (15). Testes qualitativos, como a cromatografia em camada delgada e a eletroforese uni ou bidirecional, são especialmente úteis para identificar os tipos de GAGs aumentados e direcionar a investigação bioquímica para os ensaios enzimáticos específicos. É através do ensaio enzimático específico que se chega ao diagnóstico definitivo (16).

Existem mais de 50 enzimas lisossômicas incluindo proteases, nucleases, lipases e fosfolipases. São todas hidrolases ácidas que tem uma atividade ótima em pH que varia de 4 a 5, na luz lisossomal (17,18). O grupo das DLs inclui aproximadamente 50

doenças, na maioria autossômicas recessivas, que têm uma incidência que varia de 1:10.000 a 1:100.000 recém-nascidos vivos (RN vivos) (19,20).

Em um estudo realizado no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (LEIM/HCPA), centro de referência para diagnóstico de EIM no Brasil, as DLs corresponderam a 60% dos EIM diagnosticados (21).

As DLs podem ser classificadas, conforme o substrato acumulado, em mucopolissacaridoses (MPS), esfingolipidoses, glicoproteinoses e outras DL (Tabela 1).

Muitas DLs apresentam alterações na via metabólica dos esfingolipídios, como a Doença de Krabbe e a Doença de Gaucher (Fig 2).

Tabela 1: Classificação das doenças lisossômicas

Tipo	Doenças (exemplos)
Mucopolissacaridoses (MPS)	MPS I (Síndrome de Hurler, Hurler – Scheie e Scheie) MPS II (Síndrome de Hunter) MPS III A, B, C ou D (Síndrome de Sanfilippo A, B, C ou D) MPS IV A ou B (Síndrome de Morquio A ou B) MPS VI (Síndrome de Maroteaux – Lamy) MPS VII (Síndrome de Sly)
Esfingolipidoses	Gangliosidose GM1 Doença de Tay - Sachs doença de Sandhoff Doença de Fabry Doença de Gaucher Doença de Farber Doença de Niemann-Pick A e B Doença de Krabbe Leucodistrofia Metacromática Deficiência Múltipla de Sufatases
Mucolipidoses	Mucolipidoses II e III
Glicoproteinoses	Fucosidose Manosidoses (alfa ou beta) Sialidose Aspartilglicosaminúria
Distúrbios do transporte da membrana	Doença de depósito do Ácido Siálico Doença de Salla Cistinose
Outras	Doença de Pompe Doença de Niemann-Pick C

Fonte: Saudubray & col (22).

Destacamos neste estudo, quatro doenças, uma mucopolissacaridose, a Síndrome de Morquio A (MPS IVA); duas esfingolipidoses, a Doença de Krabbe e a Doença de Gaucher e uma Glicogenose, a Doença de Pompe.



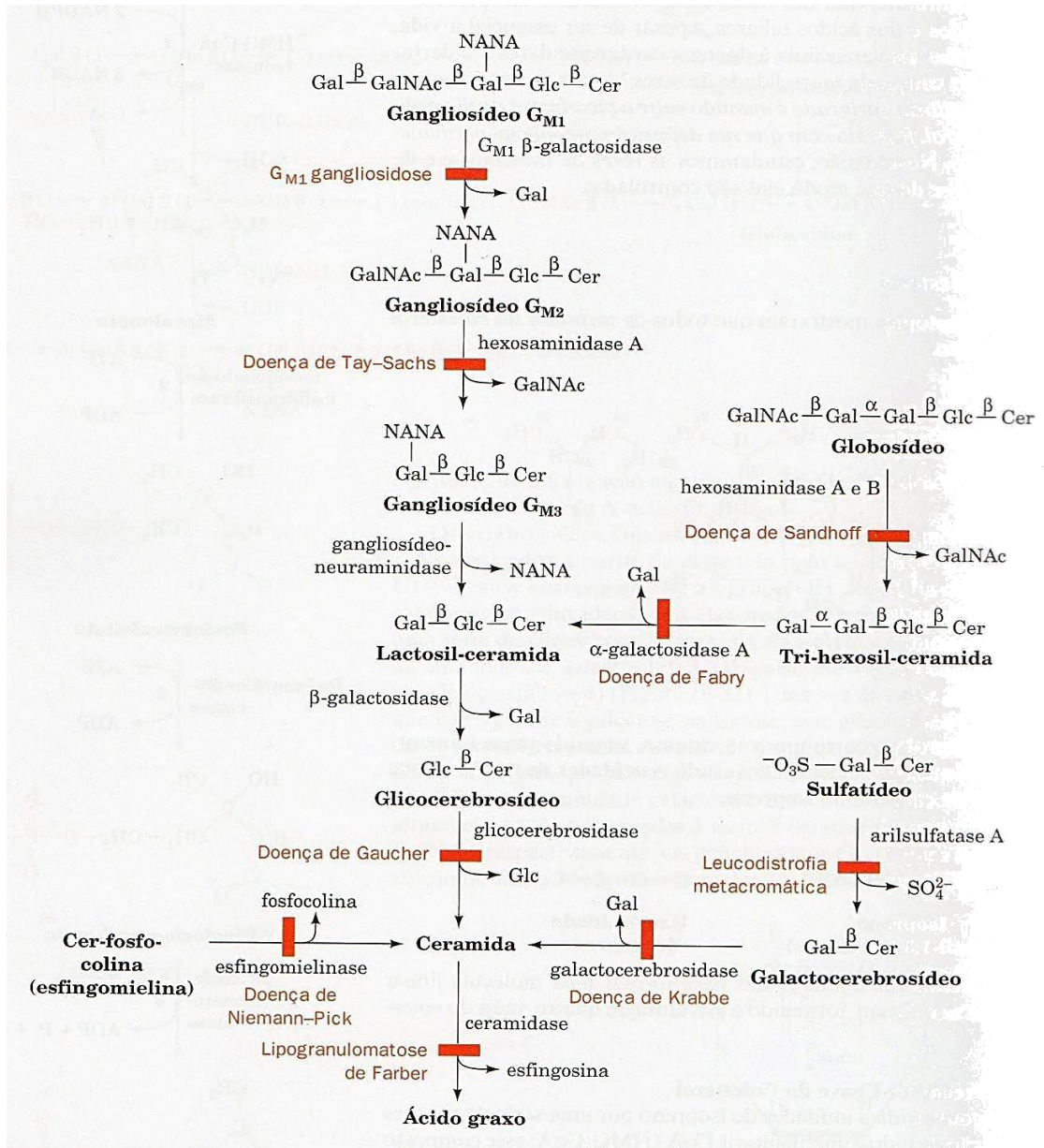


Figura 2: Rota metabólica dos glicoesfingolípídios e distúrbios associados. Voet et al., (23)

## 2.2.1 Diagnóstico das DLs

O diagnóstico das DLs é geralmente obtido através da medida da atividade enzimática específica, onde se constata a deficiência da enzima, através de ensaio fluorimétrico, utilizando amostras de leucócitos e / ou fibroblastos.

Atualmente, o ensaio enzimático fluorimétrico para detectar as DLs pode ser realizado em amostras de sangue impregnado em papel filtro (SIPF) para quase todas as doenças lisossômicas, com o objetivo de obter um diagnóstico mais precoce e de fácil acesso, através do envio de amostras secas, que são mais estáveis que as correspondentes amostras líquidas, possibilitando, assim, um tratamento mais precoce e com melhores resultados. Entretanto, nem todos ensaios enzimáticos são completamente satisfatórios em relação as atividades de muitas enzimas lisossômicas em SIPF que são extremamente baixas e longos períodos de incubação são necessários. Em casos particulares, o resultado de diagnóstico pode ser um desafio devido a pouca diferença da atividade enzimática entre os controles e os pacientes (24–27). Um estudo realizado por Oemardien et al. (28) demonstrou que a presença de hemoglobina nas amostras de SIPF interfere de maneira significativa, diminuindo as leituras de fluorescência, com substratos derivados de 4 – metilumbeliferil, diminuindo, assim, as atividades enzimáticas e a separação dos grupos controles dos pacientes.

### 2.2.1.1 Detecção de Portadores

A maioria dos EIM são herdados de forma autossômica recessiva (29), embora algumas doenças sejam transmitidas de forma recessiva ligada ao X (por ex., doença de Hunter). A identificação de portadores pode ser importante para permitir um aconselhamento genético eficaz em famílias que apresentam um caso de EIM.

A detecção de portadores pode ser realizada através de ensaio enzimático específico ou análise molecular:

**1) Ensaio enzimático:** O diagnóstico enzimático é feito pela detecção da atividade enzimática, geralmente intermediária entre aquela de indivíduos normais e afetados. O ensaio

enzimático pode ser realizado em diferentes amostras (plasma, leucócitos ou fibroblastos cultivados) e sua sensibilidade e especificidade variam de acordo com a doença, população estudada, a amostra analisada e o substrato utilizado.

**2) Análise molecular:** O teste molecular analisa as mutações e confirma o diagnóstico, trazendo informações adicionais, já que algumas das mutações estão relacionadas à gravidade da doença. O estudo envolve a pesquisa da mutação gênica específica, quando esta é conhecida na família. O gene para a N-acetilgalactosamina-6-sulfatase, deficiente na doença de Morquio tipo A, por exemplo, tem sido clonado e seqüenciado a partir da placenta humana e localizado no locus 16q24.3 (30,31).

### 2.2.1.2 Diagnóstico Pré – Natal (DPN)

No grupo dos EIM, no qual a maioria das doenças são autossômicas recessivas, a possibilidade de ter um novo filho afetado com a mesma doença é quase sempre de 25% em cada gestação. No momento em que é feito o diagnóstico de uma criança com EIM, é recomendado realizar o aconselhamento genético com a finalidade de informar à família sobre os riscos de recorrência, o prognóstico, a gravidade da doença em estudo e a possibilidade de realização do DPN (29).

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

O DPN é possível para a grande maioria das DLs. Pode-se realizar o DPN em diferentes tipos de amostras, tais como:

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

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

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

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

### **2.2.2 Tratamento das DLs**

Até o momento não existe a cura para as DLs e o tratamento dos sintomas deve ser considerado em um primeiro momento. Existem diversas recomendações para o tratamento dos sintomas, que devem ser monitorados caso a caso.

Até recentemente, havia poucas intervenções terapêuticas disponíveis para alterar o curso natural das DLs, mas, com a recente disponibilidade de preparações comerciais de enzimas recombinantes, pacientes com doenças lisossômicas seletivas são agora beneficiados através da intervenção terapêutica (11,32,33).

As primeiras experiências e ensaios clínicos se deram para a Doença de Gaucher, doença lisossômica causada pela deficiência da enzima  $\beta$ - glicosidase (glicocerebrosidase), com a disponibilidade da terapia de reposição enzimática (TRE) desde 1991.

A TRE é o tratamento específico, disponível atualmente para a grande maioria das DLs, tais como Doença de Gaucher, Doença de Pompe, Fabry, mucopolissacaridoses (MPS) tipo I, II, IVA e VI. Em todos os casos, a identificação precoce dos pacientes é extremamente importante para o sucesso do tratamento. Com esse propósito, um programa de triagem neonatal para DLs usando amostras de SIPF e diferentes metodologias analíticas foi proposto (20,34–36).

### **2.3. MUCOPOLISSACARIDOSES (MPS)**

As MPS são EIM que fazem parte do grupo das DLs, causadas pela deficiência de enzimas envolvidas na degradação dos glicosaminoglicanos (GAGs), componentes da membrana celular e da matriz extracelular. Essas macromoléculas

(GAGs), acumulam-se progressivamente no interior dos lisossomos, consequência por sua vez da inativação, ausência ou baixa atividade de uma das enzimas lisossomais (10).

As MPS são um grupo das doenças lisossômicas de depósito (DLDs), nas quais há acúmulo anormal de GAGs dentro dos lisossomos e excreção aumentada desses compostos na urina. As MPS são doenças progressivas e apresentam um amplo espectro de manifestações clínicas, tanto motoras como sensoriais. Compartilham muitos achados em comum, o que permite uma suspeita diagnóstica inicial, como por exemplo, o curso crônico e progressivo e o comprometimento multissistêmico, principalmente esquelético, cardiopulmonar, da pele, córnea, fígado, baço, cérebro e meninges (37).

De uma maneira geral, a degradação dos GAGs (mucopolissacarídeos) nos lisossomos é iniciada por endoglicosidases, como a hialuronidase, que rompe as cadeias longas de polissacarídeos em unidades menores. Após esta degradação limitada, os fragmentos são novamente degradados por hidrólises seqüenciais das terminações ainda não reduzidas (38). Esta segunda etapa é realizada por hidrolases lisossomais, específicas para cada tipo de união.

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

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

A incidência conjunta das MPS é estimada em 1:10.000 a 1:25.000 nascidos vivos (38–40). As MPS tipo I e III são consideradas as mais freqüentes, enquanto a MPS VII parece ser o tipo mais raro (19,41).

### **2.3.1 Etiologia**

Todas as MPS são herdadas de modo autossômico recessivo, com exceção da MPS II, que tem herança ligada ao cromossomo X, recessiva (37).

### **2.3.2 Aspectos Clínicos**

As MPS são doenças crônicas e progressivas e apresentam um amplo espectro de manifestações clínicas, com envolvimento multissistêmico, principalmente motor e sensorial. As MPS apresentam muitos achados em comum, como o envolvimento esquelético, cardiopulmonar, da córnea, fígado, baço, cérebro e meninges, o que permite uma suspeita diagnóstica inicial. As manifestações clínicas são, em geral, variáveis, existindo formas atenuadas e formas graves.

### **2.3.3 Diagnóstico**

O diagnóstico das MPS pode ser iniciado pela suspeita clínica e pelos achados nos testes de triagem na urina. A determinação de GAGs urinários direciona o diagnóstico bioquímico, através do ensaio enzimático específico, onde se constata a deficiência enzimática, que é o diagnóstico definitivo (15).

A quantificação dos GAGs tem sido utilizada também como biomarcador da resposta ao tratamento das MPS.

O diagnóstico das MPS pode ser complementado pela análise molecular, que vai permitir a identificação da mutação responsável pela doença em questão. Este tipo de análise é importante não apenas para complementar a análise bioquímica, mas também para caracterizar o defeito gênico específico.

A detecção de pacientes com MPS também pode ser realizada através do ensaio enzimático em amostras de SIPF, como um teste de triagem.

### **2.3.4 Tratamento**

O tratamento das MPS, num primeiro momento, visa tratar os sintomas, melhorando a qualidade de vida dos pacientes. Existem diversas recomendações para o tratamento dos sintomas das MPS, que possuem uma variabilidade enorme no que se refere à gravidade, início dos sintomas e progressão da doença. O tratamento dos sintomas deve ser monitorado caso a caso e envolve principalmente medidas que

corrijam ou minimizem o envolvimento esquelético, neurológico, respiratório e cardíaco dessas doenças, necessitando uma equipe multidisciplinar (38).

Atualmente, o tratamento através da TRE está disponível para as MPS do tipo I, II, IVA e VI. Para as MPS tipo III, a TRE está em desenvolvimento clínico (11).

### **2.3.5 Mucopolissacaridose Tipo IVA (MPS IVA)**

A MPS IVA ou síndrome de Morquio A é uma DL de caráter autossômico recessivo, causada pela deficiência da enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatase (GALNS), envolvida na degradação do glicosaminoglicano (GAG) queratan sulfato (QS).

Este GAG é um componente da N-acetilglicosamina ou acetilgalactosamina e galactose, formando um componente essencial da cartilagem e da córnea. A deficiência da enzima prejudica a degradação de QS e condroitin-sulfato (CS), levando a um depósito celular de QS, que ocorre em vários órgãos, principalmente medula óssea, músculo cardíaco e órgãos viscerais, com uma manifestação primária da MPS no sistema esquelético (disostose múltipla) e opacidade de córnea, sem comprometimento cognitivo (38,42).

Pelo menos duas enzimas contribuem para a degradação do QS, a GALNS e a  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -Gal), que quebram o sulfato restante de alguns GAGS, como o QS e o CS. A deficiência genética de uma dessas enzimas causa as MPS tipo IVA e IVB, respectivamente (43).

A MPS IVA foi descrita pela primeira vez em 1929, pelo pediatra uruguaio Luis Morquio, que descreveu uma família com quatro crianças afetadas. Essas crianças eram irmãos, filhos de primos em primeiro grau. No mesmo ano, Brailsford descreveu uma paciente similar, na Inglaterra (38).

Em 1974, o defeito metabólico foi descrito e a deficiência da enzima GALNS foi identificada. Esta enzima também catalisa a remoção do sulfato de resíduos de N-acetilgalactosamina-6-sulfato que estão presentes no CS, levando a excreção em excesso de CS (44).

### 2.3.5.1 Etiologia

A MPS IVA é herdada de modo autossômico recessivo, como a maioria das MPS, com exceção da MPS tipo II, que é herdada de forma recessiva ligada ao cromossomo X (38).

O gene para a GALNS, enzima deficiente na doença de Morquio A (MPS tipo IVA), foi clonado e sequenciado a partir da placenta humana e localizado no locus 16q24.3 (30,31).

### 2.3.5.2 Aspectos Clínicos

A Síndrome de Morquio A apresenta uma grande heterogeneidade clínica, com diversos sintomas, em vários órgãos e pode variar entre pacientes. As manifestações clínicas mais frequentemente observadas incluem: baixa estatura, hipoplasia de odontóide, coxa valga e excreção urinária excessiva de QS e CS (45,46), protusão external, deformidades das mãos (mãos em garra), dos ossos, deficiência no esmalte dentário, pectus carinatum, genu valgum, displasia de quadril, instabilidade devido à deformidades ósseas, perda auditiva, opacidade de córnea e hepatoesplenomegalia (43,47).

As principais manifestações clínicas desta doença são atribuídas à restrição tecidual na distribuição do QS (córnea e cartilagem), em contraste para uma ampla distribuição de dermatan sulfato (DS), e heparan sulfato (HS). Como estes dois GAGS, o QS é degradado sequencialmente, da não redução e pela ação de glicosidases e sulfatases (48).

Apesar da baixa estatura e da displasia esquelética progressiva ser usualmente mais pronunciada na MPS IVA, não é possível distinguir pelas características clínicas a MPS IVA da IVB, sendo necessária a determinação das atividades enzimáticas específicas. A inteligência é normal em ambos os tipos de MPS IV (38).

Ao nascimento, a maioria dos pacientes não apresenta sintomas perceptíveis, os primeiros sintomas tornam-se evidentes ao final do primeiro ou segundo ano de vida, quando os pacientes desenvolvem dificuldades de deambular, retardo do crescimento e as deformidades esqueléticas tornam-se evidentes. As deformidades são progressivas e tornam-se exageradas com a idade. Sintomas de compressão de



raiz nervosa ocorrem devido à compressão da medula cervical (43). Nem todos os pacientes com MPS IVA são gravemente afetados. Em casos particulares, esta doença existe em uma variante mais branda, com pacientes com altura quase normal, que são diagnosticados em um estágio mais tardio, onde os primeiros sintomas aparecem somente entre 6 e 10 anos; os pacientes queixam-se de dor quando caminham e seu andar torna-se difícil. No sistema esquelético, as articulações do quadril e da coluna são as mais afetadas (43).

### **2.3.5.3 Incidência**

A incidência aproximada da MPS IVA no Brasil é de 1:216.000 nascidos vivos, enquanto que na Austrália é de 1: 640.000 e 1: 76.000 na Irlanda do Norte (39).

### **2.3.5.4 Diagnóstico**

O diagnóstico da MPS IVA se inicia pela suspeita clínica e laboratorialmente, através dos testes de triagem em amostra de urina, através da análise quantitativa (dosagem de GAGs) e qualitativa (eletroforese de GAGs), pois os pacientes com MPS acumulam GAGS que são excretados em excesso na urina. As análises de GAGS na urina, juntamente com os achados clínicos são extremamente importantes no início da investigação. A presença de QS na eletroforese ou o aumento na concentração de GAGs na dosagem destes, direciona a investigação laboratorial para a MPS tipo IV (49,50). Nos casos em que um padrão de QS é detectado, os ensaios enzimáticos da GALNS (enzima deficiente nos pacientes com MPS tipo IVA) e  $\beta$ -galactosidase (enzima deficiente nos pacientes com MPS tipo IVB) são realizados simultaneamente, para diferenciar os tipos de MPS IV. Caso seja confirmado o diagnóstico da MPS IVA, é necessário a análise enzimática de outra sulfatase para descartar o diagnóstico da deficiência múltipla de sulfatases.

O diagnóstico definitivo da MPS IVA se estabelece através da medida da atividade da enzima GALNS, em leucócitos ou fibroblastos, onde se constata a sua deficiência.

Atualmente, o diagnóstico da MPS IVA pode ser realizado também através da

medida da atividade enzimática em amostras de sangue impregnado em papel filtro (SIPF) (51), sendo esse um método de triagem.

O diagnóstico precoce é importante para definir estratégias terapêuticas a seguir, especialmente no momento em que o tratamento através da TRE para a MPS IVA encontra-se disponível (52).

A Síndrome de Morquio A é uma doença que causa alterações clínicas graves, sendo importante o diagnóstico precoce e a intervenção terapêutica necessária, com o objetivo de minimizar essas alterações, principalmente a função locomotora.

### **2.3.5.5 Tratamento**

Até recentemente o único tratamento disponível para a MPS IVA era essencialmente paliativo e sintomático, com cuidados de suporte, incluindo medicações, fisioterapia, cirurgias e reabilitação. A experiência com o transplante de medula óssea que mostrou ser eficaz para MPS tipo I (Síndrome de Hurler) é muito limitada e não é recomendada para pacientes com MPS IV A (53,54).

A TRE foi aprovada para a MPS IVA, nos EUA, pela FDA, em fevereiro de 2014, com enzima recombinante humana GALNS (rhGALNS, elosulfase alfa, BMN 110, Vimizin®), como um novo tratamento para tratar as manifestações clínicas da MPS IVA. A TRE é o tratamento específico, hoje disponível, através do qual se repõe a enzima deficiente respectiva, com infusões regulares da enzima. Estudos iniciais demonstraram que a droga é segura, melhorando os testes de caminhada de 6 minutos e levando a normalização dos níveis de QS urinário (55).

## **2.4. ESFINGOLIPIDOSES**

As esfingolipidoses são distúrbios do metabolismo de esfingolipídios, de origem genética, autossômicos recessivos, que degeneram progressivamente o SNC. São caracterizadas por defeitos no catabolismo dos lipídios. Os esfingolipídios são componentes de várias membranas celulares e estão presentes em quase todos os tecidos, principalmente no tecido nervoso. As esfingolipidoses ocorrem, portanto, como distúrbios primários do sistema nervoso central (SNC) e/ou periférico (SNP)

(56). Estudamos, neste projeto, duas esfingolipidoses: A Doença de Krabbe e a Doença de Gaucher.

### **2.4.1 Doença de Krabbe**

A Doença de Krabbe é uma das primeiras leucodistrofias genéticas clássicas, descrita por Krabbe em 1916 (57).

A doença de Krabbe ou Leucodistrofia de células globóides (GLD) é uma doença de armazenamento lisossômico, de carácter autossômico recessivo, causada pela deficiência da atividade da enzima lisossomal  $\beta$ -galactocerebrosidase ou galactocerebrosidase (GALC). Esta enzima faz parte do metabolismo da mielina, clivando a molécula de galactosilceramida em galactose e ceramida. A deficiência desta enzima resulta no acúmulo de galactosilceramida e o derivado tóxico psicossina, que é tóxica para os oligodendrócitos, ocasionando desmielinização do sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP) (58,59). Esta enzima é especialmente importante durante o período perinatal, até dezoito meses de vida, quando a mielinização é mais intensa (58,60).

#### **2.4.1.1 Etiologia**

A doença de Krabbe é herdada de modo autossômico recessivo, como a maioria das DLs. A doença ocorre geralmente na infância e leva a um curso rapidamente fatal, mas formas raras de início tardio também têm sido reportadas (61).

A deficiência da enzima galactocerebrosidase se deve a uma mutação que ocorre no gene que codifica a enzima e foi mapeado no cromossomo 14q31 (62).

#### **2.4.1.2 Aspectos Clínicos**

As manifestações clínicas são exclusivamente neurológicas, com proeminentes sinais na substância branca. Ocorre um rápido e quase completo desaparecimento da mielina e células formadoras de mielina, com infiltração de macrófagos multinucleados, chamados “células globóides” (61).

São descritas formas clínicas distintas de acordo com o início dos sintomas, sendo que 80 % dos casos começam antes dos seis meses de vida, período importante na mielinização do sistema nervoso. A forma infantil precoce é a mais freqüente e usualmente começa entre três e seis meses de vida. A criança desenvolve-se normalmente até o início dos sintomas, quando começa a apresentar choro frequente, sem causa aparente, perda de interesse pelo meio e irritabilidade excessiva, que piora aos estímulos táteis, respondendo com sobressalto ou espasmos tônicos aos mesmos. Episódios de febre de origem desconhecida, vômitos e dificuldades alimentares também podem acompanhar o quadro. A atrofia óptica geralmente está presente, com resposta pupilar pobre a estímulos luminosos e nistagmo pendular, mostrando falência visual. Surdez e convulsões também têm sido observadas (63–66).

Na forma clássica infantil, as crianças apresentam sintomas nos primeiros 6 meses de vida, quando ocorre uma severa e rápida deterioração mental e motora e os pacientes raramente sobrevivem por mais de 2 ou 3 anos. O fenótipo clínico da forma de início tardio é muito variável e o diagnóstico requer cuidado. A maioria dos pacientes desenvolve sinais e sintomas clínicos por volta dos 10 anos de idade, mas alguns podem desenvolver sinais neurológicos após os 40 anos (61).

#### **2.4.1.3 Incidência**

A incidência da Doença de Krabbe varia de 0,4 a 1,9 em 100.000 nascidos vivos, na população geral (67).

#### **2.4.1.4 Diagnóstico**

Diante de um quadro clínico sugestivo da doença de Krabbe, a investigação inicial deve incluir o exame do líquido cefaloraquidiano e tomografia de crânio.

A tomografia de crânio, geralmente, mostra redução da substância branca e aumento da densidade em tálamos, substância branca periventricular e cápsula interna. A ressonância nuclear magnética de crânio mostra lesões de atrofia, principalmente em áreas onde a mielinização é mais precoce. Lesões simétricas na substância branca com envolvimento do corpo caloso e atrofia cerebral progressiva também são descritas (68). Os níveis de proteína no líquido cerebrospinal são muito elevados, na forma de início precoce (61).

O diagnóstico definitivo da Doença de Krabbe é geralmente obtido através da determinação da atividade da GALC em leucócitos ou fibroblastos, onde se detecta a deficiência enzimática específica (69,70).

Atualmente, o objetivo do diagnóstico é a orientação familiar e o aumento da casuística mundial, para levar a um conhecimento mais profundo desta doença, sendo a confirmação diagnóstica necessária para que se possa fazer uma adequada orientação genética aos pais, pois é uma doença de caráter autossômico recessivo, e a cada gestação há 25% de chance de recorrência da doença.

#### **2.4.1.5 Tratamento**

Não há, ainda, tratamento específico para a Doença de Krabbe, entretanto, há tentativas experimentais, em animais, de correção da deficiência enzimática com transplante gênico. O transplante de células hematopoiéticas é um método de tratamento para essa doença e é indicado nos casos de início tardio (71). A TRE não atravessa a barreira hematoencefálica, não previne com isso as manifestações neurológicas da doença.

Devido à rápida progressão da doença, envolvendo o SNC, somente cuidados de suporte são disponíveis para pacientes com a forma infantil clássica. Para os pacientes com a forma de início tardio, com progressão lenta, uma melhora clínica pode ocorrer através do transplante de medula óssea (72). Outras tentativas de

tratamento, incluem transplante celular (73), tratamento transgênico (74), terapia gênica (75,76) e redução de substrato (77,78).

## **2.4.2 Doença de Gaucher**

A doença de Gaucher (DG) foi descrita pela primeira vez pelo médico francês Philippe Charles Ernest Gaucher, em 1882, em uma paciente de 32 anos, tendo observado hepatoesplenomegalia. Ao exame microscópico de tecido de baço observou infiltração de células, hoje conhecidas como células de Gaucher.

A DG é uma doença lisossômica, autossômica recessiva, sendo a mais comum das doenças lisossômicas. Caracterizada pelo acúmulo de glicocerebrosídeo, causada pela deficiência da enzima lisossomal  $\beta$ -glicosidase ácida (glicocerebrosidase) GBA. A deficiência da enzima leva ao acúmulo de glicocerebrosídeo (glicosilceramida) não degradado, nos lisossomos das células, no sistema monócito / macrófago (79).

As propriedades cinéticas da GBA derivam do fato que diferentes mutações na estrutura do gene que codifica a enzima resultam em subtipos e variantes da doença de Gaucher (80).

A falta ou a baixa atividade da enzima glicocerebrosidase, que atua no metabolismo dos esfingolípídios, conduz a um progressivo acúmulo de seu substrato, o qual causa as manifestações clínicas da doença (81).

A atividade deficiente da GBA leva ao acúmulo do glicocerebrosídeo, um esfingolípídeo derivado do catabolismo de hemácias e leucócitos. O sítio de acúmulo são as células do sistema retículo endotelial, principalmente os macrófagos (81).

A concentração de glicocerebrosídeo no baço pode ser aumentada de 10 a 1000 vezes, mas níveis elevados são também detectados no fígado e medula óssea. Em contraste, a concentração de glicocerebrosídeo no plasma é moderadamente aumentada, em média duas vezes, aproximadamente (82).

### **2.4.2.1 Etiologia**

A DG é herdada de modo autossômico recessivo, como a maioria das DLs,

sendo a mais comum das esfingolipidoses, causada por mutações que afetam a enzima GBA (83).

A doença resulta de mutações no gene que codifica a enzima GBA, situado no cromossomo 1q21.31 (gene GBA) (84).

#### **2.4.2.2 Classificação**

Clinicamente, existem três formas principais:

- 1) Tipo I (forma adulta, não neuropática): É a variante mais comum e tem uma maior prevalência em populações de Judeus Ashkenazi. Caracteriza-se pelo quadro visceral e hematológico e pela ausência de comprometimento neurológico;
- 2) Tipo II (forma infantil, neuropática aguda): As manifestações clínicas são muito precoces e há comprometimento neurológico importante e grave. Os pacientes com doença de Gaucher tipo II têm uma expectativa de vida muito curta e morrem ainda na primeira infância, geralmente antes dos três anos de idade;
- 3) Tipo III (Forma neuropática subaguda): Manifesta-se geralmente na infância e afeta o sistema nervoso central (SNC). A DG tipo III caracteriza-se, além do comprometimento neurológico, por manifestações sintomáticas e de intensidade distintas, tal como na de tipo I. Semelhante ao tipo II, porém menos precoce e menos grave. O comprometimento neurológico inclui regressão e convulsões (85).

#### **2.4.2.3 Aspectos Clínicos**

A DG caracteriza-se por uma ampla heterogeneidade clínica. Diferenças na apresentação clínica não é uma função da idade, tornando difícil predizer o curso

natural da doença. A esplenomegalia é o primeiro sintoma em combinação com trombocitopenia. Na doença mais avançada, o baço pode tornar-se muito aumentado, consumindo células do sangue periférico e fatores de coagulação, resultando em trombocitopenia, com tendência à hemorragia.

Alguns pacientes com DG apresentam poucos sintomas, enquanto outros pacientes têm uma clínica mais grave. As manifestações clínicas dos pacientes com DG tipo I, sem tratamento, incluem esplenomegalia, hepatomegalia, alterações hematológicas (anemia e trombocitopenia), manifestações ósseas (dor óssea, osteopenia, osteoporose e necrose avascular, entre outras) e retardo de crescimento (86). Os pacientes com DG tipo III podem apresentar as mesmas manifestações que os de tipo I acrescidos de sintomas neurológicos, os quais são vagarosamente progressivos e aparecem mais tardiamente do que os sintomas nos pacientes do tipo II da doença, onde o comprometimento neurológico é precoce e grave. A hepatoesplenomegalia é o principal sintoma observado nos pacientes. O fígado pode atingir um volume 10 vezes maior que o normal, enquanto o baço pode apresentar aumento de até 70 vezes. Razões de variabilidade da doença e suscetibilidade para comorbidades são em grande parte desconhecidas (87). O risco aumentado de câncer na DG é resultado de inflamações crônicas e disfunção do sistema imune, devido ao acúmulo de substrato nos macrófagos. O aparecimento de até três cânceres sequenciais tem sido reportado em pacientes de Gaucher tipo 1, sugerindo que modificações genéticas poderiam afetar a suscetibilidade (79).

Apesar da maioria dos pacientes com DG serem diagnosticados pelas alterações hematológicas e/ou pela hepatoesplenomegalia, complicações esqueléticas tais como a osteopenia generalizada (diminuição da densidade mineral óssea), a necrose avascular e as crises de dor óssea geralmente coexistem e podem ser a causa de sérias debilitações. Aproximadamente 80% dos pacientes apresentam a deformidade “em frasco de Erlenmeyer”, uma deformação óssea que ocorre devido à falha do remodelamento ósseo e perda da concavidade normal, principalmente no fêmur dos pacientes afetados. O número de leucócitos, plaquetas e hemoglobinas pode estar diminuído em relação ao normal. É possível também a substituição, ao longo do tempo, da medula óssea por células de Gaucher. O sítio de acúmulo são as células do sistema reticulo endotelial, principalmente os macrófagos (81,88).



Na Doença de Gaucher, as células repletas de glicoesfingolipídios deslocam as células normais no fígado, baço e medula óssea, que podem levar à disfunção orgânica e deterioração esquelética (89). As células com excesso de armazenamento lisossômico assumem um aspecto característico e são chamadas células de Gaucher, podendo ser um marcador para a Doença. As células de Gaucher acumulam-se principalmente no fígado, baço, ossos, medula óssea e às vezes nos pulmões, levando assim às manifestações clínicas da doença. Assim, é comum o paciente apresentar sintomas como dores abdominais e ósseas, fadiga, limitações físicas, fraqueza, atraso no crescimento, entre outros (90).

#### **2.4.2.4 Incidência**

A DG tem uma baixa incidência mundial, encontrando-se no grupo das doenças raras ou pouco frequentes (inferior a cinco casos por 10.000 habitantes). A DG é a mais comuns das esfingolipidoses (83), ocorrendo com uma frequência estimada de 1 em cada 40.000 a 60.000 indivíduos na população geral (91). A DG tipo 1 é considerada a doença genética mais comum entre os Judeus Ashkenazi (92). A incidência entre os descendentes de judeus Ashkenazi é de 1/400 a 1/800 RNs (85).

#### **2.4.2.5 Diagnóstico**

Após a suspeita clínica, o diagnóstico da DG é geralmente confirmado através do ensaio enzimático da GBA (glicocerebrosidase) em leucócitos e/ou fibroblastos, onde se constata a deficiência enzimática (22,88).

A medida da atividade da enzima nos leucócitos do sangue ou em fibroblastos encontra-se de 10 a 30% abaixo do normal nos pacientes com a doença tipo I (93).

A limitação desse método é que ele não consegue distinguir os tipos da doença, nem a gravidade da mesma. Às vezes a deficiência é pequena e deixa dúvidas quanto ao diagnóstico. O teste molecular analisa as mutações e confirma o diagnóstico, trazendo informações adicionais, já que algumas das mutações estão relacionadas à gravidade da doença.

Para a detecção de portadores o ensaio enzimático tem valor limitado, pois apresenta valores próximos aos indivíduos normais. Nesses casos, torna-se necessária a análise da mutação (94). A detecção de mutações oferece ainda um complemento diagnóstico ao resultado do ensaio enzimático com a vantagem de ter valor prognóstico, uma vez que permite diferenciar os tipos neuropáticos da DG (tipo 2 e 3) do tipo não neuropático (tipo 1) quando são detectadas mutações que apresentam relações genótipo-fenótipo conhecidas.

Atualmente, o diagnóstico da DG pode ser realizado também através da medida da atividade enzimática em amostras de sangue impregnado em papel filtro (SIPF) (95) sendo este um método de triagem.

#### **2.4.2.6 Tratamento**

O tratamento de escolha para a doença de Gaucher é a terapia de reposição enzimática (TRE), disponível a partir da década de 90, com Alglucerase®, posteriormente substituída pela Imiglucerase®. Com a TRE, observa-se um aumento no nível de hemoglobina e contagem de plaquetas em aproximadamente 6 meses, bem como redução do volume hepático e esplênico em 12 meses, sendo a TRE eficiente para tratar os sintomas não-neuropáticos da doença (96).

As manifestações viscerais podem ser minimizadas com a TRE, contudo essa terapia não é eficaz nos problemas neurológicos, pois a enzima não atravessa a barreira hematoencefálica (97,98).

Na maioria dos pacientes, melhora a citopenia e a diminuição do tamanho do baço e fígado são evidentes após 3 a 12 meses de tratamento. O volume do fígado geralmente normaliza, enquanto que algum grau de aumento do baço persiste, mesmo após longo tratamento. O retardo de crescimento em crianças e a qualidade de vida melhoram com o tratamento (82).

Na Holanda, um protocolo foi desenvolvido para permitir um tratamento individual baseado na resposta de cada paciente, fornecendo uma melhora do custo benefício.

##### **2.4.2.6.1 Terapia de Redução de Substrato (TRS)**

O acúmulo de glicosilceramidas é devido a um desequilíbrio entre a razão de síntese e degradação. Esse conceito forma a base de uma alternativa de terapia oral recentemente desenvolvida. N- butyldeoxinojirimycin (OGT918 ou miglustat) é um inibidor da síntese de glicosilceramida, o primeiro passo na biossíntese de glicolipídios (99). A TRS tem sido testada no contexto de doenças viscerais, principalmente a DG tipo I. Miglustat não obteve benefício na doença neurológica, possivelmente por falta de distribuição no SNC (100).

## **2.5. GLICOGENOSES**

As glicogenoses são doenças genéticas relacionadas ao armazenamento de glicogênio, autossômicas recessivas. Resultam da deficiência de enzimas específicas que afetam o processo de síntese ou degradação do glicogênio, com manifestações clínicas variadas. As glicogenoses podem ser classificadas em tipo I e III, cujas manifestações principais são a hepatomegalia e hipoglicemia e o tipo II e V, cujas manifestações clínicas principais são a fraqueza muscular e esquelética.

Essas doenças se diferem no efeito enzimático, no órgão afetado, na idade em que ocorrem as primeiras manifestações clínicas da doença e na severidade desses sintomas (101).

Destacamos neste estudo a glicogenose tipo II (Doença de Pompe).

### **2.5.1 Doença de Pompe**

A Doença de Pompe, também conhecida como glicogenose tipo II, é uma doença autossômica recessiva, do metabolismo do glicogênio, causada pela deficiência da enzima lisossômica  $\alpha$ -glicosidase ácida (GAA) ou maltase ácida. Como consequência, ocorre o acúmulo progressivo de glicogênio não degradado em diversos tecidos, com predomínio da musculatura esquelética, cardíaca e músculo liso (102,103). O acúmulo progressivo de glicogênio nesses tecidos leva à debilidade cardíaca, falência de órgãos e frequentemente à morte. A doença de Pompe foi descrita pela primeira vez pelo médico J.C.Pompe, em uma criança de 7 meses, que apresentava cardiomiopatia, com acúmulo massivo de glicogênio nos tecidos examinados (104).

Após a identificação dos lisossomos por Duve, em 1963 (13), a doença de Pompe tornou-se a primeira doença de armazenamento lisossômico reconhecido (105).

Esta doença apresenta duas formas de manifestação: infantil e adulta.

A forma infantil, severa, com cardiomiopatia, sofrimento respiratório e hipotonia muscular, onde o glicogênio se acumula no interior dos lisossomos, nos músculos esqueléticos e cardíaco e a forma de início tardio (juvenil e adulta), onde os pacientes podem apresentar um fenótipo heterogêneo, com uma progressão variável da doença, mas geralmente lenta. Ao contrário de outras doenças de depósito de glicogênio, a doença de Pompe não causa hipoglicemia ou baixa produção de energia (103,106).

### **2.5.1.1 Etiologia**

A Doença de Pompe é uma doença lisossômica, herdada de modo autossômico recessivo. O gene que codifica a enzima GAA está localizado no cromossomo 17q25 (107).

### **2.5.1.2 Classificação**

A Doença de Pompe classifica-se segundo a velocidade de evolução da doença, em duas formas:

- 1) Forma de início precoce (infantil): Geralmente surge rapidamente nos primeiros meses de vida, apresentando hipotonia e fraqueza muscular, com uma cardiomegalia importante.
- 2) Forma de início tardio (juvenil e adulta): A forma de início tardio pode surgir a qualquer momento, desde a infância até a idade adulta, com uma ampla variedade de manifestações clínicas, podendo incluir dificuldade para andar, gradual e progressiva fraqueza muscular e dificuldades respiratórias (106).

### **2.5.1.3 Aspectos Clínicos**

A doença de Pompe manifesta-se sob um amplo espectro de condições clínicas, com consideráveis variações na idade de início dos sintomas e grau da severidade e envolvimento de órgãos, incluindo cardiomegalia e hepatomegalia (106,108). O curso clínico é muito variável e varia de uma progressão rápida na doença de início na infância para uma progressão mais lenta, na doença de início tardio.

A forma mais severa da doença é a forma infantil, clássica. Embora os sintomas não apareçam ao nascimento, estes tem início nas primeiras semanas ou meses de vida e caracterizam-se por uma progressiva cardiomiopatia hipertrófica e hipotonia. O depósito massivo de glicogênio no coração e nos músculos esqueléticos resulta em cardiomiopatia progressiva, fraqueza muscular generalizada, hipotonia e morte devido à rápida falência cardiorrespiratória, geralmente antes dos dois anos de vida. A investigação clínica geralmente revela hepatomegalia moderada e cardiomegalia, enquanto a perda da atividade da enzima GAA é quase completa, chegando a 1% da atividade normal (106,108).

Na forma de início tardio (juvenil e adulta), a progressão da doença é lenta, caracterizada por uma grande variação dos aspectos clínicos. Manifesta-se, geralmente, após os 12 meses de vida. As principais características clínicas envolvem: Insuficiência respiratória e progressiva debilidade muscular, principalmente de músculos respiratórios, enquanto o envolvimento cardíaco pode ser ausente (106,109).

Na forma de início tardio, o envolvimento do músculo respiratório ocorre em mais de 60-80% dos pacientes, com um prevalente envolvimento do diafragma (110). A atividade da enzima GAA residual pode ser correlacionada com a severidade do fenótipo, mas muitos pacientes adultos compartilham as mesmas mutações, com uma ampla variabilidade na atividade enzimática residual, idade de início e progressão da doença.

Embora o envolvimento cardíaco seja considerado uma característica que define a doença de Pompe de início precoce, este tem sido também reportado em alguns pacientes de início tardio (106,108,111). O envolvimento cardíaco reportado em pacientes de início tardio é variável e inclui distúrbios rítmicos, tais como na síndrome de Wolff- Parkinson-White e dilatação da aorta ascendente (103,112–116).

#### **2.5.1.4 Incidência**

A incidência da doença de Pompe varia muito com a etnia e região geográfica. A forma de início precoce, infantil, tem uma frequência estimada de 1: 138.000 na população caucasiana (117). 1:50.000 na população Chinesa (118), 1:14.000 entre ancestrais africanos (106).

#### **2.5.1.5 Diagnóstico**

A partir de uma suspeita clínica, uma análise bioquímica deve ser realizada para avaliar a atividade da enzima  $\alpha$ - glicosidase ácida (GAA). Até recentemente a atividade da GAA podia ser medida somente em amostras de biópsia de músculo ou de pele (cultura de fibroblastos), que requerem processos invasivos e demorados (108). Atualmente, os testes enzimáticos podem ser realizados em leucócitos, através do método fluorimétrico e mais recentemente, em amostras de sangue impregnado em papel filtro (SIPF). Nos últimos anos, múltiplos testes de diagnóstico têm sido usados para a detecção de pacientes com doença de Pompe, incluindo métodos de análise de DNA, cultura de fibroblastos de pele e amostras de SIPF (108,119). Entretanto, o ensaio enzimático com amostras de leucócitos combinada com SIPF aumentou desde o início de 2000 e o uso de amostras de SIPF aumentou notavelmente durante 2006 a 2009, enquanto o uso de amostras de fibroblastos e tecido de músculo para o diagnóstico através do ensaio enzimático diminuiu consideravelmente (120). A medida da atividade da GAA em amostras de SIPF pode ser utilizada como um teste de triagem para a Doença de Pompe, quando a deficiência da enzima é detectada neste tipo de amostra, a confirmação diagnóstica deve ser realizada em amostras de leucócitos ou fibroblastos (34,106). O diagnóstico definitivo da doença de Pompe é através do ensaio enzimático da GAA, em amostras de leucócitos e/ou fibroblastos cultivados. O diagnóstico precoce da doença de Pompe na infância é crucial, permitindo o início precoce do tratamento através da TRE, com diminuição dos casos de morbidade e mortalidade (20).

A análise de mutações no DNA, embora não seja essencial para o diagnóstico, oferece informações importantes para a investigação da relação genótipo-fenótipo (Winchester B et al., 2008).

A raridade da doença, associada à heterogeneidade de manifestações clínicas e fenotípicas e a significativa sobreposição de sinais e sintomas com outras doenças neuromusculares, torna o diagnóstico da doença de Pompe um desafio (108,109,119).

#### **2.5.1.6 Tratamento**

A TRE tem sido aplicada com sucesso em pacientes com doença de Pompe (11). Em 2006, a TRE com alfa alglucosidase (Myozyme®, Genzyme Corporation, Company Sanofi, Cambridge MA, USA) foi aprovada na União Européia e subsequentemente, nos EUA, como tratamento para a doença de Pompe. O tratamento com alfa alglucosidase tem mostrado melhora no prognóstico dos pacientes com a forma infantil da doença de Pompe, estabilizando a doença ou melhorando a função muscular e respiratória, podendo aumentar a expectativa de vida desses pacientes (108,121,122). A eficácia da TRE pode ser influenciada por diversos fatores, incluindo a idade de início dos sintomas, início do tratamento e dano muscular. Na maioria dos casos, o início precoce da TRE, antes do início da falência respiratória, permite um melhor prognóstico, com diminuição dos casos de mortalidade (114,123).

Com a disponibilidade da TRE e os benefícios do tratamento, um diagnóstico correto e precoce da doença de Pompe é importante para todos pacientes (124).

### 3 MARCO TEÓRICO

**Tabela 2: Marco teórico do diagnóstico bioquímico (método enzimático fluorimétrico) das DLs estudadas e algumas DLs relacionadas**

<b>Doença</b>	<b>Diagnóstico em amostras de leucócitos e fibroblastos</b>	<b>Diagnóstico em amostras de sangue impregnado em papel filtro (SIPF)</b>	<b>Diagnóstico em amostras de leucócitos impregnados em papel filtro (LIPF)</b>
MORQUIO A (MPS IVA)	Van Diggelen OP et al., 1990 (125)	Camelier et al., 2011 (51)	Camelier et al., 2015 (126)
KRABBE	Wiederchain G, Raghavan S, 1992 (70)	–	Camelier et al., 2015 (127)
GAUCHER	Peters S, Coyle, P e Glew, R.H, 1976 (128)	Chamoles et al., 2002 (129); Civallero et al., 2006 (124)	Camelier et al., 2015 (126)
POMPE	Li Y, Scott C, Chamoles et al., 2004 (34)	Umaphysivan et al., 2001 (130); Chamoles et al., 2004 (24)	Camelier et al., 2015(126)
MPS IIIA	Karpova EA et al., 1996 (131)	–	Civallero et al., 2013 (132)
MPS I	Hopwood et al., 1979 (133)	Chamoles et al., 2001 (95); Civallero et al., 2006 (124)	–



## 4 JUSTIFICATIVA

Embora o diagnóstico das DLs seja baseado em técnicas enzimáticas específicas realizadas em amostras de leucócitos e/ou fibroblastos, o uso de amostras de sangue impregnadas em papel filtro (SIPF) tem sido crescente nos últimos anos (51,95,124,129).

A utilização de amostras biológicas em papel filtro é justificada, pois é um meio simples de coleta, armazenamento e transporte de amostras, sendo que o material biológico após a coleta e secagem é estável e não infectante. É uma excelente alternativa para países com recursos limitados e com regiões de difícil acesso.

Amostras secas em papel filtro são mais fáceis de transportar e armazenar, sendo uma alternativa às amostras de sangue total enviadas em tubos vacutainer ou seringas, que estão sujeitas a deterioração em um curto espaço de tempo e que tem seu envio limitado quando pensamos em longas distâncias. No entanto, nem todas as enzimas lisossômicas podem ser avaliadas em SIPF, algumas ainda exigem o uso de leucócitos do sangue líquido.

Julgamos importante padronizar e tornar disponível uma nova técnica que mede a atividade enzimática em amostras de leucócitos impregnados em papel filtro (LIPF) no momento em que um tratamento específico torna-se disponível para a maioria dessas doenças. A possibilidade de um diagnóstico mais precoce, através de técnicas mais simples e com material de mais fácil coleta e transporte como o papel filtro, permitirá ainda o acesso ao diagnóstico dos pacientes residentes em regiões mais remotas.

O laboratório de erros inatos do metabolismo (LEIM) do Serviço de Genética Médica do HCPA é um laboratório de referência nacional para diagnóstico de DLs, dá apoio ao Centro Coordenador da Rede DL Brasil e recebe muitas amostras de pacientes de diversas regiões do Brasil e mesmo do exterior, para diagnóstico ou para acompanhamento do tratamento. Acreditamos que o fato do laboratório ter este papel, justifica o esforço para o desenvolvimento e aprimoramento de novas metodologias para facilitar o diagnóstico de pacientes com DLs, especialmente considerando que muitas dessas condições têm tratamento específico, e que mesmo as que não têm, podem se beneficiar das medidas de manejo e prevenção disponíveis.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1. OBJETIVO PRIMÁRIO

- O objetivo principal deste projeto foi desenvolver, validar e tornar disponível um novo tipo de amostra, que pode ser mais simples, segura e prática para o diagnóstico bioquímico das doenças lisossômicas (DLs), especialmente para pacientes que vivem em regiões distantes e/ ou de difícil acesso.

### 5.2. OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Padronizar a metodologia do ensaio enzimático em amostras de leucócitos impregnados em papel filtro (LIPF), para o diagnóstico de DLs selecionadas;
- Correlacionar os resultados obtidos no novo método, (LIPF) com os resultados do método convencional em amostras de leucócitos;
- Estabelecer os valores de referência para o novo método (LIPF);
- Verificar a sensibilidade do novo método, comparando os resultados com os obtidos com o método convencional em leucócitos;
- Verificar a especificidade do novo método, comparando com o método convencional em leucócitos, o qual é capaz de identificar os sujeitos que não tem a doença;
- Avaliar a estabilidade das amostras (LIPF), quando submetidas a diferentes tempos e temperatura de armazenamento.

## 6 REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

1. Garrod AE. Inborn errors of metabolism. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press; 1923.
2. Stanbury J. The metabolic basis of inherited disease. 5th ed. New York, NY: Mc Graw-Hill; 1983.
3. Sanchez M, fuentes F. Mucopolisacaridosis. In: Sanrurjo P, Baldellou A, Ergon C, editors. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias. Madrid: Majadahonda; 2006. p. 621–9.
4. Wannmacher C. Detection of metabolic disorders among high risk patients. Rev Bras Genet. 1982;1:187–94.
5. Green A. Investigation for inborn errors of metabolism. An approach to diagnosis. J Intern Ped Clin Chem. 1991;3:104–5.
6. Sinclair L. A new look at the inborn errors of metabolism. Ann Clin Biochem [Internet]. 1982 Jul;19 (Pt 4):314–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6812485>
7. Fensom AH, Marsh J, Jackson M, McGuire VM, Vimal C, Nicolaidis K, et al. First-trimester diagnosis of metachromatic leucodystrophy. Clin Genet [Internet]. 2008 Jun 28;34(2):122–5. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399-0004.1988.tb02847.x>
8. Lippiello L, Mankin HJ. Thin-layer chromatographic separation of the isomeric chondroitin sulfates, dermatan sulfate, and keratan sulfate. Anal Biochem [Internet]. 1971 Jan;39(1):54–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5544607>
9. Tager JM, Jonsson LVM, Aerts JMFG, Elferink RPJO, Schram AW, Erickson AH, et al. Metabolic consequences of genetic defects in lysosomes. Biochem Soc Trans [Internet]. 1984 Dec 1;12(6):902–5. Available from: <http://biochemsoctrans.org/lookup/doi/10.1042/bst0120902>
10. Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D, Childs B, Kinzler K, et al. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 4 volume set. 3rd ed. New York, NY: McGraw-Hill Companies, Incorporated; 2001.
11. Schiffmann R. Therapeutic approaches for neuronopathic lysosomal storage disorders. J Inherit Metab Dis [Internet]. 2010 Aug 17;33(4):373–9. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10545-010-9047-0>
12. Gieselmann V. Lysosomal storage diseases. Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis [Internet]. 1995 Apr;1270(2–3):103–36. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0925443994000752>

13. de Duve C, Wattiaux R. Functions of Lysosomes. *Annu Rev Physiol* [Internet]. 1966 Mar;28(1):435–92. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.ph.28.030166.002251>
14. Rohrbach M, Clarke JTR. Treatment of lysosomal storage disorders : progress with enzyme replacement therapy. *Drugs* [Internet]. 2007;67(18):2697–716. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18062719>
15. Barth ML, Giugliani R, Goldenfum SL, Munarski R, Folberg A, Lekhwani C, et al. Application of a flowchart for the detection of lysosomal storage diseases in 105 high-risk Brazilian patients. *Am J Med Genet*. 1990;37(4):534–8.
16. Schwartz I, Matte U, Leistner S, Giugliani R. Mucopolissacaridoses. In: Karakushansky G, editor. *Doenças Genéticas em Pediatria*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. p. 180–4.
17. Alberts B, Wilson J, Hunt T. *Molecular biology of the cell*. Garland Science; 2008.
18. Desnick RJ, Schuchman EH. Enzyme replacement and enhancement therapies: lessons from lysosomal disorders. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2002 Dec;3(12):954–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12459725>
19. Poorthuis BJ, Wevers RA, Kleijer WJ, Groener JE, de Jong JG, van Weely S, et al. The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. *Hum Genet* [Internet]. 1999. 105(1–2):151–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10480370>
20. Meikle PJ, Grasby DJ, Dean CJ, Lang DL, Bockmann M, Whittle AM, et al. Newborn screening for lysosomal storage disorders. *Mol Genet Metab* [Internet]. 2006 Aug;88(4):307–14. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S109671920600076X>
21. Giugliani R, Coelho JC. Diagnóstico de erros inatos do metabolismo da América Latina. *Braz J Gen*. 1997;20:147–54.
22. Saudubray JM & Charpentier C. Clinical Phenotypes: Diagnosis/Algorithms. In: Scriver C, Beaudet L, Sly W, editors. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York, NY: Mc Graw-Hill; 1995. p. 327–400.
23. Voet D, Voet JG, Pratt CW. *Fundamentos de Bioquímica*. Porto Alegre: Artmed Editora; 2002.
24. Chamoles NA, Niizawa G, Blanco M, Gaggioli D, Casentini C. Glycogen storage disease type II: enzymatic screening in dried blood spots on filter paper. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2004 Sep;347(1–2):97–102. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009898104002104>
25. Chien Y-H, Chiang S-C, Zhang XK, Keutzer J, Lee N-C, Huang A-C, et al. Early

- detection of Pompe disease by newborn screening is feasible: results from the Taiwan screening program. *Pediatrics* [Internet]. 2008 Jul;122(1):e39-45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18519449>
26. Zhang H, Kallwass H, Young SP, Carr C, Dai J, Kishnani PS, et al. Comparison of maltose and acarbose as inhibitors of maltase-glucoamylase activity in assaying acid alpha-glucosidase activity in dried blood spots for the diagnosis of infantile Pompe disease. *Genet Med* [Internet]. 2006 May;8(5):302–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16702880>
  27. Kumamoto S, Katafuchi T, Nakamura K, Endo F, Oda E, Okuyama T, et al. High frequency of acid alpha-glucosidase pseudodeficiency complicates newborn screening for glycogen storage disease type II in the Japanese population. *Mol Genet Metab* [Internet]. 2009 Jul;97(3):190–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19362502>
  28. Oemardien LF, Boer AM, Ruijter GJG, van der Ploeg AT, de Klerk JBC, Reuser AJJ, et al. Hemoglobin precipitation greatly improves 4-methylumbelliferone-based diagnostic assays for lysosomal storage diseases in dried blood spots. *Mol Genet Metab* [Internet]. 2011 Jan;102(1):44–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20947400>
  29. Beaudet AL, DiFerrante NM, Ferry GD, Nichols BL, Mullins CE. Variation in the phenotypic expression of beta-glucuronidase deficiency. *J Pediatr* [Internet]. 1975 Mar;86(3):388–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/803560>
  30. Baker E, Guo XH, Orsborn AM, Sutherland GR, Callen DF, Hopwood JJ, et al. The morquio A syndrome (mucopolysaccharidosis IVA) gene maps to 16q24.3. *Am J Hum Genet* [Internet]. 1993 Jan;52(1):96–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8434612>
  31. Fukuda S, Tomatsu S, Masuno M, Ogawa T, Yamagishi A, Rezvi GM, et al. Mucopolysaccharidosis IVA: submicroscopic deletion of 16q24.3 and a novel R386C mutation of N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase gene in a classical Morquio disease. *Hum Mutat* [Internet]. 1996;7(2):123–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8829629>
  32. Grabowski GA, Hopkin RJ. Enzyme therapy for lysosomal storage disease: principles, practice, and prospects. *Annu Rev Genomics Hum Genet* [Internet]. 2003;4:403–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14527307>
  33. Kaye EM. Lysosomal Storage Diseases. *Curr Treat Options Neurol* [Internet]. 2001 May;3(3):249–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11282040>
  34. Li Y, Scott CR, Chamoles NA, Ghavami A, Pinto BM, Turecek F, et al. Direct multiplex assay of lysosomal enzymes in dried blood spots for newborn screening. *Clin Chem* [Internet]. 2004 Oct;50(10):1785–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15292070>

35. Pagliardini S, Spada M. First neonatal mass screening program for lysosomal storage disorders: 18 month experience. *J Inherit Metab Dis*. 2005;28(Suppl 1):148.
36. Niizawa G, Levin C, Aranda C, Blanco M, Chamoles NA. Retrospective diagnosis of glycogen storage disease type II by use of a newborn-screening card. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2005 Sep;359(1–2):205–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15963968>
37. Sanchez M, Fuentes F. Mucopolisacaridosis. In: Sanrurjo P, Baldellou A, editors. *Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias*. Madrid: Majadahonda; 2006. p. 621–9.
38. Neufeld E, Muenzer J. The mucopolysaccharidoses. In: SCHIVER C, editor. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York, NY: McGraw-Hill; 2001. p. 3421–52.
39. Nelson J. Incidence of the mucopolysaccharidoses. In: SCHIVER C, editor. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York, NY: Mc Graw-Hill; 2003. p. 3421–52.
40. Baehner F, Schmiedeskamp C, Krummenauer F, Miebach E, Bajbouj M, Whybra C, et al. Cumulative incidence rates of the mucopolysaccharidoses in Germany. *J Inherit Metab Dis* [Internet]. 2005;28(6):1011–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16435194>
41. Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA* [Internet]. 1999 Jan 20;281(3):249–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9918480>
42. Dangel JH. Cardiovascular changes in children with mucopolysaccharide storage diseases and related disorders--clinical and echocardiographic findings in 64 patients. *Eur J Pediatr* [Internet]. 1998 Jul;157(7):534–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9686810>
43. Kircher S, Bajbouj M, Miebach E, Beck M. Therapy. In: *Mucopolysaccharidoses – a guide for physicians and parents*. London: International Medical Publishers; 2007. p. 72–80.
44. Matalon R, Arbogast B, Justice P, Brandt IK, Dorfman A. Morquio's syndrome: deficiency of a chondroitin sulfate N-acetylhexosamine sulfate sulfatase. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 1974 Nov 27;61(2):759–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4218100>
45. Morquio L. Sur une forme de dystrophie osseuse familiale. *Bull SOC Pediat*. 1929;27:145–52.
46. Maroteaux P, Lamy M. STUDYING THE MUCOPOLYSACCHARIDOSES. *Lancet* [Internet]. 1967 Sep;290(7514):510. Available from:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673667916789>

47. Harmatz P, Mengel KE, Giugliani R, Valayannopoulos V, Lin S-P, Parini R, et al. The Morquio A Clinical Assessment Program: baseline results illustrating progressive, multisystemic clinical impairments in Morquio A subjects. *Mol Genet Metab* [Internet]. 2013 May;109(1):54–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23452954>
48. Trojak JE, Ho CK, Roesel RA, Levin LS, Kopits SE, Thomas GH, et al. Morquio-like syndrome (MPS IV B) associated with deficiency of a beta-galactosidase. *Johns Hopkins Med J* [Internet]. 1980 Feb;146(2):75–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6766519>
49. de Jong JG, Wevers RA, Laarakkers C, Poorthuis BJ. Dimethylmethylene blue-based spectrophotometry of glycosaminoglycans in untreated urine: a rapid screening procedure for mucopolysaccharidoses. *Clin Chem* [Internet]. 1989 Jul;35(7):1472–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2503262>
50. Chih-Kuang C, Shuan-Pei L, Shyue-Jye L, Tuen-Jen W. MPS screening methods, the Berry spot and acid turbidity tests, cause a high incidence of false-negative results in sanfilippo and morquio syndromes. *J Clin Lab Anal* [Internet]. 2002;16(5):253–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12357455>
51. Camelier M V, Burin MG, De Mari J, Vieira TA, Marasca G, Giugliani R. Practical and reliable enzyme test for the detection of mucopolysaccharidosis IVA (Morquio Syndrome type A) in dried blood samples. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2011 Sep 18;412(19–20):1805–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21684269>
52. Hendriksz CJ, Berger KI, Giugliani R, Harmatz P, Kampmann C, Mackenzie WG, et al. International guidelines for the management and treatment of Morquio A syndrome. *Am J Med Genet A* [Internet]. 2015 Jan;167A(1):11–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25346323>
53. Colombo M, Cornejo V, Raimann E. Errores innatos en el metabolismo del niño. Ed. Universitaria; 2003.
54. Tomatsu S, Montañó AM, Oikawa H, Smith M, Barrera L, Chinen Y, et al. Mucopolysaccharidosis type IVA (Morquio A disease): clinical review and current treatment. *Curr Pharm Biotechnol* [Internet]. 2011 Jun;12(6):931–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21506915>
55. Dvorak-Ewell M, Wendt D, Hague C, Christianson T, Koppaka V, Crippen D, et al. Enzyme replacement in a human model of mucopolysaccharidosis IVA in vitro and its biodistribution in the cartilage of wild type mice. *PLoS One* [Internet]. 2010 Aug 16;5(8):e12194. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20808938>
56. Chon R, Roth K. *Metabolic Diseases*. Philadelphia: W.B. Saunders Company;

1983.

57. Krabbe K. A NEW FAMILIAL, INFANTILE FORM OF DIFFUSE BRAIN-SCLEROSIS. *Brain* [Internet]. 1916;39(1–2):74–114. Available from: <http://brain.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/brain/39.1-2.74>
58. Gama Sosa MA, de Gasperi R, Undevia S, Yeretsian J, Rouse SC, Lyerla TA, et al. Correction of the galactocerebrosidase deficiency in globoid cell leukodystrophy-cultured cells by SL3-3 retroviral-mediated gene transfer. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 1996 Jan 26;218(3):766–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8579588>
59. Suzuki K. Globoid cell leukodystrophy (Krabbe disease) and GM1-gangliosidosis. In: Glew R, Peters S, editors. *Practical Enzymology of Sphingolipidoses*. New York, NY: Alan R. Liss, Inc.; 1977.
60. McKelvie P, Vine P, Hopkins I, Poulos A. A case of krabbe's leukodystrophy without globoid cells. *Pathology* [Internet]. 1990;22(4):235–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031302516362407>
61. Suzuki K. Globoid cell leukodystrophy (Krabbe's disease): update. *J Child Neurol* [Internet]. 2003 Sep;18(9):595–603. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14572137>
62. Zlotogora J, Chakraborty S, Knowlton RG, Wenger DA. Krabbe disease locus mapped to chromosome 14 by genetic linkage. *Am J Hum Genet* [Internet]. 1990 Jul;47(1):37–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1971996>
63. Rosemberg S, Kliemann SE, Arita FN. Doença de krabbe (leucodistrofia a células globóides) a propósito de cinco observações. *Arq Neuropsiquiatr* [Internet]. 1992 Sep;50(3):334–42. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-282X1992000300013&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-282X1992000300013&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)
64. Swaiman K. Lysosomal diseases. In: *Pediatric neurology principles and practice*. Elsevier Health Sciences; 1994. p. 1275–334.
65. Barone R, Brühl K, Stoeter P, Fiumara A, Pavone L, Beck M. Clinical and neuroradiological findings in classic infantile and late-onset globoid-cell leukodystrophy (Krabbe disease). *Am J Med Genet* [Internet]. 1996 May 3;63(1):209–17. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/%28SICI%291096-8628%2819960503%2963%3A1%3C209%3A%3AAID-AJMG37%3E3.0.CO%3B2-Q>
66. Lyon G, Adams R, Kolodny E. Early Infantile progressive metabolic encephalopathies. In: *Neurology of Hereditary Metabolic Disease of Children*. McGraw-Hill Education; 1996. p. 67–70.
67. Hagberg B, Kollberg H, Sourander P, Akesson H. Infantile globoid cell



- leucodystrophy (Krabbe's disease). A clinical and genetic study of 32 Swedish cases 1953-1967. *Neuropadiatrie*. 1969;1:74-8.
68. Percy AK, Odrezin GT, Knowles PD, Rouah E, Armstrong DD. Globoid cell leukodystrophy: comparison of neuropathology with magnetic resonance imaging. *Acta Neuropathol* [Internet]. 1994;88(1):26-32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7941969>
  69. Svennerholm L, Vanier MT, Häkansson G, Månsson JE. Use of leukocytes in diagnosis of Krabbe disease and detection of carriers. *Clin Chim Acta* [Internet]. 1981 May;112(3):333-42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7237832>
  70. Wiederschain G, Raghavan S, Kolodny E. Characterization of 6-hexadecanoylamino-4-methylumbelliferyl-beta-D-galactopyranoside as fluorogenic substrate of galactocerebrosidase for the diagnosis of Krabbe disease. *Clin Chim Acta* [Internet]. 1992 Jan 31;205(1-2):87-96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1521344>
  71. Finelli DA, Tarr RW, Sawyer RN, Horwitz SJ. Deceptively normal MR in early infantile Krabbe disease. *Am J Neuroradiol*. 1994;15(1):167-71.
  72. Krivit W, Shapiro EG, Peters C, Wagner JE, Cornu G, Kurtzberg J, et al. Hematopoietic Stem-Cell Transplantation in Globoid-Cell Leukodystrophy. *N Engl J Med* [Internet]. 1998 Apr 16;338(16):1119-27. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM199804163381605>
  73. Hupples W, De Groot CJA, Ostendorf RH, Bauman JGJ, Gossen JA, Smit V, et al. Detection of migrated allogeneic oligodendrocytes throughout the central nervous system of the galactocerebrosidase-deficient twitcher mouse. *J Neurocytol* [Internet]. 1992 Feb;21(2):129-36. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF01189011>
  74. Matsumoto A, Vanier M, Oya Y, Susuky H. Transgenic introduction of human galactosylceramidase into twitcher mouse: Significant phenotype improvement with a minimal expression. *Dev Brain Dysfunct*. 1997;10:142-54.
  75. Costantino-Ceccarini E, Luddi A, Volterrani M, Strazza M, Rafi MA, Wenger DA. Transduction of cultured oligodendrocytes from normal and twitcher mice by a retroviral vector containing human galactocerebrosidase (GALC) cDNA. *Neurochem Res* [Internet]. 1999 Feb;24(2):287-93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9972877>
  76. Rafi MA, Fugaro J, Amini S, Luzi P, de Gala G, Victoria T, et al. Retroviral vector-mediated transfer of the galactocerebrosidase (GALC) cDNA leads to overexpression and transfer of GALC activity to neighboring cells. *Biochem Mol Med* [Internet]. 1996 Aug;58(2):142-50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8812733>
  77. Biswas S, LeVine SM. Substrate-reduction therapy enhances the benefits of

- bone marrow transplantation in young mice with globoid cell leukodystrophy. *Pediatr Res* [Internet]. 2002 Jan;51(1):40–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11756638>
78. LeVine SM, Pedchenko T V, Bronshteyn IG, Pinson DM. L-cycloserine slows the clinical and pathological course in mice with globoid cell leukodystrophy (twitcher mice). *J Neurosci Res* [Internet]. 2000 Apr 15;60(2):231–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10740228>
  79. Mistry PK, Liu J, Yang M, Nottoli T, McGrath J, Jain D, et al. Glucocerebrosidase gene-deficient mouse recapitulates Gaucher disease displaying cellular and molecular dysregulation beyond the macrophage. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2010 Nov 9;107(45):19473–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20962279>
  80. Desnick R., Gatt S, Grabowski GA. *Gaucher disease: A century of Delineation and Research*. New York, NY: Alan R. Liss, Inc.; 1982.
  81. Futerman D. Encontro organizado pela fundação de pesquisa de Gaucher em crianças (CGRF). Atlanta; 2012.
  82. Hollak CE, Levi M, Berends F, Aerts JM, van Oers MH. Coagulation abnormalities in type 1 Gaucher disease are due to low-grade activation and can be partly restored by enzyme supplementation therapy. *Br J Haematol* [Internet]. 1997 Mar;96(3):470–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9054650>
  83. Beutler E. Commentary: the natural history of Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis* [Internet]. 1998 Mar;24(1):82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9541480>
  84. Hruska KS, LaMarca ME, Scott CR, Sidransky E. Gaucher disease: mutation and polymorphism spectrum in the glucocerebrosidase gene (GBA). *Hum Mutat* [Internet]. 2008 May;29(5):567–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18338393>
  85. Grabowski GA, Andria G, Baldellou A, Campbell PE, Charrow J, Cohen IJ, et al. Pediatric non-neuronopathic Gaucher disease: presentation, diagnosis and assessment. Consensus statements. *Eur J Pediatr* [Internet]. 2004 Feb;163(2):58–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14677061>
  86. Kaplan P, Andersson HC, Kacena KA, Yee JD. The clinical and demographic characteristics of nonneuronopathic Gaucher disease in 887 children at diagnosis. *Arch Pediatr Adolesc Med* [Internet]. 2006 Jun;160(6):603–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16754822>
  87. Mistry PK, Deegan P, Vellodi A, Cole JA, Yeh M, Weinreb NJ. Timing of initiation of enzyme replacement therapy after diagnosis of type 1 Gaucher disease: effect on incidence of avascular necrosis. *Br J Haematol* [Internet]. 2009

- Nov;147(4):561–70. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19732054>
88. Clarke JTR. A Clinical Guide to Inherited Metabolic Diseases [Internet]. Cambridge University Press; 2005. Available from:  
<https://books.google.com.br/books?id=iWl3E4EtrWgC>
89. Mistry PK, Sadan S, Yang R, Yee J, Yang M. Consequences of diagnostic delays in type 1 Gaucher disease: the need for greater awareness among hematologists-oncologists and an opportunity for early diagnosis and intervention. *Am J Hematol* [Internet]. 2007 Aug;82(8):697–701. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17492645>
90. Beutler E, Grabowski GA. Gaucher disease. In: Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 3635–68.
91. Grabowski GA, Saal HM, Wenstrup RJ, Barton NW. Gaucher disease: a prototype for molecular medicine. *Crit Rev Oncol Hematol* [Internet]. 1996 May;23(1):25–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8817081>
92. Charrow J, Esplin JA, Gribble TJ, Kaplan P, Kolodny EH, Pastores GM, et al. Gaucher disease: recommendations on diagnosis, evaluation, and monitoring. *Arch Intern Med* [Internet]. 1998 Sep 14;158(16):1754–60. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9738604>
93. de Fost M, Out TA, de Wilde FA, Tjin EPM, Pals ST, van Oers MHJ, et al. Immunoglobulin and free light chain abnormalities in Gaucher disease type I: data from an adult cohort of 63 patients and review of the literature. *Ann Hematol* [Internet]. 2008 Jun 15;87(6):439–49. Available from:  
<http://link.springer.com/10.1007/s00277-008-0441-8>
94. Weinreb NJ, Deegan P, Kacena KA, Mistry P, Pastores GM, Velentgas P, et al. Life expectancy in Gaucher disease type 1. *Am J Hematol* [Internet]. 2008 Dec;83(12):896–900. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18980271>
95. Chamoles NA, Blanco MB, Gaggioli D, Casentini C. Hurler-like phenotype: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. *Clin Chem* [Internet]. 2001 Dec;47(12):2098–102. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11719472>
96. Mistry PK, Abrahamov A. A practical approach to diagnosis and management of Gaucher's disease. *Baillieres Clin Haematol* [Internet]. 1997 Dec;10(4):817–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9497866>
97. Cox-Brinkman J, van Breemen MJ, van Maldegem BT, Bour L, Donker WE, Hollak CEM, et al. Potential efficacy of enzyme replacement and substrate reduction therapy in three siblings with Gaucher disease type III. *J Inherit Metab Dis* [Internet]. 2008 Dec;31(6):745–52. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18850301>

98. Vellodi A, Tylki-Szymanska A, Davies EH, Kolodny E, Bembi B, Collin-Histed T, et al. Management of neuronopathic Gaucher disease: revised recommendations. *J Inherit Metab Dis* [Internet]. 2009 Oct;32(5):660–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19655269>
99. Cox T, Lachmann R, Hollak C, Aerts J, van Weely S, Hrebíček M, et al. Novel oral treatment of Gaucher's disease with N-butyldeoxynojirimycin (OGT 918) to decrease substrate biosynthesis. *Lancet* (London, England) [Internet]. 2000 Apr 29;355(9214):1481–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10801168>
100. Cabrera-Salazar MA, DeRiso M, Bercury SD, Li L, Lydon JT, Weber W, et al. Systemic Delivery of a Glucosylceramide Synthase Inhibitor Reduces CNS Substrates and Increases Lifespan in a Mouse Model of Type 2 Gaucher Disease. Silman I, editor. *PLoS One* [Internet]. 2012 Aug 17;7(8):e43310. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0043310>
101. Vieira JCF, Carneiro FM, Assêncio-Ferreira VJ. Alteração de deglutição em um caso de glicogenose. *Cefac*. 2004;(1):34–9.
102. Gaeta M, Barca E, Ruggeri P, Minutoli F, Rodolico C, Mazziotti S, et al. Late-onset Pompe disease (LOPD): correlations between respiratory muscles CT and MRI features and pulmonary function. *Mol Genet Metab* [Internet]. 2013 Nov;110(3):290–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23916420>
103. van der Ploeg AT, Reuser AJJ. Pompe's disease. *Lancet* (London, England) [Internet]. 2008 Oct 11;372(9646):1342–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18929906>
104. Pompe J. Over idiopatische hypertrophie van het hart. *Ned Tijdschr Geneeskd*. 1932;76:304.
105. Van den Hout JMP, Kamphoven JHJ, Winkel LPF, Arts WFM, De Klerk JBC, Loonen MCB, et al. Long-term intravenous treatment of Pompe disease with recombinant human alpha-glucosidase from milk. *Pediatrics* [Internet]. 2004 May;113(5):e448-57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15121988>
106. Hirschhorn R, Reuser A. Glycogen storage disease type II: acid  $\alpha$ -glucosidase (acid maltase) deficiency. In: Scriver C, Beaudet A, Sly W, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. New York: Mc Graw-Hill; 2001. p. 3389–420.
107. Wisselaar HA, Kroos MA, Hermans MM, van Beeumen J, Reuser AJ. Structural and functional changes of lysosomal acid alpha-glucosidase during intracellular transport and maturation. *J Biol Chem* [Internet]. 1993 Jan 25;268(3):2223–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8420990>

108. ACMG Work Group on Management of Pompe Disease, Kishnani PS, Steiner RD, Bali D, Berger K, Byrne BJ, et al. Pompe disease diagnosis and management guideline. *Genet Med* [Internet]. 2006 May;8(5):267–88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16702877>
109. Winkel LPF, Hagemans MLC, van Doorn PA, Loonen MCB, Hop WJC, Reuser AJJ, et al. The natural course of non-classic Pompe's disease; a review of 225 published cases. *J Neurol* [Internet]. 2005 Aug;252(8):875–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16133732>
110. Hagemans MLC, Winkel LPF, Van Doorn PA, Hop WJC, Loonen MCB, Reuser AJJ, et al. Clinical manifestation and natural course of late-onset Pompe's disease in 54 Dutch patients. *Brain* [Internet]. 2005 Mar;128(Pt 3):671–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15659425>
111. Laforêt P, Petiot P, Nicolino M, Orlikowski D, Caillaud C, Pellegrini N, et al. Dilative arteriopathy and basilar artery dolichoectasia complicating late-onset Pompe disease. *Neurology* [Internet]. 2008 May 27;70(22):2063–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18505979>
112. Soliman OII, van der Beek NAME, van Doorn PA, Vletter WB, Nemes A, Van Dalen BM, et al. Cardiac involvement in adults with Pompe disease. *J Intern Med* [Internet]. 2008 Oct;264(4):333–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18397245>
113. El-Gharbawy AH, Bhat G, Murillo JE, Thurberg BL, Kampmann C, Mengel K-E, et al. Expanding the clinical spectrum of late-onset Pompe disease: dilated arteriopathy involving the thoracic aorta, a novel vascular phenotype uncovered. *Mol Genet Metab* [Internet]. 2011 Aug;103(4):362–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21605996>
114. van der Beek NAME, van Capelle CI, van der Velden-van Etten KI, Hop WCJ, van den Berg B, Reuser AJJ, et al. Rate of progression and predictive factors for pulmonary outcome in children and adults with Pompe disease. *Mol Genet Metab* [Internet]. 104(1–2):129–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21763167>
115. Schüller A, Wenninger S, Strigl-Pill N, Schoser B. Toward deconstructing the phenotype of late-onset Pompe disease. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* [Internet]. 2012 Feb 15;160C(1):80–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22253010>
116. Sacconi S, Bocquet JD, Chanalet S, Tanant V, Salviati L, Desnuelle C. Abnormalities of cerebral arteries are frequent in patients with late-onset Pompe disease. *J Neurol* [Internet]. 2010 Oct;257(10):1730–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20559845>
117. Ausems MG, Verbiest J, Hermans MP, Kroos MA, Beemer FA, Wokke JH, et al. Frequency of glycogen storage disease type II in The Netherlands: implications

- for diagnosis and genetic counselling. *Eur J Hum Genet* [Internet]. 1999 Sep;7(6):713–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10482961>
118. Lin CY, Hwang B, Hsiao KJ, Jin YR. Pompe's disease in Chinese and prenatal diagnosis by determination of alpha-glucosidase activity. *J Inherit Metab Dis* [Internet]. 1987;10(1):11–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3106710>
  119. Vissing J, Lukacs Z, Straub V. Diagnosis of Pompe disease: muscle biopsy vs blood-based assays. *JAMA Neurol* [Internet]. 2013 Jul;70(7):923–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23649721>
  120. Kishnani PS, Amartino HM, Lindberg C, Miller TM, Wilson A, Keutzer J. Methods of diagnosis of patients with Pompe disease: Data from the Pompe Registry. *Mol Genet Metab* [Internet]. 113(1–2):84–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25085280>
  121. Angelini C, Semplicini C, Ravaglia S, Bembi B, Servidei S, Pegoraro E, et al. Observational clinical study in juvenile-adult glycogenosis type 2 patients undergoing enzyme replacement therapy for up to 4 years. *J Neurol* [Internet]. 2012 May;259(5):952–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22081099>
  122. Regnery C, Kornblum C, Hanisch F, Vielhaber S, Strigl-Pill N, Grunert B, et al. 36 months observational clinical study of 38 adult Pompe disease patients under alglucosidase alfa enzyme replacement therapy. *J Inherit Metab Dis* [Internet]. 2012 Sep;35(5):837–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22290025>
  123. Kobayashi H, Shimada Y, Ikegami M, Kawai T, Sakurai K, Urashima T, et al. Prognostic factors for the late onset Pompe disease with enzyme replacement therapy: from our experience of 4 cases including an autopsy case. *Mol Genet Metab* [Internet]. 2010 May;100(1):14–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20202878>
  124. Civallero G, Michelin K, de Mari J, Viapiana M, Burin M, Coelho JC, et al. Twelve different enzyme assays on dried-blood filter paper samples for detection of patients with selected inherited lysosomal storage diseases. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2006 Oct;372(1–2):98–102. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16712827>
  125. van Diggelen OP, Zhao H, Kleijer WJ, Janse HC, Poorthuis BJ, van Pelt J, et al. A fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of Morquio disease type A (MPS IV A). *Clin Chim Acta* [Internet]. 1990 Feb 28;187(2):131–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2107987>
  126. Camelier M, De Mari J, Burin M, Civallero G, Giugliani R. Extended use of dried-leukocytes impregnated in filter paper samples for detection of Pompe, Gaucher, and Morquio A diseases. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2015 Jun 15;446:218–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25944767>

127. Camelier M, Civallero G, De Mari J, Burin M, Giugliani R. Galactocerebrosidase assay on dried-leukocytes impregnated in filter paper for the detection of Krabbe disease. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2015 Jan 1;438:178–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25193740>
128. Peters SP, Coyle P, Glew RH. Differentiation of beta-glucocerebrosidase from beta-glucosidase in human tissues using sodium taurocholate. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 1976 Aug;175(2):569–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/958319>
129. Chamoles NA, Blanco M, Gaggioli D, Casentini C. Gaucher and Niemann-Pick diseases--enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper: retrospective diagnoses in newborn-screening cards. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2002 Mar;317(1–2):191–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11814475>
130. Umaphysivam K, Hopwood JJ, Meikle PJ. Determination of acid alpha-glucosidase activity in blood spots as a diagnostic test for Pompe disease. *Clin Chem* [Internet]. 2001 Aug;47(8):1378–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11468225>
131. Karpova EA, Voznyi Y V., Keulemans JLM, Hoogeveen AT, Winchester B, Tsvetkova I V., et al. A fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of sanfilippo disease type A (MPS IIIA). *J Inher Metab Dis* [Internet]. 1996 May;19(3):278–85. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF01799255>
132. Civallero G, De Mari J, Viapiana Camelier M, Burin M, Giugliani R. Assay of heparan-N-sulfamidase in dried leukocytes impregnated in filter paper: a new tool for the identification of mucopolisaccharidosis IIIA and potentially other lysosomal disorders. *Mol Genet Metab* [Internet]. 2013 Apr;108(4):267–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23485107>
133. Hopwood JJ, Muller V, Smithson A, Baggett N. A fluorometric assay using 4-methylumbelliferyl alpha-L-iduronide for the estimation of alpha-L-iduronidase activity and the detection of Hurler and Scheie syndromes. *Clin Chim Acta* [Internet]. 1979 Mar 1;92(2):257–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/114339>

## 7 ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS 1<sup>1</sup>

*Clin Chim Acta*. 2015 Jan 1;438:178-80. doi: 10.1016/j.cca.2014.08.029. Epub 2014 Sep 3.

### **Galactocerebrosidase assay on dried-leukocytes impregnated in filter paper for the detection of Krabbe disease.**

Camelier M<sup>1</sup>, Civallo G<sup>2</sup>, De Mari J<sup>3</sup>, Burin M<sup>3</sup>, Giugliani R<sup>4</sup>.

#### ⊕ Author information

#### **Abstract**

**BACKGROUND:** Krabbe disease (KD) is an inherited lysosomal storage disease (LSD) caused by the deficiency of galactocerebrosidase (GALC) and is characterized by a severe and progressive leukodystrophy with death frequently before one year of life in the classical early-onset form. As a consequence of the enzyme defect, globoid cells containing undigested galactosylceramide are observed and are characteristic of the disease. Hematopoietic stem cell transplantation is the current treatment for this disease, with some success in the classical cases if performed very early in life. Definitive diagnosis of KD is generally accessed by determination of GALC in leukocytes or fibroblasts. For the last few years, dried-blood filter paper (DBFP) samples have been increasingly used for lysosomal enzyme assays. Originally, some lysosomal enzymes could not be tested in DBFP samples using fluorometric assays, including GALC, heparan-sulfamidase and a few others. Recently, we reported successful results using dried-leukocytes filter paper (DLFP) samples for heparan sulfamidase and  $\beta$ -galactosidase. Extending these studies, we present now a new GALC assay on these type of samples.

**METHODS:** Adapted leukocyte fluorometric assay was used for the evaluation of GALC in DLFP samples.

**RESULTS:** Our results using this method showed a clear discrimination between GALC levels observed in KD patients and healthy controls.

**CONCLUSIONS:** The assay is robust and reliable and could be adopted by reference laboratories for diagnosis of LSDs. It is expected that the use of DLFP would make it possible to diagnose patients living in isolated areas, where liquid samples usually have to be transported over several days and sometimes across country borders before reaching reference laboratories.

Copyright © 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

**KEYWORDS:** Dried-leukocytes; Enzyme assay; Filter paper samples; Galactocerebrosidase; Krabbe disease; Lysosomal storage diseases

PMID: 25193740 DOI: [10.1016/j.cca.2014.08.029](https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.08.029)

[PubMed - indexed for MEDLINE]

---

<sup>1</sup> Artigo já publicado na **Clin Chim Acta**. 2015 Jan 1;438:178-80. doi: 10.1016/j.cca.2014.08.029. Epub 2014 Sep 3. Fator de impacto, **2.799**, Qualis CAPES Medicina I, **B1**



## ABSTRACT

**Background:** krabbe disease (KD) is an inherited lysosomal storage disease (LSD) caused by the deficiency of galactocerebrosidase (GALC) and is characterized by a severe and progressive leukodystrophy with death frequently before one year of life in the classical early-onset form. As a consequence of the enzyme defect, globoid cells containing undigested galactosylceramide are observed and are characteristic of the disease. Hematopoietic stem cell transplantation is the current treatment for this disease, with some success in the classical cases if performed very early in life. Definitive diagnosis of KD is generally accessed by determination of GALC in Leukocytes or fibroblasts. For the last few years, dried-blood filter paper (DBFP) samples have been increasingly used for lysosomal enzyme assays. Originally, some lysosomal enzymes could not be tested in DBFP samples using fluorometric assays, including GALC, heparan- sulfamidase and a few others. Recently, we reported successful results using dried-leukocytes filter paper (DLFP) samples for heparan-sulfamidase and  $\beta$ -galactosidase. Extending these studies, we present now a new GALC assay on these type of samples.

**Methods:** Adapted leukocyte fluorometric assay was used for the evaluation of GALC in DLFP samples.

**Results:** Our results using this method showed a clear discrimination between GALC levels observed in KD patients and healthy controls.

**Conclusions:** The assay is robust and reliable and could be adopted by reference laboratories for diagnosis of LSDs. It is expected that the use of DLFP would make it possible to diagnose patients living in isolated areas, where liquid samples usually have to be transported over several days and sometimes across country borders before reaching reference laboratories.

**Keywords:** Lysosomal storage diseases; Krabbe disease; Galactocerebrosidase Filter paper samples; Dried-leukocytes; Enzyme assay

## INTRODUCTION

Deficiency of galactocerebrosidase (GALC; EC 3.2.1.46) leads to Krabbe disease (KD), an inherited lysosomal storage disease (LSD), mainly characterized by a severe and progressive leukodystrophy with death frequently before one year of life in the classical early-onset cases. As a consequence of the enzyme defect, globoid cells containing undigested galactosylceramide are observed and are characteristic of the disease. Hematopoietic stem cell transplantation is the current method of treatment for this disease, and is indicated in late-onset cases. There has also been some success in classical cases if performed very early [1]. Definitive diagnosis of KD is generally obtained by the determination of GALC activity in leukocytes or fibroblasts [2,3]. During the last few years, dried-blood filter paper (DBFP) samples were introduced for lysosomal enzyme assays [4-9]. Nevertheless, not all enzymes can be tested using this material and fluorometric assays, including GALC, heparan sulfamidase and a few others. We recently reported a method using dried-leukocytes filter paper (DLFP) samples, for the assay of heparan sulfamidase and  $\beta$ -gactosidase activities [10]. We report further developments of this method for the evaluation of GALC activity, with the aim to have DLFP as an alternative sample for the identification of KD patients.

Abbreviations: LSD, lysosomal storage disease; KD, Krabbe disease; GALC, galactocerebrosidase; DBFP, dried-blood filter paper; DLFP, dried-leukocytes filter paper.

### 1. Material and methods

DLFP and leukocyte samples were obtained from healthy individuals and confirmed KD patients. Informed consent to participate in this study was obtained from all patients (or legally authorized representatives), and healthy controls. Leukocytes from approximately 10 ml of blood were obtained following the procedure of Skoog and Beck [11]. DLFP samples were prepared by diluting a pellet of leukocytes in 500  $\mu$ l of distilled water. The solution was mixed, sonicated on ice bath in a Misonix Sonicator XL2020, with 2 cycles of 25 s, 30-s interval, 7.5–10% intensity, ~ 45 W potency. Aliquots of 20  $\mu$ l were applied to a 13.3 mm diameter disk of filter paper (Whatman SS 903). Samples were dried in a hood for 4 h and stored for a week at room temperature

in a plastic bag with desiccant, and thereafter stored at 4°C until analysis. For all assays, 2×6.0-mm diameter disks of DLFP samples were diluted in 100µl of distilled water and incubated for 30 min at 37°C. At the end of the incubation, samples were centrifuged at 3000 rpm for 10 min at room temperature and, as proteins are soluble in water, 50µl of supernatant was used for protein determination [12]. The rest of the supernatant with filter paper included was used for the enzyme assays. Adapted fluorometric methods were used for the evaluation of GALC and GLB activities [3,13]. Appropriate artificial substrates and dilution and stop buffers were used as described in Table 1 (supplementary material). After incubation, the samples were centrifuged at 3000 rpm for 10 min at room temperature. Fluorescence (excitation, 365 nm; emission, 450 nm) was measured in the supernatant on a Molecular Devices SpectraMax M2 spectroluorometer. Readings were corrected for blanks, and compared with 4-methylumbelliferone calibrators. Methylumbelliferyl substrates were obtained from Moscerdam (GALC) and from Sigma (GLB). Enzyme activities were calculated as nanomoles of substrate hydrolyzed per hour per milligram of protein. Non-parametric Mann-Whitney U test was used to evaluate the differences between controls and patients. A  $p < 0.05$  was considered to be significant. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software in a PC-compatible computer.

## **2. Results and discussion**

The results of the assay of GALC activity in DLFP samples using our method (Fig. 1, and Table 1) showed a clear discrimination between confirmed KD patients and healthy controls. When GALC activities in DLFP and their corresponding leukocyte Samples were compared, it is possible to see a close correlation in the respective KD groups. The healthy control group showed higher values of activities in DLFP, possible due to some degree of protein retention in the filter paper in the dilution process. We did not visualize this effect in the KD samples, probably because the fluorescence of these samples is very low. Nevertheless, the assay in DLFP allowed the correct identification of KD patients in all cases. Additional intra and inter-assay studies showed acceptable values (Table 2, supplementary material). DLFP samples were viable up to one month when stored at 4 °C, as we observed previously [10].

To our knowledge, no reports using DLFP samples for GALC measurement have been published. DBFP samples were successfully used to assay GALC activity with tandem mass spectrometry (TMS), along with other lysosomal enzymes [7–9]. TMS seems to be precise and sensitive, but many diagnostic laboratories cannot afford the cost of the expensive equipment needed (this is not the case of newborn screening laboratories, which run a very large number of samples everyday and have a lower cost per sample). The procedure proposed here could provide an alternative source of enzyme for analysis of GALC activity through a simple fluorometric method, accessible to most clinical pathology laboratories. Also, DLFP samples could be prepared in general biochemical laboratories without major difficulties.

We consider that enzyme assays carried out using DLFP samples should be regarded as a screening method, and, as in the case of DBFP [4–6], it is important to confirm positive cases with assays using leukocytes or fibroblasts. Nevertheless, GALC assays in DLFP, as other assays on DBFP, could be used to rule out KD if the resulting activity is within the normal range.

We should mention that, similar to the fluorometric assay in leucocytes [3], we still have to face the limited affinity of GALC for artificial fluorescent substrates [14,15]. Difficult cases may need to be further investigated with the GALC activity assay using radiolabeled substrate and or genetic analysis of the GALC gene.

Based on our experience, DLFP samples could be used for other biochemical studies and also be a source of DNA for molecular genetic investigations (as the DNA content is higher than that found in DBFP).

It is expected that the possibility of assaying GALC in DLFP samples would enable the investigation of KD in patients located in remote areas, where the shipment of liquid samples usually would take several days before reaching reference laboratories.

We conclude that the assay of GALC on DLFP is a reliable and useful method for the identification of KD. As sample preparation is feasible in standard biochemical laboratories and as transportation is very simple, it could enable patients living in remote areas to be investigated and diagnosed.

## **Acknowledgments**

We are grateful to Dr. Anthony Fensom for the careful review of the manuscript and valuable suggestions. The author also wish to a cknowledge Celio Rafaelli for the administrative and logistic support. This work was partially supported by CAPES/Brazil, PROPESQ/UFRGS, FIPE/HCPA, CNPq/INAGEMP (Grant # 573993/2008-4) and CNPq/Science without Borders (Grant # 313786/2013-5).

## **Appendix A. Supplementary data**

Supplementary data to this article can be found online at:  
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2014.08.029>.

## REFERENCES

- [1] Wenger D, Escolar M, Luzi P, Rafi M. Galactosylceramide lipidosis: globoid cell leukodystrophy (Krabbe disease). In: Scriver CR, Valle D, Beaudet AL, Vogelstein B, Kinzler KW, Antonarakis SE, Ballabio A, editors. **The online metabolic & molecular basis of inherited disease**. 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2012. Disponível em : <<http://dx.doi.org/10.1036/ommbid.178> [[www.ommbid.com](http://www.ommbid.com)]. Acesso: 04 Jan, 2016.
- [2] Svennerholm L, Vanier MT, Hakansson G, Mansson JE. Use of leukocytes in diagnosis of Krabbe disease and detection of carriers. **Clin Chim Acta**, 1981;112: 333–42.
- [3] Wiederschain G, Raghavan S, Kolodny E. Characterization of 6-hexadecanoylamino-4-methylumbelliferyl-beta-D-galactopyranoside as fluorogenic substrate of galactocerebrosidase for the diagnosis of Krabbe disease. **Clin Chim Acta**, 1992;205:87–96.
- [4] Chamoles N, Blanco M, Gaggioli D, Casentini C. Hurler-like phenotype: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. **Clin Chem**, 2001;47:2098–102.
- [5] Civallero G, Michelin K, De Mari J, et al. Twelve different enzyme assays on dried-Blood filter paper samples to detection of patients with selected inherited lysosomal storage diseases. **Clin Chim Acta**, 2006;372:98–102.
- [6] Camelier M, Burin M, De Mari J, Vieira T, Marasca G, Giugliani R. Practical and reliable enzyme test for the detection of mucopolysaccharidosis IVA (Morquio Syndrome type A) in dried blood samples. **Clin Chim Acta**, 2011; 412:1805–8.
- [7] Li Y, Brockmann K, Turecek F, Scott CR, Gelb MH. Tandem mass spectrometry for the direct assay of enzymes in dried blood spots: application to newborn screening for Krabbe disease. **Clin Chem**, 2004;50:638–40.
- [8] Li Y, Scott C, Chamoles N, et al. Direct multiplex assay of lysosomal enzymes in dried blood spots for newborn screening. **Clin Chem**, 2004;50:1785–96.
- [9] Zhang X, Elbin C, Chuang W, et al. Multiplex enzyme assay screening of dried blood spots for lysosomal storage disorders by using tandem mass spectrometry. **Clin Chem**, 2008;54:1725–8.

- [10] Civallero G, De Mari J, Viapiana Camelier M, Burin M, Giugliani R. Assay of heparan-N-sulfamidase in dried leukocytes impregnated in filter paper: a new tool for the identification of mucopolysaccharidosis IIIA and potentially other lysosomal diseases. **Mol Genet Metab**, 2013;108:267–8.
- [11] Skoog W, Beck W. Studies on the fibrinogen, dextran and phytohemagglutinin methods of isolating leukocytes. **Blood**, 1956;11:436–54.
- [12] Lowry O, Rosenbrough N, Farr A, Randall A. Protein measurements with Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, 1951;193:265–75.
- [13] Suzuki K. **Globoid cell leukodystrophy (Krabbe disease) and GM1 gangliosidosis. Practical enzymology of the sphingolipidoses**. New York: Alan R. Liss; 1977.
- [14] Szymańska K, Ługowska A, Laure-Kamionowska M, Bekiesińska-Figatowska M, Gieruszczak-Bia 3 ek D, Musielak M, Eichler S, Giese A, Rolfs A. Diagnostic difficulties in Krabbe disease: a report of two cases and review of literature. **Folia Neuropathol**, 2012;50:346–56.
- [15] Van Diggelen O, Voznyi Y, Keulemans J, et al. A new fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of Niemann–Pick A/B, with specificity of natural sphingomyelinase Substrate. **J Inherit Metab Dis**, 2005;28:733–41.

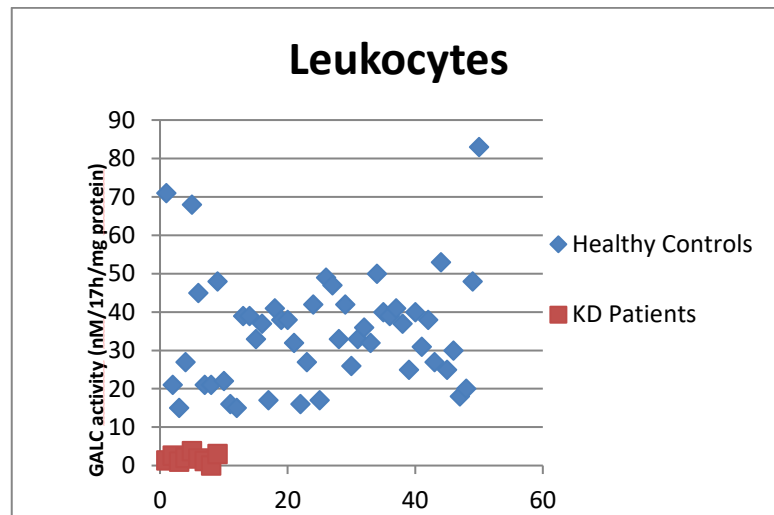
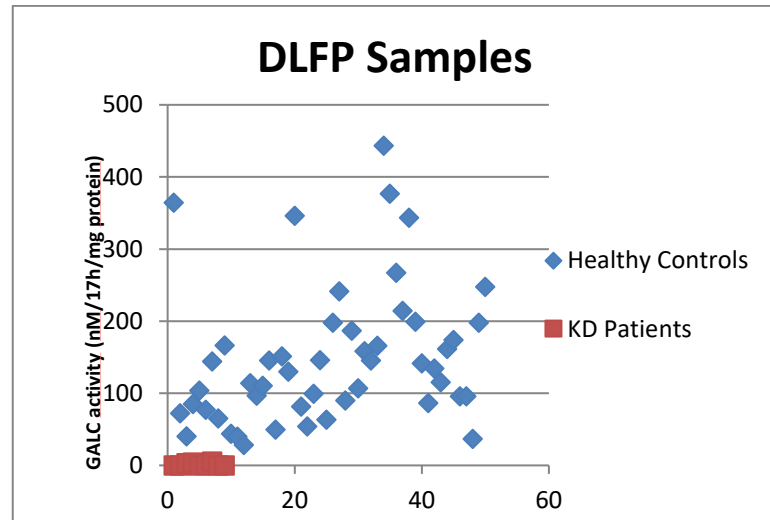


Figure 1: Activity of GALC in DLFP samples and leukocytes from KD patients and healthy controls. Activities are expressed as nanomoles/17h/mg proteins. X-axis represents the N number.



**Table 1: GALC activity in DLFP samples and leukocytes from KD patients and healthy controls.**

	N	Activity (nmol/ 17 hs/ mg protein) range (mean±SD)	P*
DLFP samples			
Krabbe disease patients(a)	10	ND – 5.04 (1.18±1.93)	a:b<0.001
Normal controls (b)	50	28.25 – 443.10 (148.71±95.78)	
Leukocytes			
Krabbe disease patients (c)	10	ND – 5.10 (2.20±1.48)	c:d<0.001
Normal controls (d)	50	14.00 – 83.00 (34.98±14.50)	

\* Correspond to an asymptotic significance (2 - tailed) from Mann - witney U test. ND: not detected.

**Table 2: Incubation conditions for lysosomal enzyme assays in DLFP samples.**

<b>Enzyme</b>	<b>Elution Liquid and Substrate</b>	<b>Incubation Time and Temperature</b>	<b>Stop Buffer</b>
<b>GALC</b>	<u>Incubation 1</u> - 2x6 mm DLFP in 100µl of distilled water	<u>Incubation 1</u> 30 minutes; 37°C with gently shaking	- 500 µL of 0.5M Sodium carbonate/ 0.5 M sodium bicarbonate with 0.25% Triton X-100, pH 10.7
	<u>Incubation 2</u>  - 50 µL of supernatant from DLFP samples. - 100 µL of 0.57 mM 6-Hexadecanoylamino-4-methylumbelliferyl-beta-D-galactoside, 0.4 % sodium taurocholate, 0.13 % oleic acid in McIlvain's phosphate buffer / 0.1 M citric acid, 0.2 M sodium phosphate, 0.02 % sodium azide, pH 5.2.	<u>Incubation 2</u>  - 17 hours; 37°C without shaking.	
<b>GLB</b>	<u>Incubation 1</u> - 2x6 mm DLFP in 100µl of distilled water	<u>Incubation 1</u> 30 minutes; 37°C with gently shaking	- 1000 µL of 0.5 M glycine-NaOH, pH 10.3
	<u>Incubation 2</u>  - 50 µL of supernatant from DLFP samples. - 80 µL of 0.05 M citrate phosphate buffer, pH 4.4 in 45 g/l NaCl. - 40 µL of 0.8 mM 4-methylumbelliferyl-β-D-galactoside in distilled water.	<u>incubation 2</u> - 3 hours; 37°C with gently shaking.	

**Table 3: Intra and inter- assay CVs values for GALC in DLFP samples (from normal subjects).**

---

<b>ENZYME</b>	<b>INTRA-ASSAY CVs (%)</b>	<b>INTER-ASSAY CVs (%)</b>
<b>GALC</b>	9.68 ( N = 10 )	12.63 ( N = 10 )

---

## 8 ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS 2<sup>2</sup>

*Clin Chim Acta*, 2015 Jun 15;446:218-20. doi: 10.1016/j.cca.2015.04.034. Epub 2015 May 2.

### **Extended use of dried-leukocytes impregnated in filter paper samples for detection of Pompe, Gaucher, and Morquio A diseases.**

Camelier M<sup>1</sup>, De Mari J<sup>2</sup>, Burin M<sup>2</sup>, Civallero G<sup>3</sup>, Giugliani R<sup>4</sup>.

#### ⊕ Author information

#### **Abstract**

**BACKGROUND:** Lysosomal storage diseases (LSD) are a group of genetic conditions which could present a vast spectrum of abnormalities that may include skeletal abnormalities, organ dysfunction, neuronal involvement, and tissue accumulation of complex molecules, among other manifestations. Definitive diagnosis of LSD is generally obtained by specific enzyme assays performed in leukocytes, fibroblasts, or more recently, dried-blood filter paper (DBFP) samples.

**METHODS:** We recently introduced dried-leukocytes filter paper (DLFP) as an alternative source of enzyme to assay heparan sulfamidase and galactocerebrosidase activities, which could not be measured in DBFP samples using fluorometric methods. We present a new fluorometric methods on DLFP samples, for evaluation of  $\alpha$ -glucosidase (GAA),  $\beta$ -glucosidase (GBA), and N-acetylgalactosamine-6-sulfatase (GALNS) activities, key enzyme assays for the identification of patients with Pompe disease (PD), Gaucher disease (GD), and Morquio A disease (MD), respectively.

**RESULTS:** We show a clear discrimination between confirmed PD, GD, and MD patients and healthy controls.

**CONCLUSIONS:** We conclude that the assays of GAA, GBA, and GALNS on DLFP are reliable and useful methods for the identification of PD, GD, and MD diseases, respectively. As sample preparation is feasible in standard biochemical laboratories and transportation is very simple, it could enable patients living in remote areas to be investigated, diagnosed and eventually treated with the specific therapies available for these diseases.

Copyright © 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

**KEYWORDS:** Dried-leukocytes; Enzyme assay; Gaucher disease; Lysosomal storage diseases; Morquio A disease; Pompe disease

PMID: 25944767 DOI: [10.1016/j.cca.2015.04.034](https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.04.034)

---

<sup>2</sup> Artigo já publicado na *Clin Chim Acta*. 2015 Jun 15;446:218-20. doi: 10.1016/j.cca.2015.04.034. Epub 2015 May 2. Fator de impacto, 2.799, Qualis CAPES Medicina I, B1

## 1. Introduction

Lysosomal storage diseases (LSDs) are a group of genetic conditions presenting a vast spectrum of abnormalities that may include skeletal abnormalities, organ dysfunction, neuronal involvement, and tissue accumulation of complex molecules among other manifestations [1]. Once the clinical suspicion of one of these diseases is raised, a definitive diagnosis of LSDs is generally obtained by specific enzyme assays performed in leukocytes, fibroblasts, or, more recently, in dried-blood filter paper (DBFP) samples [2-4]. We recently introduced dried-leukocytes filter paper (DLFP) as an alternative source of enzyme for the assay of heparan sulfamidase and galactocerebrosidase, enzymes which could not be tested in DBFP samples using fluorometric methods [5,6]. Extending these studies, we present here new fluorometric methods on DLFP samples, for evaluation of  $\alpha$ -glucosidase (GAA),  $\beta$ -glucosidase (GBA), and N-acetylgalactosamine-6-sulfatase (GALNS) activities, key enzyme assays for the identification of patients with Pompe disease (PD), Gaucher disease (GD), and Morquio A disease (MD), respectively.

## 2. Material and methods

DLFP and leukocyte samples were obtained from healthy individuals and confirmed PD, GD, and MD patients. Informed consent to participate in this study was obtained from all patients and from healthy control individuals (or from legally authorized representatives). Leukocytes from approximately 10 ml of blood were obtained following the procedure of Skoog and Beck [7]. DLFP samples were prepared by diluting a pellet of leukocytes in 500  $\mu$ L of distilled water. The solution was mixed, sonicated on an ice bath in a Misonix Sonicator XL2020, with two cycles of 25 seconds, 30 seconds interval, 7.5-10% intensity, ~ 45W potency. Aliquots of 20  $\mu$ L were applied to a 13.3 mm diameter disk of filter paper (Whatman SS 903). Samples were left to dry in a hood for 4 h and stored for a week at room temperature in a plastic bag with desiccant, and thereafter stored at 4°C until analysis. For all assays, 2  $\times$  6.0-mm diameter disks of DLFP samples were diluted in 100  $\mu$ L of distilled water and incubated for 30 minutes at 37°C. At the end of the incubation, samples were centrifuged at 3000 rpm for 10 min at room temperature and, as proteins are soluble

in water, 50  $\mu$ L of supernatant was used for protein determination [8]. The rest of the supernatant with filter paper included was used for the enzyme assays.

Adapted fluorometric methods were used for the evaluation of GAA, GBA, and GALNS [9-11] activities. An adapted assay [12] was used to measure  $\beta$ -galactosidase as reference enzyme and performed as described in Camelier et al.,2014 [6]. Appropriate artificial substrates and dilution and stop buffers were used as described in Table 1S (supplementary materials). After incubation, the samples were centrifuged at 3000 rpm for 10 min at room temperature. Fluorescence (excitation, 365 nm; emission, 450 nm) was measured in the supernatant on a Molecular Devices SpectraMax M2 spectrofluorometer. Readings were corrected for blanks, and compared with 4-methylumbelliferone calibrators. Methylumbelliferyl substrates for GAA and GBA and acarbose were from Sigma, and GALNS substrate was from Moscerdam. Enzyme activities were calculated as nanomol/h/mg (17h in the case of GALNS). Non-parametric Mann–Whitney U test was used to evaluate the differences between controls and patients. A  $p < 0.05$  was considered significant. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software in a PC-compatible computer.

### **3.Results and discussion**

The GAA, GBA, and GALNS activities were measured in DLFP samples, and the results obtained showed a clear discrimination between confirmed PD, GD, and MD patients and healthy controls (Fig. 1, and Table 1). The level of discrimination between the patients and control groups was similar to that obtained with their corresponding standard leukocyte samples. Additional intra and inter-assay studies showed acceptable reproducibility of the enzyme assays, with CVs < 10 and 20%, respectively (Table 2S, supplementary materials). DLFP samples were stable up to one month when stored at 4°C. The new enzyme assays presented here, already assayed in DBFP samples [2-4], increase the spectrum of lysosomal enzymes that could be tested in DLFP samples. In fact, the test in DBPF is not considered sufficient for the diagnosis, and confirmation in leucocytes is usually requested for the diagnosis. However, sometimes it is difficult to send liquid blood samples from remote areas to

reference laboratories, making the tests in leukocytes very challenging. So, a test in dried leukocytes could bring an additional support for the diagnosis and, if validated by further studies, could possibly replace the need of liquid blood for a diagnostic confirmation of these diseases. DLFP samples can be prepared in general biochemical laboratories without major difficulties and they can be easily mailed in the same way as the DBFP samples. At the same time, the assays on these samples have the same incubation times as the leukocytes assays. An additional advantage of DLFP samples is the absence of hemoglobin, a compound that interferes with fluorescence readings in DBFP samples [13]. Because of its high cellular content, DLFP could also be an excellent and complementary sample for measurement of specific metabolites by tandem mass spectrometry [14], micro fluorometric enzyme assays [15], and CRIM status determination [16], between other analytical procedures. Moreover, the method is applicable for use with other types of cell lysate such as fibroblasts, amniocytes, or any other kind of homogenate.

These could be applied to the filter paper in the same way as leukocyte lysates and then forwarded to a reference laboratory for testing.

We conclude that the assay of GAA, GBA, and GALNS in DLFP are reliable and useful methods for the identification of PD, GD, and MD diseases, respectively. As sample preparation is feasible in standard biochemical laboratories and as transportation is very simple, it could enable patients living in remote areas to be investigated, diagnosed and eventually treated with the specific therapies available for these diseases.

### **Acknowledgments**

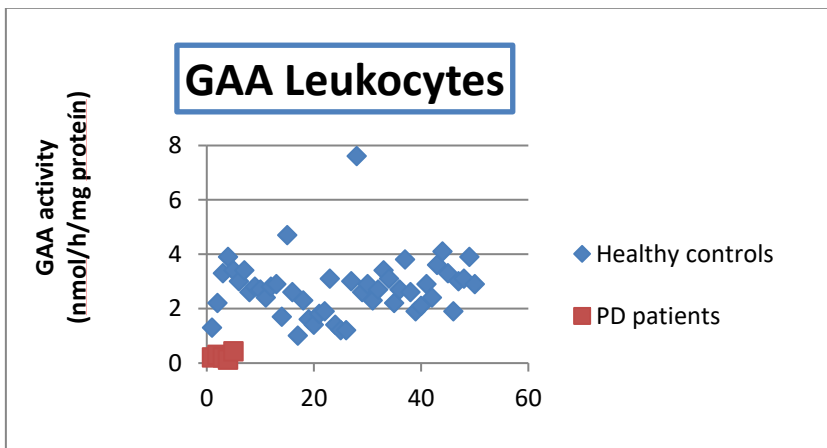
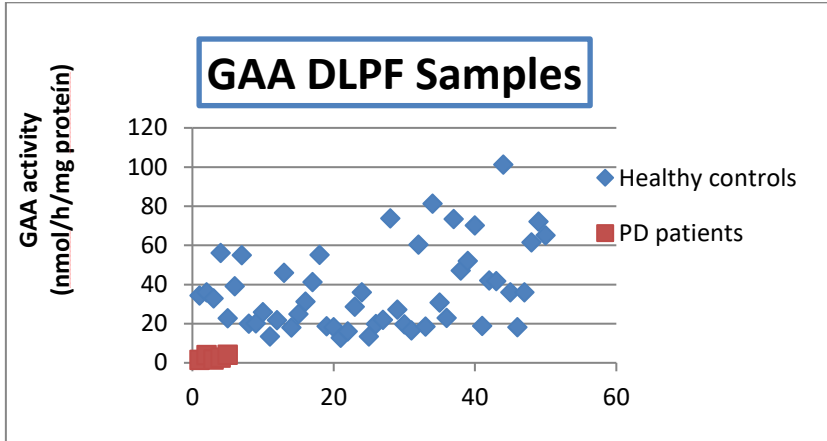
We are grateful to Dr Antony Fensom for the careful review of the manuscript and valuable suggestions. The authors also wish to acknowledge Celio Rafaelli for the administrative and logistic support. This work was partially supported by CAPES/Brazil, PROPESQ/UFRGS, FIPE/HCPA, CNPq/INAGEMP (Grant # 573993/2008-4) and CNPq/Science without Borders (Grant # 313786/2013-5)

## REFERENCES

- [1] Lysosomal disorders. In: Scriver CR, Valle D, Beaudet AL, Vogelstein B, Kinzler KW, Antonarakis SE, Ballabio A, eds. *The Online Metabolic & Molecular Basis of Inherited Disease*, 8th ed. [www.ommbid.com](http://www.ommbid.com). New York:McGraw-Hill; 2012. DOI: 10.1036/ommbid.178.
- [2] Chamoles N, Blanco M, Gaggioli D, Casentini C. Hurler-like phenotype: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. **Clin Chem**, 2001; 47:2098-102.
- [3] Civallero G, Michelin K, De Mari J, Viapiana M, Burin M, Coelho J, Giugliani R. Twelve different enzyme assays on dried-blood filter paper samples to detection of patients with selected inherited lysosomal storage diseases. **Clin.Chim Acta**, 2006; 372:98-102.
- [4] Camelier M, Burin M, De Mari J, Vieira T, Marasca G, Giugliani R. Practical and reliable enzyme test for the detection of Mucopolysaccharidosis IVA (Morquio Syndrome type A) in dried blood samples. *Clin Chim Acta* 2011;412:1805-08.
- [5] Civallero G, De Mari J, Viapiana Camelier M, Burin M, Giugliani R. Assay of Heparan-N-Sulfamidase in Dried Leukocytes Impregnated in Filter Paper: A New Tool for the Identification of Mucopolysaccharidosis IIIA and Potentially Other Lysosomal Diseases. **Mol Gen Metab**, 2013; 108:267-68.
- [6] Camelier M, Civallero G, De Mari J, Burin M, Giugliani R. Galactocerebrosidase assay on dried-leukocytes impregnated in filter paper for the detection of Krabbe disease. **Clin Chim Acta**, 2014 Sep 3;438C:178-180. doi: 10.1016/j.cca.2014.08.029.
- [7] Skoog W, Beck W, Studies on the fibrinogen, dextran and phytohemagglutinin methods of isolating leukocytes. **Blood**, 1956; 11:436-54.
- [8] Lowry O, Roseborough N, Farr A, Randall A. Protein measurement with Folin phenol reagent. **J. Biol Chem**, 1951; 193:265-75.
- [9] Li Y, Scott C, Chamoles N, Ghavami A, Pinto B, Turecek F, Gelb M. Direct Multiplex Assay of Lysosomal Enzymes in Dried Blood Spots for Newborn Screening. **Clin Chem**, 2004; 50:1785–1796.



- [10] Peters S, Coyle P, Glew R. Differentiation of betaglucocerebrosidase from beta-glucosidase in human tissues using sodium taurocholate. **Arch Biochem Biophys**, 1976; 175:569-71.
- [11] Van Diggelen OP, Zhao H, Kleijer WJ, et al. A fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of Morquio disease type A. (MPS IV A). **Clin Chim Acta**, 1990; 187:131-40.
- [12] Suzuki K. **Globoid Cell Leukodystrophy (Krabbe Disease) and GM1 Gangliosidosis. Practical Enzymology of the Sphingolipidoses**. Alan R. Liss, New York, 1977.
- [13] Oemardien LF, Boer AM, Ruijter GJG, Ploeg, ATV, De Klerk, JBC, Reuser AJJ, et al. Hemoglobin precipitation greatly improves 4-methylumbelliferone based diagnostic assays for lysosomal storage diseases in dried blood spots. **Mol Genet Metab**, 2011; 102:44-48.
- [14] Matern D, Oglesbee D, Tortorelli S. Newborn Screening for Lysosomal Storage Disorders and Other Neuronopathic Conditions. **Dev Disabil Res Rev**. 2013; 17:247-253.
- [15] Sista R, Wang T, Wu N, Graham C, et al. Multiplex newborn screening for Pompe, Fabry, Hunter, Gaucher, and Hurler diseases using a digital microfluidic platform. **Clin Chim Acta**, 2013; 424:12-18.
- [16] Wang Z, Okamoto P, Keutzer J. A new assay for fast, reliable CRIM status determination in infantile-onset Pompe disease. **Mol Genet Metab**, 2014; 111:92-100.



**Fig. 1: Enzyme activity in DLFP samples and leukocytes from Pompe patients and healthy controls. Activities are expressed as nanomol/h/mg protein. X- axis represents the N number.**

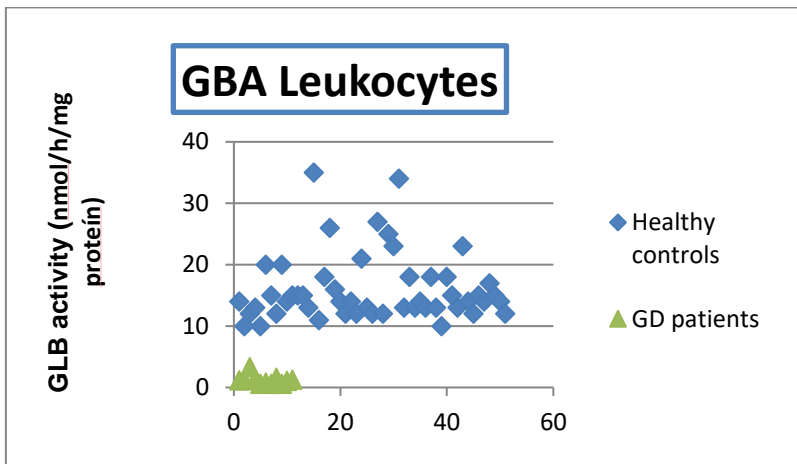
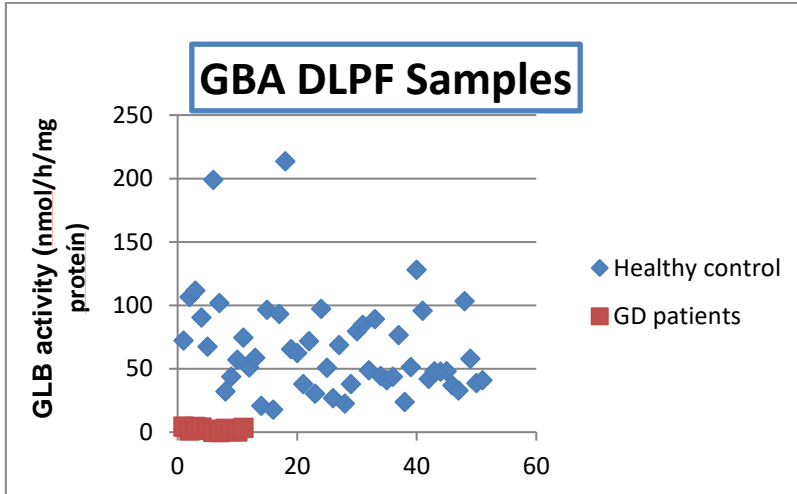
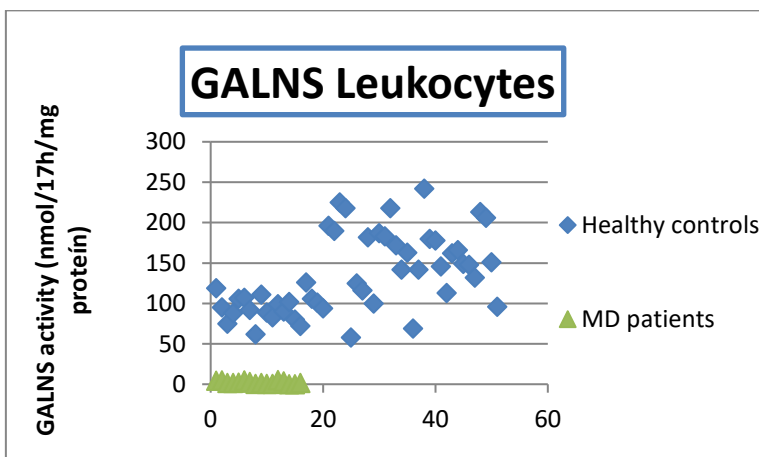
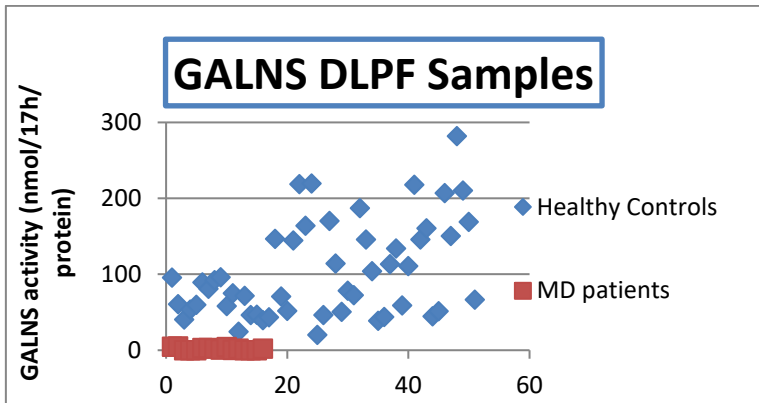


Fig. 2: Enzyme activity in DLPF samples and leukocytes from Gaucher patients and healthy controls. Activities are expressed as nanomol/h/mg protein. X-axis represents the N number.



**Fig. 3: Enzyme activity in DLFP samples and leukocytes from Morquio A patients and healthy controls. Activities are expressed as nanomol/17h/mg protein. X-axis represents the N number.**

**Tab. 1: Enzyme activity in DLFP samples and leukocytes from LSDs patients, and healthy controls.**

	<b>N</b>	<b>Activity</b> range (mean $\pm$ SD)	<b>p*</b>
<b><u>GAA</u></b>			
(nmol/h/mg protein)			
<b>DLFP</b>			
PD Patients(a)	5	1.47 – 4.10 (2.77 $\pm$ 1.14)	a:b <0.001
Normal Controls (b)	50	12.75 – 101.20 (37.32 $\pm$ 21.04)	
<b>Leukocytes</b>			
PD Patients(c)	5	0.12 – 0.43 (0.25 $\pm$ 0.07)	c:d <0.001
Normal Controls (d)	50	1.00 – 7.60 (2.73 $\pm$ 1.08)	
<b><u>GBA</u></b>			
(nmol/h/mg protein)			
<b>DLFP</b>			
GD Patients(a)	11	ND – 4.22 (2.02 $\pm$ 1.57)	a:b <0.001
Normal Controls (b)	51	17.75 – 213.60 (66.26 $\pm$ 39.20)	
<b>Leukocytes</b>			
GD Patients(c)	11	0.60 – 3.30 (1.24 $\pm$ 0.70)	c:d <0.001
Normal Controls (d)	51	10.00 – 35.00 (16.02 $\pm$ 5.53)	
<b><u>GALNS</u></b>			
(nmol/17h/mg protein)			
<b>DLFP</b>			
MD Patients(a)	16	ND – 4.73 (1.61 $\pm$ 1.77)	a:b <0.001
Normal Controls (b)	51	20.11 – 281.70 (103.5 $\pm$ 62.93)	
<b>Leukocytes</b>			
MD Patients(c)	16	ND – 5.20 (2.23 $\pm$ 1.70)	c:d <0.001
Normal Controls (d)	51	58.00 – 242.00 (134.61 $\pm$ 48.57)	

\* Correspond to an asymptotic significance (2-tailed) from Mann-Whitney U test. ND: not detected.

Tab. 2: Incubation conditions for lysosomal enzyme assays in DLFP samples.

Enzyme	Elution Liquid and Substrate	Incubation Time and Temperature	Stop Buffer
<b>GAA</b>	<u>Incubation 1</u> - 2 x 6mm DLFP in 100 µL of distilled water	<u>Incubation 1</u> - 30 minutes; 37°C with gently shaking	- 1000 µL of 0.5 M glycine-NaOH, pH 10
	<u>Incubation 2</u> - 50 µL of incubation 1 supernatant - 100 µL of working solution (WS)	<u>Incubation 2</u> - 20 hours; 37°C with gently shaking	
	WS: 120 uL of substrate buffer (SB), 30 uLacarbose 8M in distilled water and 2.9 mL of citrate phosphate buffer 0.2 mM, pH 4.0 with triton X-100 0.6 g/l (fresh) SB: 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-glicosideo 10 mM in 0.24 mL of citrate phosphate buffer 0.2 M pH 4.0 with triton X-100 0.6 g/L.		
<b>GBA</b>	<u>Incubation 1</u> - 2 x 6mm DLFP in 100 µL of citrate-phosphate buffer 0.54M, pH 5.5	<u>Incubation 1</u> - 30 minutes; 37°C with gently shaking	- 1000 µL of 0.5 M glycine-NaOH, pH 10
	<u>Incubation 2</u> - 50 µL of incubation 1 supernatant - 100 µL of 4-metilumbeliferil $\beta$ -D-glycoside 10mM + sodium taurodeoxycolate 50mM in distilled water	<u>Incubation 2</u> - 2 hours; 37°C with gently shaking	

**GALNS**Incubation 1

- 2 x 6mm DLPF in 100  $\mu$ L of distilled water

Incubation 2

- 50  $\mu$ L of incubation 1 supernatant  
 - 100  $\mu$ L of MU-BGAL-6S.NH<sub>4</sub> 10mM in sodium acetate 0.1M/ ácidoacético 0.1M pH 4.3, with NaCl 0.1 M, sodium azide 0.02% and lead acetate 5mM

Incubation 3

- 25  $\mu$ L of sodium phosphate 0.9M pH 4.3 with 0.02% sodium azide  
 - 50  $\mu$ L of 10U  $\beta$ -galactosidase / mL of BSA 0.2% in distilled water

Incubation 1

- 30 minutes;  
 37°C with gently shaking

Incubation 2

- 17 hours;  
 37°C with gently shaking

Incubation 3

- 2 hours;  
 37°C with gently shaking

- 500  $\mu$ L of 0.5 M Sodium carbonate/ 0.5 M sodium bicarbonate with 0.025% Triton X-100, pH 10.7

**Tab. 3: Intra and inter-assay CVs values for lysosomal enzymes in DLFP samples (from normal subjects).**

<b>Enzyme</b>	<b>Intra-assay CV (%)</b>	<b>Inter-assay CV (%)</b>
<b>GAA</b>	8,91 (N = 8)	15,95 (N = 3)
<b>GBA</b>	10,53 (N = 6)	10,74 (N = 4)
<b>GALNS</b>	8,25 (N = 6)	13,81 (N = 6)



## 9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora o método que utiliza amostras de SIPF para a identificação de DLs esteja disponível, algumas dessas doenças ainda não podem ser detectadas neste tipo de amostra, através do método fluorimétrico, como é o caso da doença de Krabbe e algumas outras DLs. Mesmo quando é possível determinar a atividade da enzima em SIPF, a confirmação dos resultados alterados deve ser realizada em amostras de leucócitos. A dificuldade em relação ao envio de amostras líquidas de áreas remotas, às vezes em outro país, para laboratórios de referência, torna os testes em leucócitos um grande desafio.

Os resultados do presente estudo permitem concluir que a utilização de amostras de LIPF para a identificação bioquímica das DLs estudadas, é viável de ser incorporado aos laboratórios de referência, pois mostraram uma clara discriminação entre os pacientes com Doença de Krabbe, MPS IVA, Doença de Gaucher e Doença de Pompe, e controles saudáveis. O nível de discriminação entre os pacientes e o grupo controle foi similar ao obtido com as correspondentes amostras de leucócitos, sendo o novo método confiável para a identificação bioquímica das DLs, tornando mais fácil e prático o diagnóstico de pacientes que vivem em áreas de difícil acesso, de onde as amostras líquidas necessitam ser transportadas, geralmente por diversos dias, até chegar aos laboratórios de referência. Além disso, amostras de LIPF apresentam uma vantagem em relação às amostras de SIPF por não apresentarem hemoglobina, um componente que interfere na leitura da fluorescência das amostras de SIPF.

Os testes de estabilidade das amostras de LIPF para os ensaios enzimáticos das respectivas enzimas, mostraram que, quando mantidas a 4°C, as amostras ficam estáveis por pelo menos 30 dias.

Acreditamos que o teste em LIPF poderá aumentar o espectro de enzimas lisossômicas testadas e tornar-se um suporte adicional para o diagnóstico das DLs. Se validado através de mais estudos, poderá eventualmente substituir a necessidade de envio de amostras líquidas para a confirmação do diagnóstico dessas doenças. Esta nova alternativa poderá contribuir para um diagnóstico mais precoce desses pacientes, proporcionando melhores resultados com as medidas de tratamento disponíveis para muitas DLs.

## 10 ANEXOS

### ANEXO 1: Carta de aprovação do projeto de pesquisa



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO CIENTÍFICA

A Comissão Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre analisou o projeto:

**Projeto:** 130070

**Data da Versão do Projeto:**

**Pesquisadoras:**


ROBERTO GIUGLIANI  
MAIRA GRAEFF BURIN  
KRISTIANE MICHELAN TIRELLI  
MARLI TERESINHA VIAPIANA CAMELIER  
GABRIEL EDUARDO SANTIAGO GIVALLERO  
FERNANDA BENDER  
GIORGIA DE SOUZA MARAÇA

**Título:** AVALIAÇÃO DO USO DE AMOSTRAS DE LEUCÓCITOS IMPREGNADAS EM PAPEL FILTRO PARA O DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS LISOSSÔMICAS DE DEPÓSITO

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.  
Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG)

Porto Alegre, 10 de junho de 2013.

  
Prof. José Roberto Goldim  
Coordenação CEP/HCPA

**ANEXO 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Pacientes  
(TCLE)**

**AVALIAÇÃO DO USO DE AMOSTRAS DE LEUCÓCITOS  
IMPREGNADAS EM PAPEL FILTRO PARA O DIAGNÓSTICO DE  
DOENÇAS LISOSSÔMICAS DE DEPÓSITO**

**Pesquisador Responsável: Dr. Roberto Giugliani.** Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, que está à disposição para esclarecimentos pelo telefone (51) 33598011.

**Paciente:** \_\_\_\_\_

Prezado paciente ou responsável,

As Doenças Lisossômicas de Depósito (DLDs) são doenças genéticas, que fazem parte de um grupo chamado de Erros Inatos do Metabolismo (EIM), são causadas pela deficiência de enzimas lisossômicas, envolvidas na degradação, armazenamento e transporte de moléculas biológicas. Destacamos neste estudo, cinco doenças: Gangliosidose GM1, onde a enzima deficiente é a B- galactosidase; Doença de Gaucher, onde a enzima deficiente é a B-glicosidase; Síndrome de Morquio A (MPS IVA), onde a enzima deficiente é a Galactose-6- sulfatase; Doença de Pompe, onde a enzima deficiente é a  $\alpha$ -glicosidase e a Síndrome de Sanfilippo A (MPS IIIA), onde a enzima deficiente é a heparan sulfamidase. Os sintomas são variáveis para cada doença e para cada indivíduo, os principais aspectos clínicos observados são:

- Mucopolissacaridose: Doença crônica e progressiva, com baixa estatura, retardo de crescimento, face com raiz nasal baixa, podendo apresentar deformidade das mãos.
- Doença de Gaucher: Dor óssea, que pode ser acompanhada de febre e calor e aumento do fígado e baço, que podem levar à distensão abdominal.
- Doença de Pompe: Fraqueza muscular e hipotonia, aumento do fígado e coração.

- Gangliosidose GM1: Retardo de crescimento, hipotonia, aumento do fígado e baço. A face é característica, com raiz nasal baixa, maxilar proeminente e hirsutismo.

Para algumas destas doenças, o tratamento através da terapia de reposição enzimática (TRE) está disponível, com infusões quinzenais, como é o caso da Doença de Pompe e Doença de Gaucher. Para a MPS IVA, a TRE está em desenvolvimento clínico de fase III (segurança). Para a GM1 e MPS IIIA, atualmente, o tratamento é sintomático.

O objetivo deste projeto é desenvolver, validar e tornar disponível um novo método, que pode ser mais simples e seguro, para o diagnóstico laboratorial das doenças lisossômicas de depósito (DLDs). Serão convidados a participar todos os pacientes com DLDs, atendidos no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SGM-HCPA), Centro de Referência para Diagnóstico, Acompanhamento e Tratamento dessas doenças. O paciente que aceitar participar dessa pesquisa:

- 1) Fará uma entrevista, onde explicaremos o termo de consentimento livre e esclarecido e alguns detalhes da pesquisa.
- 2) Após a entrevista, será realizada uma coleta de sangue periférico, no braço esquerdo, sempre que possível. Esta coleta é igual às coletas realizadas para exames de rotina em outros laboratórios. Todo este processo de entrevista e coleta de sangue terá duração máxima de 30 minutos. A coleta de sangue será feita por um dos pesquisadores envolvidos no estudo. O material utilizado para a coleta será descartável e o volume máximo de sangue coletado será de 10 ml.
- 3) **Desconfortos ou riscos esperados:** O risco associado à coleta de sangue é pequeno. Porém, pode haver desconforto no local da punção, tal como: Formação de hematoma (coloração roxa da pele) e pequeno sangramento.
- 4) **Benefícios que poderão ser obtidos:** Você não terá nenhum custo ou qualquer compensação financeira. Porém, os procedimentos aos quais os participantes do estudo serão submetidos poderão gerar novos conhecimentos científicos com conseqüente melhoria do diagnóstico e tratamento aos pacientes.

- 5) **Confidencialidade:** As suas informações serão confidenciais e sua privacidade será assegurada, uma vez que seu nome será substituído por um número (exemplo: paciente 1, paciente 2 e assim de forma seqüencial). O material coletado será de uso EXCLUSIVO para esta pesquisa. Os resultados desta pesquisa serão divulgados em conjunto, sem que apareça o nome dos participantes. Os resultados poderão ser divulgados em eventos e /ou revistas científicas. Os resultados do estudo estarão disponíveis e você poderá ter acesso a eles, através do contato com o pesquisador responsável.
- 6) **Liberdade de abandonar a pesquisa sem prejuízo:** Sua participação no estudo é voluntária. Se você decidir não participar do estudo, isto não afetará a qualidade no atendimento oferecido pela equipe médica do hospital. Caso queira retirar-se desta pesquisa, estará livre para se retirar em qualquer momento que desejar.

7) **Esclarecimento de dúvidas:**

O pesquisador responsável por esse projeto é o Dr. Roberto Giugliani, que está à disposição no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre para esclarecimentos pelo telefone (51) 33598011.

Caso você necessite de algum esclarecimento ético, poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, através do telefone: (51) 33597640, no horário das 8-12hs e das 13h30min às 17 hs.

Pelo presente termo, você declara que foi informado (a), de forma clara e detalhada sobre a presente pesquisa, e que teve suas dúvidas esclarecidas por \_\_\_\_\_ . Declara ter sido esclarecido que não receberá nenhuma remuneração financeira pela participação no estudo. Declara que foi informado da garantia de confidencialidade e que sua privacidade será preservada, bem como da liberdade de não participar do estudo e da possibilidade de desistir, em qualquer momento, da participação. Além disso, declara que recebeu cópia deste termo de consentimento.

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

Nome do Paciente: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Responsável legal: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Eu expliquei a \_\_\_\_\_ os objetivos, riscos, benefícios e procedimentos necessários para esta pesquisa, e entreguei cópia deste termo de consentimento para o mesmo.

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

Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

**ANEXO 3: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Controles  
(TCLE)**

**AVALIAÇÃO DO USO DE AMOSTRAS DE LEUCÓCITOS  
IMPREGNADAS EM PAPEL FILTRO PARA O DIAGNÓSTICO DE  
DOENÇAS LISSOSSÔMICAS DE DEPÓSITO**

**Pesquisador Responsável: Dr. Roberto Giugliani.** Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, que está à disposição para esclarecimentos pelo telefone (51) 33598011.

**Nome:** \_\_\_\_\_

Prezado (a),

Esta pesquisa está sendo realizada para avaliar a possibilidade do uso de amostras de leucócitos impregnadas em papel filtro como um novo método de diagnóstico bioquímico para as doenças lisossômicas de depósito (DLDs). Para realizar este estudo, necessitamos comparar amostras de pacientes com a doença e pessoas sem a doença. Você está sendo convidado(a) para fazer parte desta pesquisa como controle normal (sem a doença).

As Doenças Lisossômicas de Depósito (DLDs) são doenças genéticas, que fazem parte de um grupo chamado de Erros Inatos do Metabolismo (EIM), são causadas pela deficiência de enzimas lisossômicas, envolvidas na degradação, armazenamento e transporte de moléculas biológicas. Destacamos neste estudo, cinco doenças: Gangliosidose GM1, onde a enzima deficiente é a B- galactosidase; Doença de Gaucher, onde a enzima deficiente é a B-glicosidase; Síndrome de Morquio A (MPS IVA), onde a enzima deficiente é a Galactose-6- sulfatase; Doença de Pompe, onde a enzima deficiente é a  $\alpha$ -glicosidase e a Síndrome de Sanfilippo A (MPS IIIA), onde a enzima deficiente é a heparan sulfamidase. Os sintomas são variáveis para cada doença e para cada indivíduo, os principais aspectos clínicos observados são:

- Mucopolissacaridose: Doença crônica e progressiva, com baixa estatura, retardo de crescimento, face com raiz nasal baixa, podendo apresentar deformidade das mãos.

- Doença de Gaucher: Dor óssea, que pode ser acompanhada de febre e calor. Aumento do fígado e baço, que podem levar à distensão abdominal.
- Doença de Pompe: Fraqueza muscular e hipotonia, aumento do fígado e coração.
- Gangliosidose GM1: Retardo de crescimento, hipotonia, aumento do fígado e baço. A face é característica, com raiz nasal baixa, maxilar proeminente e hirsutismo.

Para algumas destas doenças, o tratamento através da terapia de reposição enzimática (TRE) está disponível, com infusões quinzenais, como é o caso da Doença de Pompe e Doença de Gaucher. Para a MPS IVA, a TRE está em desenvolvimento clínico de fase III (segurança). Para a GM1 e MPS IIIA, atualmente, o tratamento é sintomático.

O objetivo deste projeto é desenvolver, validar e tornar disponível um novo método, que pode ser mais simples e seguro, para o diagnóstico laboratorial das doenças lisossômicas de depósito (DLDs).

Serão convidados a participar deste estudo, indivíduos hígidos, de ambos os sexos e com mais de 18 anos. O indivíduo que aceitar participar dessa pesquisa:

- 1) Fará uma entrevista, onde explicaremos o termo de consentimento livre e esclarecido e alguns detalhes da pesquisa.
- 2) Após a entrevista, será realizada uma coleta de sangue periférico, no braço esquerdo, sempre que possível. Esta coleta é igual às coletas realizadas para exames de rotina em outros laboratórios. Todo este processo de entrevista e coleta de sangue terá duração máxima de 30 minutos. A coleta de sangue será feita por um dos pesquisadores envolvidos no estudo. O material utilizado para a coleta será descartável e o volume máximo de sangue coletado será de 10 ml.
- 3) Desconfortos ou riscos esperados: O risco associado à coleta de sangue é pequeno. Porém, pode haver desconforto no local da punção, tal como: Formação de hematoma (coloração roxa da pele) e pequeno sangramento.



4) **Benefícios que poderão ser obtidos:** Você não terá nenhum custo ou qualquer compensação financeira, pela sua participação nesta pesquisa.

5) **Confidencialidade:** As suas informações serão confidenciais e sua privacidade será assegurada, uma vez que seu nome será substituído por um número de forma aleatória, ou seja, você será identificado somente por um número (exemplo: controle 1, controle 2, e assim de forma seqüencial). O material coletado será de uso EXCLUSIVO para esta pesquisa. Os resultados desta pesquisa serão divulgados em conjunto, sem que apareça o nome dos participantes. Os resultados poderão ser divulgados em eventos e / ou revistas científicas. Os resultados do estudo estarão disponíveis e você poderá ter acesso a eles através do contato com o pesquisador responsável.

6) **Liberdade de abandonar a pesquisa sem prejuízo:** Sua participação no estudo é voluntária. Se você decidir não participar do estudo, isso não afetará a qualidade no atendimento oferecido pela equipe médica do hospital. Caso queira retirar-se desta pesquisa, estará livre para se retirar em qualquer momento que desejar.

7) **Esclarecimento de dúvidas:** O pesquisador responsável por este projeto é o Dr. Roberto Giugliani, que está à disposição no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, para esclarecimentos pelo telefone (51) 3359 8011.

Caso você necessite de algum esclarecimento ético, poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, através do telefone: (51) 33597640, no horário das 8-12 hs e das 13h30min às 17 hs.

Pelo presente termo, você declara que foi informado (a), de forma clara e detalhada sobre a presente pesquisa, e que teve suas dúvidas esclarecidas por \_\_\_\_\_ . Declara ter sido esclarecido que não receberá nenhuma remuneração financeira pela participação no estudo. Declara que foi informado da garantia de confidencialidade e que sua privacidade será assegurada, bem como da liberdade de não participar do estudo e da possibilidade de desistir, em qualquer momento da participação. Além disso, declara que recebeu cópia deste termo de consentimento.

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

Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Eu expliquei a \_\_\_\_\_ os objetivos, riscos, benefícios e procedimentos necessários para esta pesquisa, e entreguei cópia deste termo de consentimento para o mesmo.

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

Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_