

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E
DO ADOLESCENTE

**TRIAGEM PARA FORMAS ATENUADAS DE
MUCOPOLISSACARIDOSE EM PACIENTES COM
PROBLEMAS ÓSTEO-ARTICULARES DE ETIOLOGIA
DESCONHECIDA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
THABATA CAROLINE DA ROCHA SIQUEIRA

Porto Alegre, Brasil, 2015.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E
DO ADOLESCENTE

**TRIAGEM PARA FORMAS ATENUADAS DE
MUCOPOLISSACARIDOSE EM PACIENTES COM
PROBLEMAS ÓSTEO-ARTICULARES DE ETIOLOGIA
DESCONHECIDA**

THABATA CAROLINE DA ROCHA SIQUEIRA

Orientador: Dr. Roberto Giugliani

A apresentação desta dissertação é exigência do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, Brasil, 2015.

CIP - Catalogação na Publicação

da Rocha Siqueira, Thabata Caroline
TRIAGEM PARA FORMAS ATENUADAS DE
MUCOPOLISSACARIDOSE EM PACIENTES COM PROBLEMAS ÓSTEO-
ARTICULARES DE ETIOLOGIA DESCONHECIDA / Thabata
Caroline da Rocha Siqueira. -- 2015.
75 f.

Orientador: Roberto Giugliani.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente,
Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Erros Inatos do Metabolismo. 2.
Mucopolissacaridoses. 3. Comprometimento ósteo-
articular. I. Giugliani, Roberto, orient. II. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE**

ESTA DISSERTAÇÃO FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM:

24 / Fevereiro / 2015

E, FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

Dr. Ricardo Machado Xavier

(Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, professor do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

Dr^a. Ursula da Silveira Matte

(Professora do Programa de Pós Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente/PPGSCA Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

Dr.Filippo Pinto Vairo

(Médico Contratado do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Doutor pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

*Dedico este trabalho àqueles
que tanto amo: minha família.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof^o Dr. Roberto Giugliani, pela confiança depositada em meu trabalho, tens minha admiração e carinho.

A Dr^a. Carolina Fischinger de Moura, pela indescritível ajuda ao final deste.

A equipe da Reumatologia Pediátrica do Hospital São Lucas PUCRS, em especial à Dr^a Mercedes Picarelli, que me confiou os pacientes que procuravam o ambulatório de sua coordenação.

A Dr^a Ilóite Scheibel, pela parceria ao longo destes dois anos e pelo entusiasmo na busca de um diagnóstico preciso, que muitas vezes me motivou a seguir minha busca.

Aos inúmeros médicos e clínicas de Reumatologia e Ortopedia que contatei e me atenderam com atenção e respeito.

A Rede MPS Brasil pela competência, em especial para Karlla e Adriana que sempre recebiam minhas amostras com indescritível zelo.

Finalmente, não menos importante, aqueles que me acompanham desde sempre e são o combustível em forma de carinho: À minha família e amigos.

À minha mãe por ser um exemplo de força, determinação e fé em minha vida.

À minha doce avó que é uma fonte inesgotável de atenção e amor.

Ao meu pai, por todo o apoio, incentivo e atenção as minhas necessidades. O orgulho demonstrado é o que me fornece energia para seguir em frente.

À minha madrastra Jerúsia, pela amizade e paciência em escutar muitas vezes meu desabafo e me mostrar sempre a saída pela fé.

Aos meus anjos em forma de criança, que alegram a minha vida a cada dia mais: Bárbara, Isabela, Júlia e Sophia.

A minha tia Maristela, pelo apoio nesta caminhada que foi constituída de muitos “estresses” diários, porém que resultou em um belo final.

Aos meus amigos, por entenderem muitas vezes minha ausência, em especial a minha amiga Larissa Dornelles.

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por oportunizar a realização deste sonho.

Ao Programa de Pós-Graduação da Saúde da Criança e do Adolescente, pelo auxílio da secretária Rosane e coordenador Paulo Carvalho.

Ao Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de mestrado.

*“Bom mesmo é ir à luta com determinação,
abraçar a vida e viver com paixão, perder
com classe e vencer com ousadia, porque o
mundo pertence a quem se atreve e a vida é
muito para ser insignificante.”*

Charles Chaplin

RESUMO

Introdução: As mucopolissacaridoses (MPS) são um conjunto de sete doenças genéticas incluídas dentro das Doenças Lisossômicas que por sua vez fazem parte dos Erros Inatos do Metabolismo (EIM). São doenças multissistêmicas que afetam todo o organismo, com variações conforme o tipo de MPS, sendo que algumas delas possuem tratamento específico. Quase todas comprometem, em graus variados, o sistema osteo-articular, e praticamente todos os pacientes apresentam excreção alterada de glicosaminoglicanos (GAGs) na urina. As MPS são doenças raras que podem ser subdiagnosticadas em função do pouco conhecimento dos profissionais de saúde sobre elas, do pouco acesso aos métodos de triagem e diagnóstico e da sua ampla heterogeneidade clínica, podendo ocorrer formas atenuadas nas quais pode ser difícil de levantar a suspeita clínica de MPS. **Material e métodos:** o presente estudo foi realizado no período de março de 2012 à janeiro de 2014, tendo incluído 55 pacientes atendidos em serviços de Reumatologia e/ou Ortopedia de Porto Alegre, RS, Brasil e que, apresentavam como principal queixa, manifestações articulares sem etiologia definida. Esses pacientes foram inicialmente investigados através da avaliação quantitativa e qualitativa dos GAGs urinários. **Resultados e Discussão:** entre os 55 casos investigados, em 1 paciente de 15 anos de idade foi observada na análise dos GAGs urinários excreção aumentada e alteração do padrão qualitativo, sendo posteriormente confirmado o diagnóstico de uma forma atenuada de MPS II, a qual não havia sido suspeitada anteriormente. **Conclusão:** embora a proporção de pacientes identificados com MPS na amostra estudada tenha sido pequena (1/55), este estudo mostra que ocorre subdiagnóstico dessas doenças e que a triagem sistemática pode contribuir para a identificação de pacientes, os quais podem se beneficiar das medidas de tratamento disponíveis.

Palavras-chave: Mucopolissacaridoses, Doenças de Depósito Lisossômico,
Glicosaminoglicanos, Síndrome de Hunter, Triagem Seletiva

ABSTRACT

Introduction: Mucopolysaccharidoses (MPS) are a set of 7 genetic diseases including Lysosomal Diseases, which in turn are part of Inborn Errors of Metabolism (IEM). The MPS are multisystemic conditions that affect the entire body, with variations depending on the type, some of which have specific treatment. Almost all affect, in variable degrees, the osteo-articular system, and virtually all patients have abnormal excretion of glycosaminoglycans (GAGs) in urine. The MPS are rare diseases that are being underdiagnosed due to the little knowledge of health professionals about them, the poor access to screening and diagnostic methods and their extensive clinical heterogeneity. Also, attenuated forms may occur in which it may be difficult to raise the clinical suspicion of MPS. **Material and Methods:** The present study was conducted from March 2012 to January 2014 and included 55 patients from Rheumatology and/or Orthopedics services of Porto Alegre, RS, Brazil and which had, as main complaint, articular manifestations without defined etiology. These patients were screened by quantitative and qualitative assessment of urinary GAGs. **Results and Discussion:** Among the 55 cases investigated, in 1 patient 15 years of age was observed in the analysis of urinary GAG excretion and increased change in qualitative standard and subsequently confirmed the diagnosis of an attenuated form of MPS II, which had not previously been suspected. **Conclusion:** Although the proportion of patients with MPS identified in the study sample was small (1/55), this study shows that occurs underdiagnosis of these diseases and that systematic screening can help to identify patients who may benefit from measures treatment available.

Keywords: Mucopolysaccharidoses, lysosomal diseases, glycosaminoglycans, Hunter syndrome, selective screening.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 COMPARAÇÃO DAS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DE UM PACIENTE COM FORMA ATENUADA DE MPS I VERSUS ARTRITE IDIOPÁTICA JUVENIL. RETIRADO DE CIMAZ R, 2009 (CIMAZ, COPPA ET AL. 2009).	31
--	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: CLASSIFICAÇÃO E DIFERENÇAS DAS MPS (SCHWARTZ IV. 2001, CABELLO 2010).	22
TABELA 2 RESULTADOS DA TRIAGEM PARA MUCOPOLISSACARIDOSE.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS

CPAP – Pressão Positiva de Ar

EIM – Erros Inatos do Metabolismo

GAG – Glicosaminoglicanos

GPPG – Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação

HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

IDUA – Enzima Alfa-L-Iduronidase

IDS – Enzima Iduronato-2-sulfatase

LREIM – Laboratório de Referência em Erros Inatos do Metabolismo

MPS – Mucopolissacaridose

MPSI – Síndrome de Hurler, Scheie ou Hurler-Scheie

MPSII- Síndrome de Hunter

MPSIII- Síndrome de Sanfillipo

MPSIV- Síndrome de Mórquio

MPSVI- Síndrome de Maroteax- Lamy

MPSVII- Síndrome de Sly

MPSIX- Síndrome de Natowicz

POP – Procedimento Operacional Padrão

SGM- Serviço de Genética Médica

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TCTH – Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas

TMO- Transplante de Medula Óssea

TRE – Terapia de Reposição Enzimática

USA – Estados Unidos da América

LISTA DE ANEXOS

Anexo I – Artigo científico em Língua Inglesa	pág 55
Anexo II – Modelo Carta- Convite aos Médicos	pág 63
Anexo III- Termo de Concordância para Participação em Pesquisa.....	pág 64
Anexo IV- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido dirigido ao Adulto/Maior.....	pág 65
Anexo V- Termo de Consentimento Livre e esclarecido dirigido ao Responsável.	pág 67
Anexo VI- Termo de Assentimento.....	pág 69
Anexo VII- Formulário de Coleta de Dados.....	pág 71
Anexo VIII- Termo de compromisso para a utilização de Dados Institucionais.....	pág 73
Anexo IX- Protocolo de Dosagem de GAG's na urina.....	pág 74
Anexo X- Protocolo para eletroforese dos Glicosaminoglicanos na urina.....	pág 77

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	6
RESUMO	9
ABSTRACT	11
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	13
LISTA DE TABELAS	14
LISTA DE ABREVIATURAS	14
LISTA DE ANEXOS	16
SUMÁRIO	17
INTRODUÇÃO	17
REFERENCIAL TEÓRICO	18
Erros Inatos do Metabolismo	18
Doenças Lisossômicas de Depósito	20
Mucopolissacaridoses	22
MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO I	23
MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO II	24
MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO III	24
MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO IV	25
MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO VI	25
MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO VII	26
MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO IX	26
Manifestações Clínicas	26
Formas Atenuadas das Mucopolissacaridoses	28
Epidemiologia	31
Diagnóstico Laboratorial	32
Tratamento	33
TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA	34
TERAPIA DE REPOSIÇÃO ENZIMÁTICA (TRE)	34
TERAPIA GÊNICA	35
JUSTIFICATIVA	37
OBJETIVOS	38
Geral	38
Específicos	38
METODOLOGIA	39
Delineamento	40
Amostra Estudada	41
Aspectos Éticos	41
Testes Realizados	42
RESULTADOS	44
DISCUSSÃO	46
CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
ANEXOS	53

REFERENCIAL TEÓRICO

Pesquisando em bancos de dados internacionais, como o site Pubmed, pode-se encontrar com a palavra “Mucopolysaccharidosis” 6.185 artigos diferentes sobre este assunto. Quando acrescido a palavra “review” essa pesquisa diminui para 748 artigos. O que nos leva a pensar que atualmente muitos estudos novos sobre as Mucopolissacaridoses estão sendo desenvolvidos. Quando pesquisamos as palavras “Mucopolysaccharidosis 2014” aparecem 277 artigos novos somente no ano de 2014, o que afirma a realização de novas pesquisas em Mucopolissacaridoses. Este e outros bancos de dados científicos foram consultados para escrever a presente dissertação. Sendo este reconhecido pois possui artigos qualificados e de alto impacto na sociedade científica. (website: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> acesso em: 04/01/2015 às 21:02 horas)

As Mucopolissacaridoses (MPS) são doenças de origem genética, incluídas dentro das Doenças Lisossômicas, que compõem o grupo dos Erros Inatos do Metabolismo (EIM). Estes ocorrem a partir de alterações genéticas que afetam a síntese ou funcionamento de proteínas, geralmente enzimas, importantes para o metabolismo, resultando em problemas de síntese, degradação, transporte ou armazenamento de moléculas no organismo, geralmente com consequências clínicas decorrentes dessa alteração (Schwartz IV. 2001).

Erros Inatos do Metabolismo

Os Erros Inatos do Metabolismo (EIM) são um grupo de doenças que

compreendem cerca de 10 % dos distúrbios genéticos, sendo em sua maioria autossômica recessivas. Nos EIM ocorrem defeitos bioquímicos causados por alterações em genes que codificam moléculas protéicas importantes para o metabolismo humano. Como consequência disto, a deficiência protéica, geralmente enzimática, poderá resultar no acúmulo ou na falta de determinadas substâncias necessárias para o bom funcionamento do organismo, resultando em sintomas semelhantes a “intoxicação” muitas vezes. Para cada distúrbio metabólico existe um manejo específico (Saínez CM 2002, Schwartz, Souza et al. 2008, Muenzer 2011, Cimaz and La Torre 2014).

Os EIM têm, em geral manifestações sistêmicas, que acometem todo o organismo, com início dos sintomas em qualquer faixa etária (Martins 1999, Araújo 2004, Wilcox 2004, Schwartz, Souza et al. 2008).

Como são doenças raras, muitos médicos não suspeitam desses distúrbios no diagnóstico diferencial dos seus pacientes. Não é incomum que essas doenças sejam identificadas ou diagnosticadas de maneira equivocada. Acreditamos que, além da raridade dessas doenças, a baixa prevalência pode ser explicada devido ao subdiagnóstico, pois os pacientes procuram diversas especialidades médicas e muitas vezes a hipótese de um Erro Inato do Metabolismo é a última a ser explorada (Jardim and Ashton-Prolla 1996, Souza 2002, Martins 2003).

A primeira descrição na história foi feita pelo médico inglês Archibald Edward Garrot, que empregou pela primeira vez o termo Erros Inatos do Metabolismo em um artigo publicado na revista Lancet, onde ele propôs que a doença Alcaptonúria se iniciava a partir de um bloqueio metabólico. O termo Erro Inato do Metabolismo se consagrou mais fortemente após a publicação do livro de Garrot em 1909, que ganhava este título (Saínez CM 2002).

Podemos dividir os erros inatos do metabolismo em dois grandes grupos: o das moléculas grandes e o das moléculas pequenas. No grupo de moléculas grandes, os sintomas são em geral contínuos e progressivos e não estão influenciados pela dieta. Já o grupo de EIM das pequenas moléculas apresenta sintomas semelhantes ao de intoxicações e/ou deficiência de energia, devido ao acúmulo de metabólitos no organismo (Wajner 2001, Amâncio 2007).

Muitos pacientes ao nascimento não apresentam nenhuma característica de EIM, dificultando assim a suspeita clínica nesse período (Jardim and Ashton-Prolla 1996, Fumero 2003). Entretanto a maioria dos EIM apresenta manifestações clínicas entre a infância e a adolescência, porém com muitos sintomas semelhantes a outras patologias que podem confundir o médico na busca pelo diagnóstico adequado (Beck 2000, Muenzer 2011, Hendriksz, Berger et al. 2015).

A identificação de um EIM se dá usualmente a partir da suspeita clínica a ser confirmada por testes bioquímicos específicos em laboratório especializado através da triagem para EIM. Exames complementares são geralmente úteis para definir o diagnóstico preciso e a estratégia terapêutica mais apropriada para cada paciente (Wajner 2001, Cabello 2010).

Doenças Lisossômicas

Dentro do grupo dos Erros Inatos do Metabolismo, encontram-se as Doenças Lisossômicas, que já são clinicamente conhecidas há bastante tempo, inclusive antes da descoberta do lisossomo e de serem identificadas e denominadas anteriormente como “Doenças de Depósito Lisossômico (DDL)”, termo este em decadência, substituído por

Doenças Lisossômicas. Esse grupo abrange cerca de 50 doenças com manifestações clínicas bastante heterogêneas, onde o defeito genético encontra-se nos genes que codificam, em sua maioria, hidrolases responsáveis pela degradação intralisossomal de macromoléculas. Mais recentemente tem se observado defeitos em receptores, proteínas de membrana, proteínas ativadoras e/ou proteínas transportadoras, que também irão causar o acúmulo intralisossomal de alguns componentes que causam a deterioração progressiva de células e tecidos (Wilcox 2004).

A frequência das DDL é calculada como sendo em torno de 1: 7.700 nascidos vivos (Meikle, Hopwood et al. 1999). As DDL são herdadas de maneira autossômica recessiva, com três exceções apenas: Síndrome de Hunter (MPS II), Doença de Fabry e Doença de Danon, ligadas ao cromossomo X (Vellodi 2005).

Tabela 1: Classificação e diferenças das MPS (Schwartz IV. 2001, Cabello 2010).

	MPS I (Síndrome de Hurler, Hurler-Scheie ou Scheie)	MPS II (Síndrome de Hunter)	MPS III A, B, C e D (Síndrome de Sanfilippo A, B, C e D)	MPS IV A e B (Síndrome de Morquio)	MPS VI (Síndrome de Maroteaux-Lamy)	MPS VII (Síndrome de Sly)	MPS IX (Síndrome de Natowicz)
Mucopolissacarídeos	Alfa-L-iduronidase	Iduronato Sulfatase	MPSIIIA: Sulfato de Heparina MPSIIIB: N-acetilglucosaminidase MPSIIIC: N-acetilglucosamina 6-sulfatase MPSIIID: N-acetilglucosamina-6-sulfatase	MPSIV-A: Galactose-6-sulfatase ou N-acetilgalactosamina-6-sulfatase MPSIV-B: Beta-galactosidase	N-acetil galactosamina-4 sulfatase	Beta-glucuronidase	Hialuronidase
Sintomas clínicos frequentes	Opacificação da córnea, retardo mental, cardiomiopatia	Opacificação da córnea, retardo mental, cardiomiopatia.	Retardo mental, hiperatividade, disfunção motora.	Severa displasia esquelética, disfunção motora, baixa estatura.	Displasia esquelética grave, baixa estatura, disfunção motora grave, cardiopatias	Displasia esquelética, baixa estatura, disfunção motora, atraso intelectual, opacificação da córnea	Displasia esquelética, baixa estatura, nódulos nas juntas com episódios de dores, alterações faciais leves.
GAG acumulado	Dermatan e Heparan sulfato	Dermatan e Heparan Sulfato	Heparan sulfato	Queratan sulfato	Dermatan Sulfato	Dermatan e Heparan Sulfato	Condroitin Sulfato
Localização do Gene	4p16.3	Xq28	A: 17q25.3 B: 17q21 C: 8p11.1 D: 12q14	A: 16q24.3 B: 3p21.33	5q11-q13	7q21.11	3p21.3-p21.2
Herança	Autossômica Recessiva	Recessivo ligado ao cromossomo sexual X	Autossômica Recessiva	Autossômica Recessiva	Autossômica Recessiva	Autossômica Recessiva	Autossômica Recessiva

Mucopolissacaridoses

Atualmente, são conhecidas onze deficiências enzimáticas diferentes que podem resultar em uma mucopolissacaridose, como está indicado na tabela abaixo (Cabello 2010, Cimaz and La Torre 2014).

MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO I

Também conhecida como síndrome de Hurler, Hurler-Scheie e Scheie, a MPS I é caracterizada basicamente pela deficiência da enzima alfa- L- Iduronidase (IDUA) e dividida nos três subtipos em função da gravidade do quadro. Quanto mais baixa é a atividade da IDUA, pior é o acometimento clínico do paciente, e mais dermatan sulfato e heparan sulfato será acumulado intralisossomicamente (Matte, Yogalingam et al. 2003, Vijay and Wraith 2005, Moore, Connock et al. 2008).

A forma mais grave da MPS I é a Síndrome de Hurler, onde a atividade enzimática encontra-se muito baixa ou ausente, sendo expectativa de vida até a primeira década (Taylor, Brady et al. 2008). A forma denominada Hurler-Scheie é uma forma intermediária, a doença tem início mais tardio dos sintomas e a expectativa de vida gira em torno da segunda década e idade adulta (Haley, Fragala Pinkham et al. 2006). A forma Scheie da MPS I, mais atenuada, muitas vezes é confundida com outras patologias como artrite idiopática juvenil, doença auto-imune, dermatopoliomiosite, esclerodermia, doença de Legg-Perthes, artrite reumatóide, espondiloartrite, distrofias musculares, polineuropatia, fibromialgia, Osteogênese Imperfecta e outras doenças reumatológicas sistêmicas (Pastores, Arn et al. 2007, Soliman, Timmermans et al. 2007, Cimaz, Coppa et al. 2009, Watson, Holley et al. 2014).

MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO II

Como exceção à regra a MPS II é herdada de modo recessivo ligado ao X, ao contrário de todas outras formas de MPS onde a herança é autossômica recessiva. Por consequência da deficiência da enzima Iduronato-2-sulfatase (IDS) e consequente acúmulo intralisossômico de dermatan e heparan Sulfato, o fenótipo da MPS II (também chamada de Síndrome de Hunter) se caracteriza por deformidades ósseas, baixa estatura e face infiltrada, além, é claro de todas as manifestações sistêmicas clássicas comuns à maioria das MPS. Na forma grave (forma neuropata) podemos observar acometimento neurológico (Neufeld and Muenzer 2001, Schwartz IV. 2001, Schwartz, Ribeiro et al. 2007, Cabello 2010).

MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO III

A MPS III, também chamada de Síndrome de Sanfilipo, é causada pela deficiência de enzimas diferentes, que resultam em 4 subtipos da MPS III, que são: MPS IIIA (Heparan N-Sulfatase), MPS IIIB (N-acetilglucosaminidase), MPS IIIC (acetil-CoA: glicosaminidase-acetiltransferase) ou MPS IIID (N-acetilglucosamina-6-sulfatase). Todas causam a degradação deficiente de Heparan Sulfato, acumulando, assim, este composto nos lisossomos. Os pacientes acometidos por esse tipo de MPS não apresentam acometimento ósteo-articular significativo, porém, todos apresentam envolvimento do SNC e distúrbios de comportamento. Atualmente está sendo testado em ratos uma terapêutica que consiste na fusão proteica de IGFII intracerebral que está mostrando resultados promissores (Neufeld and Muenzer 2001, Schwartz IV. 2001, Vieira, Schwartz et al. 2008, Cabello 2010).

MUPOLISSACARIDOSE TIPO IV

A síndrome de Mórquio (MPS IV) apresenta importantes manifestações osteoarticulares, como baixa estatura, disostose múltipla, entre outras. Resultante da má degradação do queratan sulfato devido a deficiência das enzimas N-acetilgalactosamina-6-sulfatase ou beta-galactosidase, que ocorrem nas MPS IVA e MP SIVB, respectivamente. São caracterizadas pela baixa estatura e não envolvimento do Sistema Nervoso Central (Neufeld and Muenzer 2001, Chaves 2003, Tomatsu, Yasuda et al. 2014, Charrow, Alden et al. 2015).

Os sintomas e apresentações fenotípicas da síndrome de Morquio (MPS IVA), tanto o seu início como a progressão destes sinais clínicos variam muito de pacientes para pacientes. É de extrema importância uma abordagem multidisciplinar para que o paciente possa ter uma melhor qualidade de vida, tanto com base nas avaliações e pesquisas já realizadas em pacientes com a síndrome de Mórquio, no ano 2014 foram desenvolvidas as Diretrizes Internacionais para a Gestão e Tratamento da Síndrome de Mórquio A (Hendriksz, Berger et al. 2015).

MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO VI

A deficiência da enzima arilsulfatase B ou N-acetilgalactosamina-4-sulfatase é responsável pela MPS VI ou Síndrome de Maroteaux-Lamy, na qual se acumula dermatan sulfato intralissossomicamente. Nestes pacientes podemos observar uma parada do crescimento, assim como complicações cardíacas sérias, rigidez articular, deformidades ósseas, sem envolvimento do SNC (Schwartz IV. 2001, Harmatz, Ketteridge et al. 2005, Cabello 2010).

MUCOPOLISSACARIDOSE VII

De todas as Mucopolissacaridoses a Síndrome de Sly é a que pode ser a MPS mais precocemente detectada, uma vez que nela pode ocorrer uma importante hidropsia fetal. Proveniente da deficiência da beta-gluconidase (Neufeld and Muenzer 2001), ainda na vida intrauterina podemos observar um aumento da translucência nucal e crescimento ósseo acelerado caso estes sintomas persistirem (forma grave da doença) pode ir a óbito em poucos meses. Já na forma atenuada da doença, estes pacientes sobrevivem até a adolescência, manifestando sintomas clínicos de atraso de crescimento, deformidades ósseas, complicações cardíacas, retardo mental, face infiltrada, macrocefalia e outros sintomas comuns a todas MPS (Neufeld and Muenzer 2001, Schwartz IV. 2001, Cabello 2010).

MUCOPOLISSACARIDOSE IX

A MPS IX ocorre devido à deficiência enzimática de Hialuronidase, sendo também chamada de Síndrome de Natowicz, na qual ocorre acúmulo de Condroitin Sulfato. Podemos observar fenotipicamente baixa estatura, nódulos nas articulações acompanhados de episódios de dor articular e alterações faciais leves (Schwartz IV. 2001, Cabello 2010).

Manifestações Clínicas

Em todas as MPS ocorrem, em maior ou menor grau, problemas ósseos e/ou articulares. Em seu conjunto, essas alterações são chamadas de disostose múltipla. O acometimento, apesar de sistêmico, pode variar entre os tipos de MPS, geralmente

comprometendo a função osteoarticular e, conseqüentemente, a estatura do paciente. As MPS se apresentam com particularidades, assim como um espectro de gravidade dentro de cada tipo, com formas mais graves e formas mais atenuadas, cuja sintomatologia é mais branda e, em geral de início mais tardio (Brasil).

Pacientes com sinais de comprometimento ósseo, limitação articular, que apresentem ou não algum retardo mental, opacificação da córnea, entre outros sintomas clínicos compatíveis com MPS e que não tenham diagnóstico de outra doença, são considerados candidatos elegíveis para triagem para formas atenuadas de Mucopolissacaridose. A triagem é realizada pela análise dos glicosaminoglicanos urinários. Caso ela esteja quantitativamente elevada, é realizada uma análise qualitativa dos tipos de GAGs presentes e, de acordo com esse padrão e com as características clínicas e genéticas do paciente, enzimas específicas são analisadas (Cabello 2010).

Existem variações das MPS em relação ao grau de comprometimento. Em casos atenuados da doença, os especialistas osteomusculares são os primeiros profissionais procurados devido aos problemas articulares comuns nas MPS. Estas queixas são as primeiras que aparecerem na maioria dos casos. Estes especialistas devem estar preparados para reconhecer e diagnosticar uma MPS, ou levantar esta hipótese e encaminhar a um médico geneticista, porém, isto pode ser um desafio, pois as formas atenuadas das MPS se manifestam com sintomas sutis e/ou inespecíficos. Cabe ao clínico reconhecer e diagnosticar a doença para que seja possível indicar a melhor terapia para o paciente visando a não progressão dos sintomas clínicos (Cimaz, Coppa et al. 2009).

As manifestações osteo-articulares são comuns a todas as MPS. Em algumas (como na MPS IVA) esse comprometimento ósseo é mais agressivo, se tornando assim

mais evidente. Esses sintomas são resultados dos glicosaminoglicanos que estão depositados, como consequência do acúmulo intralissosomal.

A rigidez articular ocorre em todos os tipos de MPS, exceto na MPS IV onde há uma frouxidão ligamentar. Essa limitação articular e rigidez podem resultar numa progressiva perda de função motora (Neufeld and Muenzer 2001).

Formas Atenuadas das Mucopolissacaridoses

As formas atenuadas de MPS podem apresentar um conjunto diversificado de sintomas como já descritos e comuns a todas MPS, porém, com um grau de comprometimento menor e mais lento. Essa grande variabilidade de sintomas clínicos presente nas formas atenuadas pode dificultar o diagnóstico, sendo comum a procura por médicos ortopedistas e reumatologistas, e, muitas vezes, o diagnóstico pode ser equivocado. As suspeitas mais comuns são: doenças auto-imunes, distrofias musculares, doenças do tecido conjuntivo, Osteogênese Imperfecta, Polimiosite, Dermatomiosite, Polineuropatia, Fibromialgia, Artrite Reumatóide, Esclerodermia, Artrite Idiopática Juvenil, Espondiloartrite, Legg-Perthes e outras doenças reumáticas sistêmicas, incluindo “dores do crescimento” (Hendriksz 2011).

Os sintomas mais frequentes em pacientes com formas atenuadas de mucopolissacaridose são os que acometem o sistema osteo-articular como dor, contratura articular e deformidades ósseas. Devido a estes sintomas, pacientes são encaminhados a um médico reumatologista e/ou ortopedista, que identificam melhor um caso de MPS. Em um estudo feito pelo Dr. Manger em 2008 mostrou que ainda assim, apenas 13% dos reumatologistas pediatras e 19% dos reumatologistas são capazes de

suspeitas de uma MPS. Quando foram apresentados os casos clínicos de uma menina de 8 anos e outro de uma mulher de 23 anos, onde ambas tinham manifestações articulares e sintomas clássicos de MPS (Hendriksz 2011).

Os sintomas mais comumente encontrados nas formas atenuadas de MPS são (Brooks, Gibson et al. 2005, Lehman, Miller et al. 2011):

- Disostoses múltiplas (deformidades esqueléticas);
- Deformidades ósseas faciais;
- Comprometimento articular com ou sem sinais inflamatórios;
- Infecções recorrentes de ouvidos, nariz e garganta;
- Baixa estatura;
- Retinopatia, glaucoma ou opacidade de córnea;
- Hérnia presente, histórico ou histórico recorrente de hérnia umbilical e/ou inguinal mesmo após cirurgia corretiva;
- Hepatomegalia;
- Síndrome do túnel do Carpo;
- Mãos e/ou pés em garras;
- Doença Valvar Cardíaca;
- Doença Obstrutiva de Vias Aéreas;
- Perda progressiva da audição.

Muitos pacientes com formas atenuadas de MPS podem apresentar os sintomas da doença de maneira isolada, o que levaria o médico a suspeitar de outras doenças que possuem manifestações clínicas semelhantes. A lista abaixo mostra os diagnósticos mais comumente encontrados (Cimaz, Coppa et al. 2009):

- Artrite idiopática Juvenil;
- Doença autoimune;
- Dermatomiosite;
- Poliomiosite;
- Esclerodermia;
- Doença do Tecido Conjuntivo;
- Doença de Legg-Perthes;
- Artrite Reumatóide;
- Espondiloartrite;
- Distrofias musculares;
- Polineuropatia;
- Fibromialgia;
- Dores de crescimento;
- Outras doenças reumatológicas sistêmicas;
- Osteogenesis imperfecta.

Esta confusão é explicada pelas semelhanças entre as formas atenuadas de MPS e outras doenças reumatológicas com sintomas e exames muito semelhantes, como na radiografia abaixo, que compara forma atenuada e grave versus artrite idiopática Juvenil, mostrada na figura retirada do artigo (Cimaz, Coppa et al. 2009, Cimaz and La Torre 2014).



Figura 1 Comparação das manifestações clínicas de um paciente com forma Atenuada de MPS I versus Artrite Idiopática Juvenil. Retirado de Cimaz R, 2009 (Cimaz, Coppa et al. 2009).

Epidemiologia

As Mucopolissacaridoses são doenças raras em que ainda há poucos estudos epidemiológicos sobre sua prevalência e incidência. Estima-se que este grupo de doenças consideradas relativamente raras tenha a incidência conjunta de 1:25.000 nascidos vivos, e acredita-se que este valor esteja subestimado uma vez que muitos pacientes chegam a óbito sem o diagnóstico preciso. Atualmente, são conhecidas onze

deficiências enzimáticas diferentes que podem resultar numa mucopolissacaridose, como já foi descrito na tabela apresentada anteriormente (Cabello 2010).

Entre 1982 e 1995 foi realizado um estudo com 10.000 pacientes que tinham suspeita de algum Erro Inato do Metabolismo (EIM), no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do Serviço de Genética Medica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Em 647 pacientes foi diagnosticado bioquimicamente algum EIM: desse total 59,8% tinham doenças de depósito lisossômico e as mucopolissacaridoses compreendiam 48,6% desses pacientes (Coelho, Wajner et al. 1997).

Diagnóstico Laboratorial

Em todas as MPS podemos constatar o aumento significativo dos glicosaminoglicanos urinários. Por este motivo, a triagem para o diagnóstico de MPS tem seu início na dosagem dos GAGs urinários juntamente com a eletroforese, exames que avaliam de forma quantitativa e qualitativa, respectivamente, esses compostos (Beck 2000, Schwartz IV. 2001).

Após o início da investigação se dar pela quantidade e qualidade destes compostos na urina com o objetivo de guiar o profissional para o diagnóstico preciso e definitivo mostrando qual GAG está aumentado, é feito, como passo posterior de caráter confirmatório, a dosagem enzimática. Esta pode ser realizada em plasma, leucócitos ou fibroblastos. Também é possível dosar a atividade da enzima em material vilocoriônico e líquido amniótico quando durante a gestação há a suspeita de MPS (Beck 2000, Neufeld and Muenzer 2001, Schwartz IV. 2001).

O laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do HCPA é um serviço de

referência internacional no diagnóstico dessas condições. Em anexo está o procedimento operacional padrão (POP) para a dosagem e eletroforese de GAG urinário, assim como o POP da dosagem enzimática.

O diagnóstico molecular identifica mutações no DNA desses pacientes, ou seja, serve para identificar qual o tipo de mutação que causou o fenótipo de MPS. Por isso, após a triagem e definição do tipo da MPS através de ensaios enzimáticos é que podemos caracterizar qual o defeito molecular presente no paciente com MPS. O diagnóstico molecular pode auxiliar na identificação de novos pacientes na família (Lehman, Miller et al. 2011).

Tratamento

O tratamento de um paciente com MPS deve ocorrer de maneira multidisciplinar, ou seja, com profissionais de várias áreas engajados para melhorar a qualidade de vida do paciente. Além de aparelhos de suporte como auditivos e o uso do CPAP (pressão positiva de ar) para corrigir as apneias frequentemente comuns nesses pacientes, tratamentos cirúrgicos e tratamentos com medicamentos para as manifestações clínicas que são apresentadas, como problemas cardíacos, otites recorrentes, alguns casos de transplante de córnea devido a opacificação progressiva, entre muitos outros sinais clínicos que através do tratamento medicamentoso pode contribuir muito para a qualidade de vida do paciente. Há pouco tempo atrás era somente esta opção que havia para manejar este paciente, apenas tratamentos paliativos e de suporte; hoje em dia temos diferentes opções mais específicas para que possamos estagnar ou até mesmo regredir a evolução desta doença como a Terapia de Reposição Enzimática, que hoje é realidade para os tipos I, II, IV, VI e VII de

Mucopolissacaridose (Muenzer 2004).

TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA

O transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) foi o primeiro tratamento mais específico para as MPS, pois tem como objetivo substituir células do paciente pelas células do doador, que por ser saudável produz de forma eficiente as enzimas que o paciente produz de forma deficiente ou nula. Desta forma, o TCTH tem este objetivo "substituir" as células doentes que não produzem normalmente as enzimas lisossômicas, por células "saudáveis" que produzem normalmente as enzimas lisossômicas (Matte 1998, Peters, Steward et al. 2003).

Segundo um trabalho publicado em 2003 por Peters et al em pacientes com MPS I, o TCTH mostrou melhora significativa no quadro obstrutivo do sistema respiratório, diminuição da hepatoesplenomegalia, diminuição significativa da excreção de GAG urinários, melhora da audição, problemas cardíacos e opacidade de córnea (Peters, Steward et al. 2003).

TERAPIA DE REPOSIÇÃO ENZIMÁTICA (TRE)

A terapia de reposição enzimática consiste na infusão intravenosa da enzima que está deficiente em cada tipo de MPS, tendo como objetivo auxiliar na rota metabólica de degradação dos compostos intralisossômicos. As limitações da TRE seriam a incapacidade de atravessar a barreira hemato-encefálica, o possível desenvolvimento de anticorpos contra a enzima infundida e também a dificuldade de atingir tecidos muito específicos, como por exemplo, o tecido ósseo. Observa-se que um aumento de 1-5% na atividade enzimática já é capaz de regularizar a função lisossômica (Wilcox 2004, Vellodi 2005).

O uso da terapia de reposição enzimática (TRE) nos últimos anos tem mostrado

melhora significativa das respostas do paciente ao exercício melhorando a flexibilidade dos ombros e, conseqüentemente, melhor desempenho nas atividades diárias. O diagnóstico precoce permite que se inicie o mais rápido possível a TRE, maximizando assim as respostas a medicação (Pastores 2008, Clarke, Wraith et al. 2009, Hendriksz 2011).

Atualmente temos disponível TRE para MPS I, II e VI. Os estudos para uma terapia que pudesse trazer exogenamente a enzima deficiente na MPS I iniciou em 1997 e mostrou melhoras. Em consequência deste estudo promissor Wraith ET AL em 2004 mostrou que realmente a capacidade pulmonar, distância caminhada em 6 min, Índice de Apnéia/Hipopnéia e rotação de ombro se apresentou melhor após as infusões. Assim como a hepatoesplenomegalia e excreção dos Glicosaminoglicanos urinários diminuíram significativamente. Aqui no Brasil foi aprovada em 2006 a medicação Aldurazyme, da empresa Biomarin Pharmaceutica inc., USA e Genzyme Corporation, Usa (Wraith, Clarke et al. 2004, Sifuentes, Doroshov et al. 2007).

Para MPS II (Síndrome de Hunter) hoje temos disponível a enzima recombinante Elaprase, da empresa farmacêutica Shire Human Genetics Therapies. A aprovação desta terapia se deu após um estudo realizado em 2006, com 96 pacientes que recebiam a droga semanalmente, quinzenalmente ou placebo. Os pacientes que recebiam a medicação tiveram uma significativa melhora na capacidade pulmonar, na distância caminhada em 6 min, diminuição da hepatoesplenomegalia e excreção de GAGs urinários (Muenzer, Wraith et al. 2006).

TERAPIA GÊNICA

O objetivo da terapia Gênica se dá a partir de uma cópia do gene normal onde o gene alterado poderia ser corrigido desempenhando assim a sua função corretamente.

Esta cópia normal do gene é introduzida no organismo a partir de vetores virais ou não virais. Apesar de parecer simples a ideia central, na prática surgem as dificuldades como, por exemplo, garantir a expressão adequada do gene e certificar que será passado para as células filhas a alteração benéfica.

A promessa da terapia gênica é motivo de grande entusiasmo para o manejo e tratamento de várias doenças não só MPS, mas como também para o câncer, outras doenças monogênicas e doenças vasculares. (Nardi, Teixeira et al. 2002, Wilcox 2004).

Deste modo, este trabalho teve como interesse principal a busca de novos pacientes, para que estes se beneficiem dos tratamentos disponíveis adequado a sua patologia.

JUSTIFICATIVA

Pacientes que procuram os centros de Reumatologia e Ortopedia apresentando queixas articulares com rigidez ou não, apresentando ou não inflamação podem, eventualmente, apresentar alguma forma atenuada de MPS. Muitos destes sintomas clínicos de MPS podem ser confundidos com os causados por outras doenças. O diagnóstico preciso nesses casos pode trazer benefícios aos pacientes, através das medidas de suporte ou mesmo de terapias específicas, como a terapia de reposição enzimática. Além disso, o diagnóstico encerra a busca de uma explicação para o problema, que se constitui em uma preocupação adicional para o paciente e sua família. Ainda assim, as famílias afetadas podem se beneficiar do aconselhamento genético.

O Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre é um centro de referência para diagnóstico e tratamento das Mucopolissacaridoses e pode também contribuir na identificação de pacientes com as formas mais atenuadas da doença, usualmente atendidos em outros serviços.

OBJETIVOS

O presente trabalho apresenta os seguintes objetivos:

Geral

Investigar a presença de uma forma atenuada de Mucopolissacaridose (MPS) em pacientes com problemas articulares sem etiologia definida.

Específicos

- 1) Avaliar a frequência de indivíduos com formas atenuadas de MPS entre os pacientes que procuram serviços de reumatologia e ortopedia por problemas articulares sem etiologia definida;
- 2) Definir se pacientes com problemas articulares sem etiologia definida constituem um grupo de risco para o diagnóstico de formas atenuadas de MPS.

METODOLOGIA

Inicialmente enviamos um e-mail-convite a 4 hospitais de Porto Alegre que possuíam ambulatórios de Reumatologia e Ortopedia. Foram eles: Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Hospital Conceição, Santa Casa de Misericórdia e Hospital São Lucas-PUCRS, destes em três tivemos um retorno positivo com a inclusão de pacientes na pesquisa. Foram convidados 51 médicos, entre Reumatologistas e Ortopedistas de consultórios particulares de porto alegre a partir de informações existentes em bases de dados físicas e eletrônicas, apenas 13 responderam o e-mail-convite onde se mostraram interessados na pesquisa, e apenas 4 incluíram pacientes na pesquisa. Entramos em contato por telefone, dando informações resumidas sobre a pesquisa e enviando informações mais completas por e-mail (modelo de e-mail-convite anexado ao final desta dissertação).

A partir do interesse demonstrado pelo médico e/ou clínica foi feito questionamento sobre a existência de pacientes com os seguintes critérios:

- Dor articular;
- Rigidez articular;
- Aumento do volume articular de consistência endurecida (óssea);
- Síndrome do túnel do carpo em crianças (<16 anos);
- Dedo-em-gatilho em crianças (<16 anos);
- Contraturas articulares;

- Alterações radiográficas sugestivas de osteo-artrose secundária.

A existência de diagnóstico de artropatia inflamatória ou de osteo-artrose primária foi considerada critério de exclusão.

Para formalizar a parceria do profissional ou clínica com a pesquisa, foi assinado um Termo de Concordância para a participação em projeto de pesquisa. Este contém dados de identificação do parceiro como nome, responsável, endereço, telefone e e-mail.

Foi explicado verbalmente a todos os possíveis participantes sobre os objetivos e procedimentos desta pesquisa. Os pacientes foram incluídos após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e forneceram uma amostra ocasional de urina para que pudéssemos dosar os GAGs urinários, assim como realizar a eletroforese dos GAGs na mesma amostra de urina. A confirmação e dosagem enzimática em sangue heparinizado era realizada, como teste confirmatório, caso a dosagem e/ou a eletroforese dos GAG urinário se mostrasse com padrão alterado.

Delineamento

Trata-se de um estudo transversal de uma amostra limitada de pacientes com problemas articulares sem etiologia definida. A coleta dos dados foi em um momento único, não tendo havido período de seguimento.

Amostra Estudada

Foram incluídos pacientes que procuraram os serviços de Reumatologia e Ortopedia queixando-se de dores articulares e rigidez que não se enquadravam em nenhuma doença reumatológica e/ou ortopédica bem definida Após a consulta usual com o médico reumatologista ou ortopedista e este não tenha definido um diagnóstico etiológico, convidamos o paciente ou responsável a participar do estudo, explicando sobre a pesquisa verbalmente no mesmo local após a consulta com o seu médico. Para formalizar a participação no estudo, os responsáveis ou o paciente (caso este fosse maior de 18 anos) assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, seguido de um questionário verbal sobre informações relevantes sobre a história clínica e outros questionamentos relevantes para contextualizar a situação clínica deste.

Aspectos Éticos

Os serviços que aceitaram participar do presente estudo assinaram um Termo de Concordância para Participação em Projeto de Pesquisa (Anexo). Os pacientes que concordaram voluntariamente em participar do estudo documentaram a concordância por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo) para pacientes adultos ou os responsáveis legais (nos casos de pacientes menores de idade) e, também, do Termo de Assentimento dirigido à criança (Anexo), para pacientes crianças.

Os pesquisadores que estiveram envolvidos no projeto assinaram um Termo de Compromisso para Utilização de Dados (anexo), por meio do qual se comprometeram a preservar a identidade dos pacientes.

O presente projeto e todos os documentos contidos nele foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GPPG/HCPA).

Testes Realizados

Após o processo de consentimento e preenchimento do formulário de coleta de dados, foi coletada uma amostra de urina ocasional, a qual foi encaminhada a Rede MPS Brasil (projeto GPPG nº 11-0557) para a dosagem de glicosaminoglicanos (GAGs), conforme protocolo do Laboratório de Referência em Erros Inatos do Metabolismo (LREIM) do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (anexo). O médico assistente assim como o próprio paciente, foram informados sobre o resultado do exame tão logo ele estivesse disponível. As informações coletadas relativas à história médica, histórico do diagnóstico e dados demográficos no prontuário do Serviço onde o paciente é acompanhado foram disponibilizadas aos profissionais que realizaram os testes laboratoriais através da fotocópia do Formulário para Coleta de Dados (anexo). Além disso, com a mesma amostra de urina previamente coletada foi realizada, adicionalmente, uma eletroforese de GAGs conforme protocolo do LREIM (anexo) a fim de direcionar a investigação. Uma amostra de sangue venoso para o ensaio enzimático seria coletada, caso necessário, para que pudéssemos confirmar os achados pela determinação da atividade enzimática específica.

RESULTADOS

Foram incluídos 55 pacientes sendo 28 (50,9%) do sexo masculino e 27 (49,1%) do sexo feminino com média de idade de 9 anos, sendo apenas 2 maiores de 18 anos.

Destes, 75% apresentaram altura normal para a idade segundo critérios médicos e curva de crescimento: 34,7% relataram que algum parente próximo também apresentava algum tipo de manifestação clínica osteo-articular.

Todos os pacientes relataram dor em articulações e 67,3% apresentavam rigidez articular.

Os resultados da triagem para MPS nos pacientes que não tinham diagnóstico de outra patologia que pudesse explicar as manifestações osteo-articulares presentes está relatado na tabela I.

Tabela 2 Resultados da Triagem para Mucopolissacaridose

Variáveis	n=55	IC 95%
GAG urinário – n(%)		
Normal	49 (89,1)	78,7 – 95,5
Alterado	6 (10,9)	4,5 – 21,3
Eletroforese – n(%)		
Padrão Normal	54 (98,2)	91,4 – 99,9
Padrão Alterado	1 (1,8)	0,1 – 8,6

Legenda: n (%) = número total e porcentagem; IC= Intervalo de confiança de 95%

Ao final, um paciente foi diagnosticado como alguma forma de Mucopolissacaridose. As variáveis quantitativas foram descritas por média, desvio padrão e mediana. As variáveis categóricas foram descritas por frequências absolutas e

relativas.

Para estimar parâmetros populacionais, o intervalo de 95% de confiança foi utilizado.

O nível de significância adotado foi de 5% e as análises foram realizadas no programa SPSS versão 18.0.

DISCUSSÃO

Através deste estudo obtivemos resultados que consideramos expressivos, uma vez que as Mucopolissacaridoses são doenças raras, pois sua incidência varia de 1:10.000 a 1:25.000 nascidos vivos, onde podemos afirmar que pacientes com problemas ósteo-articulares que procuram os centros de reumatologia e ortopedia, constituem sim um grupo de risco para as Mucopolissacaridoses merecendo um cuidado especial e atenção a esta enfermidade (Cabello 2010). Através deste, também tivemos a oportunidade de levantar a hipótese que esta prevalência pode estar aumentada quando buscamos estes casos em uma amostra de conveniência para MPS, uma vez que estes pacientes que já buscaram todos os prováveis diagnósticos para suas manifestações clínicas e não tiveram sucesso. Sendo assim, a mucopolissacaridose poderia explicar as manifestações clínicas encerrando a busca pelo diagnóstico. Para que possamos confirmar a hipótese levantada com esse estudo, seria desejável um estudo com um n amostral maior.

Do total de participantes deste estudo, 50,9% eram do sexo masculino e 49,1% do sexo feminino. Os pacientes foram escolhidos apenas por critérios clínicos, não importando variáveis como sexo, pois as Mucopolissacaridoses podem acometer ambos os sexos (exceto a MPS II, ligada ao X e raramente identificada em meninas) (Cabello 2010).

Todas as formas atenuadas de MPS podem ter o início dos sintomas em qualquer faixa etária de idade, pois ainda há uma atividade enzimática residual mínima que é inversamente proporcional ao acúmulo de GAG intralisossômico. Sendo assim, o grau

de comprometimento sistêmico é menor do que em outros casos de MPS. O comprometimento osteo-articular é comum a todas as MPS, incluindo: dores articulares, rigidez articular, deformidades ósseas leves, necrose de cabeça de fêmur, entre outros. Devido a isso, a procura por médicos reumatologistas e ortopedistas é comum nesses pacientes, constituindo assim, um grupo de conveniência para a busca de uma forma atenuada de MPS (Hendriksz 2011).

Um paciente do sexo masculino apresentou alterações significativas na dosagem de glicosaminoglicanos urinários e padrões alterados para a eletroforese deste mesmo composto. Conforme observado em sua história médica, ao nascimento pesava 3,2 kg e comprimento de 49 cm, parâmetros normais para um recém-nascido. Ainda no período perinatal foi internado por 12 dias devido a complicações cardiológicas, e aos 2 meses de vida iniciou com infecções recorrentes de vias aéreas superiores e aumento das amígdalas. As infecções foram cada vez ficando mais espaçadas, e aos 6 anos de idade eram raras. Hoje, com 15 anos pesa 43,4kg e tem altura de 1,56m, medidas abaixo dos padrões para idade. Exames adicionais como espirometria, eletrocardiograma de repouso, testes de função pulmonar, ecografia abdominal e teste de caminhada de 6 minutos tiveram resultados normais para a idade.

Este paciente apresentava uma escápula alada, significativa restrição articular de mãos, braços e punhos, limitação de extensão dos dedos, fígado palpável a 5cm, discreta hipoplasia tenar, discreta limitação de extensão das pernas e face ligeiramente tosca. Portanto, além dos problemas articulares, apresentava outros sinais e sintomas de mucopolissacaridose, confirmando o caráter multisistêmico da doença. O encaminhamento e realização dos testes de triagem para MPS na urina através da dosagem de Glicosaminoglicanos urinários e eletroforese destes mesmos compostos confirmaram o diagnóstico de Mucopolissacaridose e a dosagem dos GAGs urinários se

mostrou alterada, com 147ug/mg de creatinina (valores de referência para menores de 18 anos: 13-59 ug/mg de creatinina). A eletroforese de glicosaminoglicanos urinários mostrou um padrão alterado, com excesso de dermatan sulfato e de heparan sulfato, o que é observado nas MPS I, II e VII. Após este direcionamento, foram realizadas dosagens enzimáticas em sangue heparinizado conforme protocolo utilizado no Laboratório de Referência em Erros Inatos do Metabolismo do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, que indicou uma atividade enzimática deficiente de Iduronato sulfatase (1,3 mmol/h/mg de proteína, sendo o valor de referência de 31 a 110 mmol/h/mg de proteína), permitindo concluir pelo diagnóstico de Mucopolissacaridose tipo II (forma não neuropata).

O presente trabalho mostrou que 10,9% dos pacientes apresentaram discreta elevação na quantidade de GAG excretado na urina, achado para o qual não encontramos uma relação patogênica, uma vez que em outras patologias podemos observar a elevação de GAG urinário, como doenças do trato urinário inferior. Cabe ressaltar que não foram investigados todos os tipos de MPS (por exemplo, MPS IX ficou fora do painel de doenças investigadas), assim como os pacientes que já possuíam diagnóstico de alguma outra doença reumatológica foram excluídos das análises, entretanto o diagnóstico de outra patologia não exclui a Mucopolissacaridose, podendo explicar esse achado.

CONCLUSÕES

Este estudo foi o primeiro estudo realizado no Brasil em busca de formas atenuadas de MPS em pacientes com manifestações osteo-articulares. Os seus resultados encorajadores abrem perspectivas de outros estudos sobre a presença de formas atenuadas de MPS em grupos de risco. Ressaltamos a importância do melhor preparo dos profissionais médicos para suspeitar de uma doença rara, pois acreditamos que muitos casos de formas atenuadas de MPS possam estar sendo subdiagnosticados. Acreditamos que este trabalho possa ser usado como conduta médica na suspeita clínica de uma Mucopolissacaridose. Enfatizamos a importância do diagnóstico precoce para proporcionar um melhor manejo para o paciente, pois alguns tipos de MPS já possuem terapias específicas ou medidas gerais de manejo que alteram positivamente a história natural dessas doenças progressivas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amâncio, F. A. M. S., F.B.; Coelho, C.A.R (2007). "Investigação diagnóstica de erros inatos do metabolismo em um hospital universitário." *J. Bras. Patol. Med. Lab* **43**(3): 169-174.
- Araújo, A. P. Q. C. (2004). "Psychiatric features of metabolic disorders." *Archives of Clinical Psychiatry* **31**(6): 285-289.
- Beck, M. (2000). Mucopolysaccharidoses and Oligosaccharidoses *Inborn metabolic disease: diagnosis and treatment*. J. Fernandes, Saudubray, M., Van Der Bergh, G. **3**: 415-421.
- Brasil, R. M. "Cartilhas sobre MPS." Retrieved 01/01/2015, 2015.
- Brooks, D. A., G. J. Gibson, L. Karageorgos, L. K. Hein, E. F. Robertson and J. J. Hopwood (2005). "An index case for the attenuated end of the mucopolysaccharidosis type VI clinical spectrum." *Mol Genet Metab* **85**(3): 236-238.
- Cabello, J. F. R., M.V. M.; Segal, S.; Burin, M.G.; Vedolin, L.; Turra, G.; Matte, U.; Giugliani, R (2010). Mucopolissacaridosis. *Errores inatos em el metabolismo del niño*. Universitária: 225-288.
- Charrow, J., T. D. Alden, C. A. Breathnach, G. P. Frawley, C. J. Hendriksz, B. Link, W. G. Mackenzie, R. Manara, A. C. Offiah, M. L. Solano and M. Theroux (2015). "Diagnostic evaluation, monitoring, and perioperative management of spinal cord compression in patients with Morquio syndrome." *Mol Genet Metab* **114**(1): 11-18.
- Chaves, A. G. T., K.B.;Val, J.; Matsuyama, C.;Riskalla, P.E. (2003). Morquio's syndrome: case report and review. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*. **69**: 267-271.
- Cimaz, R., G. V. Coppa, I. Kone-Paut, B. Link, G. M. Pastores, M. R. Elorduy, C. Spencer, C. Thorne, N. Wulffraat and B. Manger (2009). "Joint contractures in the absence of inflammation may indicate mucopolysaccharidosis." *Pediatr Rheumatol Online J* **7**: 18.
- Cimaz, R. and F. La Torre (2014). "Mucopolysaccharidoses." *Curr Rheumatol Rep* **16**(1): 389.
- Clarke, L. A., J. E. Wraith, M. Beck, E. H. Kolodny, G. M. Pastores, J. Muenzer, D. M. Rapoport, K. I. Berger, M. Sidman, E. D. Kakkis and G. F. Cox (2009). "Long-term efficacy and safety of laronidase in the treatment of mucopolysaccharidosis I." *Pediatrics* **123**(1): 229-240.
- Coelho, J. C., M. Wajner, M. G. Burin, C. R. Vargas and R. Giugliani (1997). "Selective screening of 10,000 high-risk Brazilian patients for the detection of inborn errors of metabolism." *Eur J Pediatr* **156**(8): 650-654.
- Fumero, R. A. (2003). "Enfermedades heredometabólicas y embarazo." *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología* **29**(2).
- Haley, S. M., M. A. Fragala Pinkham, H. M. Dumas, P. Ni, A. M. Skrinar and G. F. Cox (2006). "A physical performance measure for individuals with mucopolysaccharidosis type I." *Dev Med Child Neurol* **48**(7): 576-581.
- Harmatz, P., D. Ketteridge, R. Giugliani, N. Guffon, E. L. Teles, M. C. Miranda, Z. F. Yu, S. J. Swiedler, J. J. Hopwood and M. V. S. Group (2005). "Direct comparison of measures of endurance, mobility, and joint function during enzyme-replacement therapy of mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome): results after 48 weeks in a phase 2 open-label clinical study of recombinant human N-acetylgalactosamine 4-sulfatase." *Pediatrics* **115**(6): e681-689.
- Hendriksz, C. (2011). "Improved diagnostic procedures in attenuated mucopolysaccharidosis." *Br J Hosp Med (Lond)* **72**(2): 91-95.
- Hendriksz, C. J., K. I. Berger, R. Giugliani, P. Harmatz, C. Kampmann, W. G. Mackenzie, J. Raiman, M. S. Villarreal and R. Savarirayan (2015). "International guidelines for the management and treatment of Morquio A syndrome." *Am J Med Genet A* **167**(1): 11-25.
- Jardim, L. B. and P. Ashton-Prolla (1996). "[Inborn errors of metabolism: practical guidelines for clinical diagnosis in acutely ill children and infants]." *J Pediatr (Rio J)* **72**(2): 63-70.
- Kan, S. H., M. Aoyagi-Scharber, S. Q. Le, J. Vincelette, K. Ohmi, S. Bullens, D. J. Wendt, T. M. Christianson, P. M. Tiger, J. R. Brown, R. Lawrence, B. K. Yip, J. Holtzinger, A. Bagri, D. Crippen-Harmon, K. N. Vondrak, Z. Chen, C. M. Hague, J. C. Woloszynek, D. S. Cheung, K. A. Webster, E. G. Adintori, M. J. Lo, W. Wong, P. A. Fitzpatrick, J. H. LeBowitz, B. E. Crawford, S. Bunting, P. I. Dickson and E. F. Neufeld (2014). "Delivery of an enzyme-IGFII fusion protein to the mouse brain is therapeutic for mucopolysaccharidosis type IIIB." *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(41): 14870-14875.
- Lehman, T. J., N. Miller, B. Norquist, L. Underhill and J. Keutzer (2011). "Diagnosis of the mucopolysaccharidoses." *Rheumatology (Oxford)* **50** Suppl 5: v41-48.
- Martins, A. M. (1999). "Inborn errors of metabolism: a clinical overview." *Sao Paulo Med J* **117**(6): 251-

265.

- Martins, A. M. (2003). Erros Inatos do Metabolismo: Abordagem Clínica.
- Matte, U., G. Yogalingam, D. Brooks, S. Leistner, I. Schwartz, L. Lima, D. Y. Norato, J. M. Brum, C. Beesley, B. Winchester, R. Giugliani and J. J. Hopwood (2003). "Identification and characterization of 13 new mutations in mucopolysaccharidosis type I patients." Mol Genet Metab **78**(1): 37-43.
- Matte, U. S. (1998). Caracterização Molecular de Pacientes com Mucopolissacaridose tipo I: Um estudo no Brasil Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do rio Grande do Sul - UFRGS.
- Meikle, P. J., J. J. Hopwood, A. E. Clague and W. F. Carey (1999). "Prevalence of lysosomal storage disorders." JAMA **281**(3): 249-254.
- Moore, D., M. J. Connock, E. Wraith and C. Lavery (2008). "The prevalence of and survival in Mucopolysaccharidosis I: Hurler, Hurler-Scheie and Scheie syndromes in the UK." Orphanet J Rare Dis **3**: 24.
- Muenzer, J. (2004). "The mucopolysaccharidoses: a heterogeneous group of disorders with variable pediatric presentations." J Pediatr **144**(5 Suppl): S27-34.
- Muenzer, J. (2011). "Overview of the mucopolysaccharidoses." Rheumatology (Oxford) **50 Suppl 5**: v4-12.
- Muenzer, J., J. E. Wraith, M. Beck, R. Giugliani, P. Harmatz, C. M. Eng, A. Vellodi, R. Martin, U. Ramaswami, M. Gucsavas-Calikoglu, S. Vijayaraghavan, S. Wendt, A. C. Puga, B. Ulbrich, M. Shinawi, M. Cleary, D. Piper, A. M. Conway and A. Kimura (2006). "A phase II/III clinical study of enzyme replacement therapy with idursulfase in mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome)." Genet Med **8**(8): 465-473.
- Nardi, N. B., L. A. K. Teixeira and E. F. A. Silva (2002). "Gene therapy." Ciência & Saúde Coletiva **7**(1): 109-116.
- Neufeld, E. and J. Muenzer (2001). The Mucopolysaccharidosis. The Metabolic and Molecular Bases of inherited disease. McGraw-Hill: 3421-3452.
- Pastores, G. M. (2008). "Laronidase (Aldurazyme): enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis type I." Expert Opin Biol Ther **8**(7): 1003-1009.
- Pastores, G. M., P. Arn, M. Beck, J. T. Clarke, N. Guffon, P. Kaplan, J. Muenzer, D. Y. Norato, E. Shapiro, J. Thomas, D. Viskochil and J. E. Wraith (2007). "The MPS I registry: design, methodology, and early findings of a global disease registry for monitoring patients with Mucopolysaccharidosis Type I." Mol Genet Metab **91**(1): 37-47.
- Peters, C., C. G. Steward, P. National Marrow Donor, R. International Bone Marrow Transplant and E. B. M. T. G. Working Party on Inborn Errors (2003). "Hematopoietic cell transplantation for inherited metabolic diseases: an overview of outcomes and practice guidelines." Bone Marrow Transplant **31**(4): 229-239.
- Saínez CM, M. C., Monteagudo A G-Q, (2002). "Errores innatos del Metabolismo. Enfermedades lisossomales/ Metabolism inborn errors. Lysosomal storage disease." Rev Cuba. Pediatr **74**(1): 68-76.
- Schwartz, I. V., M. G. Ribeiro, J. G. Mota, M. B. Toralles, P. Correia, D. Horovitz, E. S. Santos, I. L. Monlleo, A. C. Fett-Conte, R. P. Sobrinho, D. Y. Norato, A. C. Paula, C. A. Kim, A. R. Duarte, R. Boy, E. Valadares, M. De Michelena, P. Mabe, C. D. Martinhago, J. M. Pina-Neto, F. Kok, S. Leistner-Segal, M. G. Burin and R. Giugliani (2007). "A clinical study of 77 patients with mucopolysaccharidosis type II." Acta Paediatr Suppl **96**(455): 63-70.
- Schwartz, I. V., C. F. Souza and R. Giugliani (2008). "Treatment of inborn errors of metabolism." J Pediatr (Rio J) **84**(4 Suppl): S8-19.
- Schwartz IV., M. U., Leishner S., Giugliani R. (2001). Mucopolissacaridoses. Doenças Genéticas em Pediatria. Guanabara. **1**: 180-184.
- Sifuentes, M., R. Doroshov, R. Hoft, G. Mason, I. Walot, M. Diamant, S. Okazaki, K. Huff, G. F. Cox, S. J. Swiedler and E. D. Kakkis (2007). "A follow-up study of MPS I patients treated with laronidase enzyme replacement therapy for 6 years." Mol Genet Metab **90**(2): 171-180.
- Soliman, O. I., R. G. Timmermans, A. Nemes, W. B. Vletter, J. H. Wilson, F. J. ten Cate and M. L. Geleijnse (2007). "Cardiac abnormalities in adults with the attenuated form of mucopolysaccharidosis type I." J Inherit Metab Dis **30**(5): 750-757.
- Souza, C. F. M., Schwartz, I. V., Giugliani, R. (2002). "Triagem neonatal de distúrbios metabólicos." Ciênc. saúde coletiva **7**(1): 129-137.
- Taylor, C., P. Brady, A. O'Meara, D. Moore, F. Dowling and E. Fogarty (2008). "Mobility in Hurler syndrome." J Pediatr Orthop **28**(2): 163-168.
- Tomatsu, S., E. Yasuda, P. Patel, K. Ruhnke, T. Shimada, W. G. Mackenzie, R. Mason, M. M. Thacker, M. Theroux, A. M. Montano, C. J. Almeciga-Diaz, L. A. Barrera, Y. Chinen, W. S. Sly, D. Rowan, Y. Suzuki and T. Orii (2014). "Morquio A syndrome: diagnosis and current and future therapies." Pediatr Endocrinol Rev **12 Suppl 1**: 141-151.

- Vellodi, A. (2005). "Lysosomal storage disorders." *Br J Haematol* **128**(4): 413-431.
- Vieira, T., I. Schwartz, V. Munoz, L. Pinto, C. Steiner, M. Ribeiro, R. Boy, V. Ferraz, A. de Paula, C. Kim, A. Acosta and R. Giugliani (2008). "Mucopolysaccharidoses in Brazil: what happens from birth to biochemical diagnosis?" *Am J Med Genet A* **146A**(13): 1741-1747.
- Vijay, S. and J. E. Wraith (2005). "Clinical presentation and follow-up of patients with the attenuated phenotype of mucopolysaccharidosis type I." *Acta Paediatr* **94**(7): 872-877.
- Wajner, M. V., C.R.; Burin, M.; Giugliani, R.; Coelho, J. (2001). "Investigação de erros inatos do metabolismo." *Revista Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)* **3**: 343-360.
- Watson, H. A., R. J. Holley, K. J. Langford-Smith, F. L. Wilkinson, T. H. van Kuppevelt, R. F. Wynn, J. E. Wraith, C. L. Merry and B. W. Bigger (2014). "Heparan sulfate inhibits hematopoietic stem and progenitor cell migration and engraftment in mucopolysaccharidosis I." *J Biol Chem* **289**(52): 36194-36203.
- Wilcox, W. R. (2004). "Lysosomal storage disorders: the need for better pediatric recognition and comprehensive care." *J Pediatr* **144**(5 Suppl): S3-14.
- Wraith, J. E., L. A. Clarke, M. Beck, E. H. Kolodny, G. M. Pastores, J. Muenzer, D. M. Rapoport, K. I. Berger, S. J. Swiedler, E. D. Kakkis, T. Braakman, E. Chadbourne, K. Walton-Bowen and G. F. Cox (2004). "Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis I: a randomized, double-blinded, placebo-controlled, multinational study of recombinant human alpha-L-iduronidase (laronidase)." *J Pediatr* **144**(5): 581-588.

ANEXOS

ANEXO I- ARTIGO CIENTÍFICO EM LÍNGUA INGLESA

À ser publicado no “ Journal Of Inherited Metabolic Disease”

Screening for attenuated forms of mucopolysaccharidoses in patients with osteoarticular problems of unknown etiology

Thabata Caroline da Rocha Siqueira¹, Carolina Fischinger Moura de Souza², Paulo Lompa³, Mercedes Picarelli⁴, Ilóite Scheibel⁵, Fernanda Bender², Régis Guidobono², Maira Graeff Burin², Roberto Giugliani^{1,2,6}.

¹ Postgraduate Program in Child and Adolescent Health, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

² Medical Genetics Service, Hospital de Clinicas de Porto Alegre, RS, Brazil

³ Orthopedics and Traumatology Service, Hospital de Clinicas de Porto Alegre, RS, Brazil

⁴ Hospital São Lucas, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil

⁵ Grupo Hospitalar Conceição, Porto Alegre, RS, Brazil

⁶ Department of Genetics, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

Address correspondence to:
Thabata Caroline Rocha Siqueira
Medical Genetics Service
Hospital de Clinicas de Porto Alegre
Ramiro Barcelos 2350
Porto Alegre, RS 90035-903
Brazil.
siqueirathabata@gmail.com

Word count (text): 1747 words

Word count (abstract): 232 words

Number of figures and tables: 0

Abstract

Introduction: The mucopolysaccharidoses (MPS) are 11 genetic lysosomal storage diseases (LSDs) that are included in the Inborn Errors of Metabolism (IEM). These diseases are multisystemic conditions that affect the entire body, with variations in the clinical presentation and specific treatments available depending on the type of MPS. Nearly all MPS disorders compromise the osteoarticular system in different ways, and virtually all patients have altered urinary excretion of glycosaminoglycans (GAGs). MPS are rare diseases that are underdiagnosed due to health care professionals' lack of awareness, poor access to screening and diagnostic methods, and their extensive clinical heterogeneity; attenuated forms may also occur, which can make diagnosis of MPS more difficult. *Methods:* This study was conducted from March 2012 to January 2014 and included 55 patients at rheumatology and/or orthopedics services in Porto Alegre, Brazil. The screened patients presented with articular manifestations with no defined etiology. These patients were tested by quantitative and qualitative assessment of urinary GAGs. *Results and Discussion:* Among the 55 cases investigated, one 15-year-old patient exhibited increased urinary GAG excretion; this patient was subsequently diagnosed with an attenuated form of MPS II, which was previously undetected. *Conclusion:* Although the proportion of patients with MPS identified in the study sample was small (1/55), this study shows that these diseases are underdiagnosed and that systematic screening can help identify patients who may benefit from the treatments available for several MPS types.

Keywords: Mucopolysaccharidosis, Lysosomal Storage Diseases, glycosaminoglycans, Hunter Syndrome, Selective Screening

Synopsis: Because attenuated forms of mucopolysaccharidoses may be difficult to diagnose, selective screening in high-risk patients may help identify affected patients who could benefit from specific therapies available for several MPS types.

Contributions of the individual authors: TCRS interviewed the patients, obtained informed consent, collected the samples, and drafted the first version of the manuscript. CFMS, PL, MP, and IS referred patients for inclusion in the study, provided clinical information and reviewed the final version of the manuscript. FB, and MB performed the laboratory tests needed for screening and diagnosis and reviewed the final version of the manuscript. RG supervised the project, provided guidance in all steps and revised the final version of the manuscript.

Competing interest statement: RG received travel grants, speaker honoraria, and/or investigator fees from Actelion, Amicus, Biomarin, Genzyme, Shire, and Synageva; all other authors have no competing interests to disclose.

Details of funding for all authors: This study was supported by an institutional grant from FIPE/HCPA and by a research grant from CNPq/Brazil. RG received educational and research grants from Actelion, Amicus, Biomarin, Genzyme, Shire and Synageva, which are not related to the present study. All other authors have no funding sources to disclose.

Details of ethics approval: This study was approved by the Institutional Review Board (GPPG/HCPA) in 17/07/2012, with the number 11-0557.

Introduction

The mucopolysaccharidoses (MPS) are inborn errors of metabolism involving the glycosaminoglycans (GAGs), which are formed by sugar chains bound to a protein core structure and are a major component of the connective tissue matrix. Deficiencies in the enzymes involved in GAG degradation lead to the accumulation of GAGs in the lysosomes, particularly in organs such as the liver, spleen, heart, and cornea, among others, and result in marked osteoarticular impairment (Neufeld and Muenzer 2001).

With the exception of MPS II (Hunter syndrome, inherited recessive X-linked mode), all MPS are autosomal recessive. Currently, there are 11 different enzyme deficiencies known to result in MPS. MPS are rare conditions, affecting an estimated 1 in 22,000 individuals (Poorthuis et al 1999; Meikle et al 1999). Currently, enzyme replacement therapy is available for 3 MPS types (I, II, and VI) and in development for 4 other types (IIIA, IIIB, IVA, and VII).

The clinical manifestations of each condition vary greatly, which may be related not only to the varied underlying genotypes but also to other poorly understood factors (Giugliani 2012). Because of the clinical heterogeneity of these conditions, early diagnosis is most likely for patients who exhibit severe phenotypes, and diagnosis may be delayed in the attenuated forms (Hendriksz 2011).

Stiffness occurs in patients with all types of MPS, except MPS IV, which is associated with ligament laxity. In cases of attenuated disease, specialists in rheumatology and orthopedics are often sought before a diagnosis is reached because of the common osteoarticular problems in MPS patients, which are often the first symptoms to appear. These specialists should be prepared to recognize and diagnose MPS or rule out a MPS diagnosis and refer the patient to an appropriate management. However, recognition and diagnosis can be a challenge because the attenuated forms of MPS manifest with subtle and/or nonspecific symptoms. Incorrect diagnoses common to these cases include autoimmune diseases, muscular dystrophies, connective tissue disease, osteogenesis imperfecta, polymyositis, dermatomyositis, polyneuropathy, fibromyalgia, rheumatoid arthritis, scleroderma, juvenile idiopathic arthritis, spondyloarthritis, Legg-Calve-Perthes disease, and other systemic rheumatic conditions including "growing pain" (Hendriksz 2011). One study performed by Cimaz et al (2009) showed that only 13% of pediatric rheumatologists and 19% of rheumatologists were able to detect MPS when clinical cases of an 8-year-old girl and a 23-year-old woman

were presented, respectively, in which both had classic symptoms and articular manifestations of MPS.

The goal of the present study was to evaluate the frequency of MPS in a sample of rheumatology and orthopedics patients with joint complaints of unknown etiology after a typical clinical and laboratory investigation was performed.

Materials and Methods

This study was conducted from March 2012 to January 2014 in rheumatology and orthopedics outpatient clinics in Porto Alegre, Brazil and was previously approved by the research ethics committee of Hospital de Clinicas de Porto Alegre (University Hospital).

This study had a cross-sectional design, and the main inclusion criterion was the presence of osteoarticular manifestations that had unknown etiology after a typical clinical and laboratory investigation was performed.

The study included 55 patients with symptoms that could not be explained by any diagnosis. Data were collected from these patients, as well as a random urine sample, which was evaluated for the excretion of GAGs using a quantitative dimethylene blue colorimetric assay (De Jong et al 1992), and electrophoresis for qualitative evaluation of the GAGs species (Pennock 1976; Cappelletti et al 1979).

Results and Discussion

Of the 55 patients included in the study, 28 were male and 27 were female, with ages ranging from 3 to 21 years (mean age of 9 years). All patients reported discomfort or joint pain, and 2/3 of the patients also complained of stiffness.

The results of the urinary GAG analysis allowed us to identify 6 cases with increased GAG excretion when reference values were adjusted for age. In 5 of these cases, the results could not be confirmed in a second sample, and the qualitative analysis of the GAG species was normal; thus, a MPS diagnosis was ruled out. This 10% false positive rate was considered acceptable because, as in the present study, additional tests are available to confirm each diagnosis.

In one case, an increase in GAGs was observed along with an altered qualitative pattern of GAG species. This patient, a 15-year-old male, was referred to the Pediatric Orthopedics service with joint limitation in his hands and a limitation of extension in his

fingers. An evaluation of GAG excretion indicated a urine level of 147 $\mu\text{g}/\text{mg}$ creatinine (reference value for this age: 13-59 $\mu\text{g}/\text{mg}$ creatinine). The electrophoresis analysis showed an abnormal pattern of urinary GAGs in the presence of dermatan sulfate and heparan sulfate. As this pattern may be indicative of MPS I, II, or VII, further diagnostic tests were performed to analyze the activities of the specific enzymes deficient in these three MPS types (alpha-iduronidase, iduronate sulfatase, and beta-glucuronidase, respectively).

Iduronate sulfatase levels within the leukocytes of this patient were lower than normal (1.3 $\mu\text{mol}/\text{h}/\text{mg}$ protein compared with the reference range of 31-110 $\mu\text{mol}/\text{h}/\text{mg}$). This result, coupled with the normal activity of another sulfatase (Arylsulfatase B), ruled out the possibility of multiple sulfatase deficiency and confirmed the diagnosis of Hunter syndrome (MPS II).

Although our study included only 55 patients, the finding of a positive MPS case can be considered quite significant as the frequency of MPS is estimated to be 1 in 22,000 in the general population (Poorthuis et al 1999; Meikle et al 1999).

The attenuated forms of MPS have less systemic involvement than the classical forms, but over time, the osteoarticular manifestations can be significant. Joint pain, joint limitation, mild bone deformities, and necrosis of the femoral head can occur. Because of these symptoms, the demand for rheumatology and/or orthopedic services is common in these cases, making the patients treated by these specialists target groups for the detection of attenuated forms of MPS (Hendriksz 2011).

The history of the diagnosed patient indicated that he weighed 3.2 kg and was 49.0 cm long at birth, which is considered normal for babies born at term. The patient was the child of healthy, non-consanguineous parents with no known family history of MPS. At 2 months of life, the patient began to suffer from recurrent infections of the upper airways, which became increasingly less frequent until the age of 6, when the infections became rare. As recorded in this study, his weight at age 15 was 43.4 kg, and his height was 1.56 m, both of which are below average for his age. A closer examination revealed the presence of a winged scapula, palpable liver 5 cm below the costal margin, and a slightly infiltrated face. The results of additional tests, such as spirometry, resting electrocardiogram, pulmonary function tests, abdominal ultrasound, and a 6-minute walk test, were normal for his age. Together with the biochemical results, these findings established the clinical diagnosis of a non-neuronopathic (attenuated) form of MPS II, a condition for which enzyme replacement therapy with

idursulfase is indicated and may positively modify the natural history of the disease in this patient.

Conclusion

Although the proportion of patients with MPS identified in this study sample was small (1/55), this study indicates that underdiagnosis of these diseases can occur and that systematic screening in patients with articular changes of unknown etiology may help to identify patients with MPS, many of whom may have access to available treatment measures. In addition, their families may benefit from genetic counseling, prenatal diagnosis, and the early detection of new cases.

Acknowledgments

The authors are grateful to CNPq (Brazilian Council for Scientific and Technological Development), to FIPE/HCPA, to the Medical Genetics Service of Hospital de Clinicas de Porto Alegre, particularly its Laboratory of Inborn Errors of Metabolism (LEIM), and to the MPS Brazil Network.

References

Cappelletti R, Del Rosso M, Chiarrugi VP (1979) A new eletrophoretic method for complete separation of all known animal glycosaminoglycans in a monodimension run. *Anal Biochem* 99: 311–315.

Cimaz R, Coppa GV, Koné-Paut I, et al (2009) Joint contractures in the absence of inflammation may indicate mucopolysaccharidosis. *Pediatr Rheumatol Online J* 7: 18.

De Jong JG, Wevers RA, Liebrand-van Sambeek R (1992) Measuring urinary glycosaminoglycans in the presence of protein: an improved screening procedure for Mucopolysaccharidoses based on dimethylmethylene blue. *Clin Chem* 38: 803–807.

Giugliani R (2012) Mucopolysaccharidoses: from understanding to treatment, a century of discoveries. *Genet Mol Biol* 35: 924–931.

Hendriksz C (2011) Improved diagnostic procedures in attenuated mucopolysaccharidosis. *Br J Hosp Med (London)* 72: 91–95.

Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF (1999). Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA* 281: 249–254.

Neufeld and Muenzer (2001) The Mucopolysaccharidoses. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill, 3421–3452.

Pennock CA (1976) A review and selection of simple laboratory methods used for the study of glycosaminoglycan and the diagnosis of the mucopolysaccharidoses. *J Clin Path* 29: 111–123.

Poorthuis BJ, Wevers RA, Kleijer WJ et al (1999) The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. *Hum Genet* 105: 151–156.

ANEXO II: MODELO CARTA CONVITE DESTINADA AOS MÉDICOS

Prezado Dr. _____,

É com satisfação que entramos em contato para convidá-lo a colaborar conosco no projeto de pesquisa intitulado: **TRIAGEM DE FORMAS ATENUADAS DE MUCOPOLISSACARIDOSE (MPS) EM PACIENTES COM PROBLEMAS ARTICULARES SEM ETIOLOGIA DEFINIDA.**

As MPS constituem um grupo de doenças genéticas raras que acometem o sistema músculo-esquelético, causando problemas articulares freqüentes, entre outras manifestações multissistêmicas. Pacientes que procuram os centros de Reumatologia e Ortopedia apresentando queixas articulares podem eventualmente apresentar alguma forma atenuada de Mucopolissacaridose. Muitos destes sintomas clínicos de MPS podem ser confundidos com outras doenças. Assim sendo, o presente estudo pretende investigar pacientes com manifestações osteo-articulares sem etiologia definida a fim de determinar se estes pacientes apresentam uma forma atenuada de MPS.

Caso tenha pacientes que apresentem estas características, e se for do seu interesse, entre em contato conosco para que possamos fornecer mais informações sobre o estudo.

Aguardaremos um retorno sobre o seu interesse em colaborar conosco e colocamo-nos à disposição para esclarecimentos adicionais.

Desde já, agradecemos sua atenção.

Atenciosamente,

Roberto Giugliani
Pesquisador Responsável

Thabata Siqueira
Aluna de Mestrado PPGSCA

***ANEXO III - TERMO DE CONCORDÂNCIA PARA PARTICIPAÇÃO
EM PROJETO DE PESQUISA.***

Porto Alegre, de de 2012.

Dados do Centro de Reumatologia/Ortopedia:

Nome do Serviço/ Centro:

Responsável:

Endereço:

Bairro:

Cep:

Cidade:

Telefone:

E-mail:

Como responsável pelo Serviço de Reumatologia / Clínica acima referida, declaro que estou de acordo em participar do projeto de Pesquisa: **TRIAGEM DE FORMAS ATENUADAS DE MUCOPOLISSACARIDOSE (MPS) EM PACIENTES COM PROBLEMAS ARTICULARES SEM ETIOLOGIA DEFINIDA.**

Assinatura/ Carimbo

Nome do Responsável:

Registro Profissional:

Data: ____ / ____ / _____

ANEXO IV: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DIRIGIDO AO PACIENTE ADULTO/ MAIOR

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido dirigido ao Paciente adulto/ maior.

Você está sendo convidado a participar da pesquisa denominada **Triagem de formas atenuadas de Mucopolissacaridoses em pacientes com problemas articulares**, desenvolvida pelo Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SGM-HCPA). Este projeto tem como objetivo investigar formas atenuadas de Mucopolissacaridose (MPS) em pacientes com problemas articulares sem causa definida. As MPS são doenças genéticas raras e uma das manifestações desta doença são os problemas articulares. Serão convidados a participar deste projeto pacientes de qualquer idade que apresentem problemas articulares e não tenham diagnóstico definido.

Os procedimentos que serão realizados neste estudo com você, caso concorde com a participação, são:

- **Coleta de dados demográficos, história médica e histórico do diagnóstico:** serão coletadas informações do seu prontuário médico, no serviço onde você é acompanhado. As informações coletadas serão relacionadas à história médica e outras informações relevantes que serão importantes ao longo do estudo.

- **Coleta de urina:** será realizada uma coleta de urina na qual será obtido o total de 50 mL de urina em pote pequeno. Esta urina será utilizada para investigar a presença de excesso de Glicosaminoglicanos (GAGs) ou Mucopolissacarídeos que podem sugerir o diagnóstico de MPS. Caso este exame esteja com o resultado alterado, um outro exame na urina será realizado, chamado eletroforese de GAGs, para ver qual GAG está aumentado.

- **Coleta de sangue:** se os resultados dos exames na urina estiverem alterados, será realizada uma coleta de sangue na qual será obtido o total de 25 mL de sangue (aproximadamente 5 colheres de sopa). Este sangue será utilizado para confirmar o diagnóstico.

Ao participar deste estudo, você corre o risco de se sentir desconfortável em responder algumas perguntas para o pesquisador sobre a história da sua saúde. Você poderá sentir um desconforto e uma leve dor durante a punção para a coleta de sangue.

Iniciais do paciente: _____

Iniciais do investigador: _____

passageira.

O benefício da participação neste estudo consiste na possibilidade do diagnóstico correto da sua doença, ou ser descartada a hipótese de MPS como causa dos problemas articulares que você apresenta, assim como o encaminhamento ao serviço de referência. Além, disso você ajudará a gerar mais conhecimento sobre a frequência desta doença na população.

As informações e as amostras coletadas serão utilizadas somente para este estudo e seu nome assim como dos demais pacientes será mantido em sigilo.

A participação é voluntária. Caso você opte pela não participação neste projeto, não haverá nenhum prejuízo.

Você poderá fazer todas as perguntas que julgar necessárias antes de decidir sobre a participação no estudo. O pesquisador responsável por este projeto é o Dr. Roberto Giugliani. Ele e sua equipe estão à disposição pelos telefones (51) 3359 6347 ou (51) 8111 8379 para atender você em qualquer momento que for necessário.

Você também pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA para buscar informações sobre o estudo pelo telefone (51) 3359 8304.

Se você concordar com a participação neste estudo, será solicitado que você assine duas vias deste documento. O pesquisador responsável também assinará as duas vias e fornecerá uma via para você.

Você concorda em fornecer estas informações para uso neste projeto de pesquisa? () Sim () Não

Você concorda com a coleta de amostras de urina e de sangue do para uso neste projeto de pesquisa? () Sim () Não

PARTICIPANTE

Nome Completo: _____

Assinatura: _____ Data: _____

RG ou CPF: _____

PESQUISADOR

Nome Completo: _____

Assinatura: _____ Data: _____

ANEXO V: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DIRIGIDO AO RESPONSÁVEL

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido dirigido ao responsável

Seu filho/sua filha está sendo convidado a participar da pesquisa denominada **Triagem de formas atenuadas de Mucopolissacaridoses em pacientes com problemas articulares**, desenvolvida pelo Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SGM-HCPA). Este projeto tem como objetivo investigar formas atenuadas de Mucopolissacaridose (MPS) em pacientes com problemas articulares sem causa definida. As MPS são doenças genéticas raras e uma das manifestações desta doença são os problemas articulares. Serão convidados a participar deste projeto pacientes de qualquer idade que apresentem problemas articulares e não tenham diagnóstico definido.

Os procedimentos que serão realizados neste estudo com seu filho/sua filha, caso você concorde com a participação, são:

- **Coleta de dados demográficos, história médica e histórico do diagnóstico:** serão coletadas informações do prontuário médico de seu filho/sua filha, no serviço onde ele/ela é acompanhado. As informações coletadas serão relacionadas à história médica e outras informações relevantes que serão importantes ao longo do estudo.

- **Coleta de urina:** será realizada uma coleta de urina na qual será obtido o total de 50 mL de urina em pote pequeno. Esta urina será utilizada para investigar a presença de excesso de Glicosaminoglicanos (GAGs) ou Mucopolissacarídeos que podem sugerir o diagnóstico de MPS. Caso este exame esteja com o resultado alterado, um outro exame na urina será realizado, chamado eletroforese de GAGs, para ver qual GAG está aumentado.

- **Coleta de sangue:** se os resultados dos exames na urina estiverem alterados, será realizada uma coleta de sangue na qual será obtido o total de 25 mL de sangue (aproximadamente 5 colheres de sopa). Este sangue será utilizado para confirmar o diagnóstico.

Ao participar deste estudo, seu filho/sua filha corre o risco de se sentir desconfortável em responder algumas perguntas para o pesquisador sobre a história da sua saúde. Seu filho/ sua filha poderá sentir um desconforto e uma leve dor durante a

Iniciais do paciente/representante legal: _____

Iniciais do investigador: _____

punção para a coleta de sangue. Porém, esta dor é leve e passageira.

O benefício da participação neste estudo consiste na possibilidade do diagnóstico correto da doença do seu filho/sua filha, ou ser descartada a hipótese de MPS como causa dos problemas articulares que seu filho/sua filha apresenta. Além, disso você ajudará a gerar mais conhecimento sobre a frequência desta doença na população.

As informações e as amostras coletadas serão utilizadas somente para este estudo e o nome dos pacientes será mantido em sigilo.

A participação é voluntária. Caso você opte pela não participação do seu filho/sua filha neste projeto, não haverá nenhum prejuízo.

Você poderá fazer todas as perguntas que julgar necessárias antes de decidir sobre a participação no estudo. O pesquisador responsável por este projeto é o Dr. Roberto Giugliani. Ele e sua equipe estão à disposição pelos telefones (51) 3359 6347 ou (51) 8111 8379 para atender você em qualquer momento que for necessário.

Você também pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA para buscar informações sobre o estudo pelo telefone (51) 3359 8304.

Se você concordar com a participação neste estudo, será solicitado que você assine duas vias deste documento. O pesquisador responsável também assinará as duas vias e fornecerá uma via para você.

Você concorda em fornecer as informações de seu filho/sua filha para uso neste projeto de pesquisa? () Sim () Não

Você concorda com a coleta de amostras de urina e de sangue do seu filho/sua filha para uso neste projeto de pesquisa? () Sim () Não

PARTICIPANTE

Nome Completo: _____

Assinatura: _____ Data: _____

REPRESENTANTE LEGAL:

Nome Completo: _____

Assinatura: _____ Data: _____

PESQUISADOR

Nome Completo: _____

Assinatura: _____ Data: _____

ANEXO VI: TERMO DE ASSENTIMENTO

TERMO DE ASSENTIMENTO DA CRIANÇA

Nome do estudo: *Triagem de formas atenuadas de Mucopolissacaridose (MPS) em pacientes com problemas articulares.*

Informações sobre o pesquisador:

Hospital de Clínicas de Porto Alegre - Rua Ramiro Barcelos, 2350 – Serviço de Genética Médica - 3º andar, Porto Alegre - RS- Brasil - 90035-903

Informações de contato de emergência dia e noite:

Você poderá contatar a equipe do estudo pelos telefones: (51) 33596347 e (51) 81118379.

1. POR QUE ESTÃO ME CONVIDANDO PARA PARTICIPAR DESTE ESTUDO CLÍNICO?

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa por apresentar problemas articulares sem causa definida e queremos saber o que está causando estes problemas. Leia ou ouça com atenção estas informações e pergunte aos seus pais ou ao médico caso tenha alguma dúvida.

2. POR QUE ESTE ESTUDO ESTÁ SENDO FEITO?

Esta pesquisa está sendo feita pois muitos pacientes que tem problemas nas articulações e não tem diagnóstico podem sofrer de uma doença chamada de Mucopolissacaridose conhecida também como MPS.

Esta doença é genética, ou seja, as pessoas já nascem com ela. Gostaríamos de fazer algumas perguntas e alguns exames com você para saber se o que causa seus problemas articulares é uma doença chamada MPS.

3. O QUE IRÁ ACONTECERÁ COMIGO NESTE ESTUDO?

Você não é obrigado a participar deste estudo se não quiser, mas caso você queira participar os médicos farão algumas perguntas para você e para seus pais e alguns exames para que possamos saber se você tem MPS. Primeiro faremos uma coleta de urina em um “potinho”. Se for necessário, iremos coletar uma amostra de sangue para confirmar se você tem MPS.

4. PODE ACONTECER ALGUMA COISA RUIM COMIGO?

A única coisa de ruim que poderá acontecer é você se sentir desconfortável na coleta de sangue e urina.

5. E SE EU NÃO QUISE FAZER ISTO?

Você não é obrigado a participar deste estudo se não quiser. Mesmo que responda “sim” agora, você poderá mudar de ideia mais tarde.

6. PARA QUEM POSSO PERGUNTAR SE EU TIVER DÚVIDAS?

Caso tenha alguma dúvida a respeito deste estudo, pergunte aos seus pais ou responsáveis, ao seu médico ou poderá ligar para a equipe do estudo através dos telefones: (51) 33596347 e (51) 81118379.

7. MINHA DECISÃO

- Tive tempo para pensar a respeito deste estudo e para fazer perguntas.*
- Entendo o que irá acontecer se eu participar deste estudo.*
- Concordo em participar deste estudo.*
- Sei que eu posso sair do estudo a qualquer momento.*

Assinatura do participante: _____

Data: _____

Nome do participante (em letra de forma): _____

8. ASSINATURA DO PESQUISADOR

Confirmo que o estudo foi explicado e que respondi a todas as dúvidas do paciente.

Assinatura do pesquisador:

Data: _____ Hora: _____

Nome do pesquisador (em letra de forma):

ANEXO VII : FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS

**FORMULÁRIO DE COLETAS DE DADOS PARA A PESQUISA:
Triagem de formas atenuadas de Mucopolissacaridose em pacientes com
problemas articulares.**

Nome completo: _____

Sexo: () Feminino () Masculino Data de nascimento: _____

Idade: _____ Peso: _____ Altura: _____

Altura normal para a idade: () Sim () Não

Cidade de Origem: _____ Telefone: _____

E-mail: _____

Centro de Reumatologia: _____ Médico Responsável: _____

Nome completo do Pai: _____

Nome completo da mãe: _____

Algum parente próximo apresenta manifestações articulares semelhantes?

() Sim () Não

Se sim, qual o parentesco? _____

Quais as queixas deste? _____

Sintomas:

Queixa	Data de início dos Sintomas	Piorou ou Melhorou	Suspeitas Clínicas

Exames Laboratoriais:

Exame	Data	Motivo	Resultado	Comentários

Alguma hospitalização nos últimos anos? () Sim () Não

Se sim, qual motivo e tempo de internação: _____

Informações adicionais relevantes (medicamentos usuais, outras patologias, cirurgias): _____

ANEXO VIII: TERMO DE COMPROMISSO PARA UTILIZAÇÃO DE DADOS INSTITUCIONAIS



Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação

Termo de Compromisso para Utilização de Dados Institucionais

Título do Projeto

	Cadastro no GPPG
--	-------------------------

Os pesquisadores do presente projeto se comprometem a preservar as informações institucionais que serão coletadas em bases de dados do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Concordam, igualmente, que estas informações serão utilizadas única e exclusivamente para execução do presente projeto. As informações somente poderão ser divulgadas em atividades acadêmicas e científicas, no contexto do projeto de pesquisa aprovado.

Porto Alegre, ___ de _____ de 20__.

Nome dos Pesquisadores	Assinatura

ANEXO IX: PROTOCOLO DE DOSAGEM DE GAGs NA URINA

DOSAGEM DE GAGS NA URINA

I) REAGENTES:

1. Condroitin sulfato A (se usa o A – o B é o dermatan)
2. Tampão formato de sódio
3. Corante DMB
4. Tris

II) PREPARO:

1. Condroitin sulfato- SOLUÇÃO MÃE:
 - a) Pesar 20 mg de condroitim sulfato e diluir em 10 ml de água destilada (balão volumétrico)
 - b) Diluir 1/10 solução mãe: 1mL + 9 mL de água dest (balão volumétrico) – alíquotar (solução de uso)
 - c) Guardar no freezer armazenado em eppendorfs.
2. Tampão formato de sódio pH 3,3 55mM:
 - a) Pesar 3,74g de formato de sódio e diluir em 1000ml de água destilada.
 - b) Acertar o pH para 3,3 com ácido fórmico.
 - c) Guardar na geladeira.
3. Corante DMB:
 - a) Pesar 10,7 mg do corante DMB e diluir em 100 ml de Tampão formato de sódio.
 - b) Congelar como solução estoque 10 vezes concentrada.
 - c) Diluir na proporção 1:10 com o Tampão formato de sódio na hora do uso.
4. Tris hidroximetil aminometano:
 - a) Pesar o tris de acordo com a quantidade de corante a ser usada e diluir com água destilada na hora do uso, utilizando agitação sem aquecimento.

1ml Tris – 10 ml DMB

2,422g Tris – 10ml água destilada

III) PROCEDIMENTO:

1. Fazer uma curva padrão com 6 pontos de diluição e 1 tubo branco. No branco, colocar apenas água. Nos demais, colocar condroitim sulfato diluído conforme o esquema:

	CS (µl)	Água (µl)	Concentr.
branco	0	500	-
2	10	490	2
3	20	480	4
4	40	460	8
5	60	440	12
6	80	420	16
7	100	400	20

2. Centrifugar cada amostra de urina por 10 minutos a 2000/3000 rpm para precipitar o sedimento. (**PS:** Amostras de líquido amniótico não devem ser centrifugadas)
3. Diluir 250 µl de urina centrifugada em 250 µl de água destilada.
4. Agitar em vórtex os tubos das amostras e os tubos da curva para homogeneizar.
5. Adicionar a cada tubo 2,5 ml da solução do corante DMB diluído 10 vezes em Tampão formato de sódio junto com o tris diluído em água **na hora da leitura**. Adicionar e ler no mesmo momento em espectrofotômetro com absorbância de 530 nm, ou seja a adição do DMB é feita um a um no momento da leitura.

IV) CÁLCULOS:

1. Descontar o branco de cada amostra, inclusive as da curva.
2. Fazer o cálculo do Qm de cada tubo da curva, dividindo a concentração pela (absorbância – branco).
3. Calcular o Qm médio da curva.
4. Cálculo da amostra :

$$\text{(absorbância – branco) X Qm X 4000 / creatinina = resultado em ug/mg creat}$$

$$\text{Resultado em mg/g / 8,84 = resultado em mg/mmol CREA}$$

5. O resultado é expresso em ug/mg creat
6. Resultado em mg/L (controle de qualidade):

$$\text{(absorbância – branco) X Qm X 4}$$

V) DILUIÇÃO

Para leituras acima de 0,300 de Abs, o método não detecta. Para estas amostras, fazer uma diluição:

- a) Diluição 1/5: Diluir 100µl de urina em 400µl de água destilada; pipetar 250µl dessa amostra e 250µl de água destilada. Multiplicar o cálculo por 5.

- b) Diluição 1/10: Diluir 100µl de urina em 900µl de água e pipetar, então, 250µl dessa amostra com 250µl de água destilada. Multiplicar o cálculo por 10.

VI) INTERPRETAÇÃO

Comparar o resultado obtido com a tabela de valores padronizados da excreção de GAGS na urina, de acordo com a idade do paciente. Resultados que se apresentam mais altos do que o padrão podem indicar um acúmulo de GAGS, podendo diagnosticar uma mucopolissacaridose.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA:

De Jong J. G. N., Wevers R. A . Liebrand-van Sambeek R. Measuring urinary glycosaminoglycans in the presence of protein: an improved screening procedure for Mucopolysaccharidoses based on dimethylmethylene blue. Clin. Chem., 1992, 38/6, 803-7.

ANEXO X: PROTOCOLO PARA ELETROFORESE DE GLICOSAMINOGLICANOS NA URINA

ELETROFORESE DE GLICOSAMINOGLICANOS

Adaptado do protocolo descrito por Alfredo Uribe

Princípio

A separação de glicosaminoglicanos (GAGs) por este método, baseia-se na separação de cada um dos componentes dos GAGs urinários (condroitin sulfato, queratan sulfato, heparan sulfato e dermatan sulfato) em um campo elétrico descontinuo sobre um gel de agarose, usando também as propriedades de solubilidade diferencial em concentrações de etanol.

Amostra

Glicosaminoglicanos extraídos e purificados a partir da amostra de urina (reportar-se a técnica da cromatografia de glicosaminoglicanos)

Material

1. Placa de vidro 12x15cm
2. Nivelador e pente de impressão
3. Agarose 1% em acetato de bário 0,15M pH 5,0
4. Acetato de bário 0,3 pH 5,0 acidificado com ácido acético glacial
5. Acetato de bário 0,15M pH 5,0 acidificado com ácido acético glacial
6. Etanol p.a. 50% em acetato de bário 0,15M pH 5,0
7. Etanol p. a. 35% em acetato de bário 0,15M pH 5,0
8. Azul de toluidina 1% em etanol:água:ácido acético(66,5:28,5:05)
9. Padrões: Condroitin sulfato, dermatan sulfato, queratan sulfato e heparan sulfato: 2mg/ml água dest.
10. Papel Whatmann
11. Microseringa para aplicação das amostras

Preparo dos reagentes

1. **Gel de agarose 1%** (no momento do procedimento)
 - Pesar 800mg de agarose + 80ml de acetato de bário 0,15M pH 5,0
 - Levar ao microondas até a completa dissolução da agarose
 - Nivelar a placa de vidro com nivelador
 - Derramar o gel de agarose no centro da placa até preenchê-la completamente

- Colocar o pente para a formação dos poços e aguardar a solidificação (\pm 10 min.)
 - Após retirar o pente com cuidado
2. **Acetato de bário 0,3M (P.M. 255,43g)**
 - Pesar 76,63g de acetato de bário e diluir em 1 litro de água dest.
 - Ajustar pH 5,0 com ácido acético glacial
 3. **Acetato de bário 0,15M**
 - Pesar 38,31g de acetato de bário e diluir em 1 litro de água dest.
 - Ajustar pH 5,0 com ácido acético glacial
 4. **Etanol 50%**
 - 250ml de etanol p.a. + 250ml de acetato de bário 0,15M
 5. **Etanol 35%**
 - 175ml de etanol p.a. + 325ml de acetato de bário 0,15M
 6. **Azul de toluidina 1%**
 - Pesar 2,5g de azul de toluidina e adicionar 166ml de etanol p.a. + 72ml de água dest. + 12ml de ácido acético

PROCEDIMENTO

Preparo da placa

1. Organizar as amostras a serem aplicadas
2. Aplicar 5 μ l de amostra em cada poço
3. Aplicar, no 1º poço das extremidades, o padrão de condroitin sulfato e no poço central o padrão de queratan sulfato
4. Colocar a placa na cuba de eletroforese centralizando-a

Corrida

1. Colocar tampão acetato de bário 0,3M pH 5,0 nos compartimentos da cuba de eletroforese
2. Colocar a placa, com as amostras e padrões já aplicados, na cuba centralizando-a
3. Encostar tiras de papel Whatmann nas extremidades da placa para que o tampão entre em contato com o gel (umedecer bem o papel com o tampão evitando derramar sobre o gel)
4. Programar a fonte na voltagem de 70 a 100volts/60-70 mA
5. **1ª corrida** em torno de 1 hora e após retirar a placa da cuba de eletroforese e mergulhá-la na solução de etanol 50% por 15 min.
6. Após lavar a placa com água da torneira, secar a parte posterior e recolocá-la na cuba de eletroforese e recolocar tb as pontes de papel Whatmann
7. **2ª corrida** em torna de 1h e 30min.. Após retirar a placa novamente da cuba e mergulhá-la na solução mde etanol 35% por 15min.

8. Idem ao item 6
9. **3ª corrida** \pm 3 horas
10. Colorir a placa com azul de toluidina 1% por 15min.
11. Descorar com água da torneira até uma boa visualização das bandas (overnight)

Bibliografia

- Pennock CA. A review and selection of simple laboratory methods used for the study of glycosaminoglycan and the diagnosis of the mucopolysaccharidoses. J. Clin. Path. 1976; 29:111-128.
- Cappelletti R, Del Rosso M, Chiarrugi VP. A new eletrophoretic method for complete separation of all known animal glycosaminoglycans in a monodimension run. Anal. Biochem. 1979; 99:311-315.