

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA**

**Análises bioquímicas em amostras de urina e sangue colhidas em papel  
filtro: uma alternativa para triagem de Mucopolissacaridoses I e VI.**

**ANA CAROLINA BREIER**

**Porto Alegre**

**2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA**

**Análises bioquímicas em amostras de urina e sangue colhidas em papel  
filtro: uma alternativa para Mucopolissacaridoses I e VI.**

**ANA CAROLINA BREIER**

**Orientadora: Dra. Janice Carneiro Coelho**

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação  
em Ciências Biológicas: Bioquímica da  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul,  
como requisito à obtenção do grau de Doutor  
em Bioquímica.

**Porto Alegre**

**2014**

## AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial meus pais João e Helena, que sempre me incentivaram aos estudos e a nunca desistir diante das dificuldades.

Ao Samuel, pelo nosso amor e pelo exemplo de determinação. Agradeço pelo incentivo permanente para a realização e conclusão desta Tese, que permitirão a nossa mudança e assim viver nossos objetivos como planejamos.

À Prof<sup>a</sup>. Janice pela amizade e orientação. Agradeço principalmente por toda confiança depositada em mim, a liberdade e incentivo à pesquisa concedidos durante estes anos.

Aos meus colegas do laboratório de Doenças Lisossômicas de Depósito, que colaboraram durante todo o processo de realização dos experimentos e que tornaram o ambiente de trabalho mais alegre e produtivo.

Aos médicos e profissionais da saúde, que colaboraram através dos contatos e envio de amostras de pacientes.

Aos pacientes com Mucopolissacaridoses e suas famílias, em especial àquelas que participaram doando amostras de sangue e urina para realização dos experimentos, na esperança de encontrar novas perspectivas.

Aos coordenadores, professores e funcionários do Departamento de Bioquímica da UFRGS, por fazerem deste um programa de Pós-graduação de qualidade reconhecida. Em especial a Prof<sup>a</sup>. Vera, pelo convívio e ensinamentos de muitos anos.

A todos os amigos do Departamento de Bioquímica agradeço pelo espírito de colaboração e amizade.

À UFRGS e ao CNPq pela oportunidade e pela bolsa concedida durante o doutorado.

<b>SUMÁRIO</b>	<b>Página</b>
<b>Agradecimentos</b> .....	<b>III</b>
<b>Apresentação</b> .....	<b>VI</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>VII</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>VIII</b>
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	<b>IX</b>
<b>1.INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>1.1. Erros Inatos do Metabolismo (EIM)</b> .....	<b>11</b>
<b>1.2. Doenças Lisossômicas de Depósito (DLDs)</b> .....	<b>12</b>
<b>1.3. Mucopolissacaridoses (MPSs)</b> .....	<b>13</b>
<b>1.3.1. Glicosaminoglicanos (GAGs)</b> .....	<b>15</b>
<b>1.3.2. Triagem das MPSs</b> .....	<b>15</b>
<b>1.3.3. Diagnóstico definitivo das MPSs</b> .....	<b>16</b>
<b>1.3.3. Tratamento</b> .....	<b>18</b>
<b>1.3.4. MPSs abordadas neste trabalho</b> .....	<b>19</b>
<b>1.4.Aplicação do papel filtro para coleta de amostras biológicas</b> .....	<b>20</b>
<b>1.5.Triagem em amostra de sangue colhido em papel filtro para MPS</b> .....	<b>22</b>
<b>1.6.Triagem em amostra de urina colhida em papel filtro para MPS</b> .....	<b>22</b>
<b>2.OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>

<b>3.CAPITULO I</b> .....	27
 <b>Artigo:</b> Optimization of electrophoresis in agarose gel for urinary glycosaminoglycans and possible applications in the Mucopolysaccharidoses	
<b>4.CAPITULO II</b> .....	52
 <b>Artigo:</b> Correlation of the glycosaminoglycans levels between urine and dried urine filter paper samples and their stability over time under different storage temperature	
<b>5.CAPITULO III</b> .....	58
 <b>Artigo:</b> Alpha-L-Iduronidase and arylsulphatase B in dried blood spots on filter paper: biochemical parameters and time stability	
<b>6.DISCUSSÃO</b> .....	79
<b>7.CONCLUSÕES</b> .....	92
<b>8.PERSPECTIVAS</b> .....	95
<b>9.BIBLIOGRAFIA</b> .....	97
 <b>10.ANEXOS</b>	
<b>10.1.</b> Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	111
<b>10.2.</b> Carta de aprovação do CEP da UFRGS para realização do trabalho.....	112
<b>10.3.</b> Artigo submetido à <i>Clinical Chemistry and Laboratory Medicine</i> .....	113
<b>10.4.</b> Artigo submetido à <i>Applied Biochemistry and Biotechnology</i> .....	114

## APRESENTAÇÃO

Esta Tese está organizada em seções dispostas da seguinte maneira: *Introdução*, *Objetivos*, *Capítulos* (I, II e III – referentes a artigos científicos), *Discussão*, *Conclusões*, *Perspectivas*, *Bibliografia* e *Anexos*.

A seção *Introdução* apresenta o embasamento teórico que levou a formular as propostas da Tese, as quais estão na seção *Objetivos*.

A seção *Capítulos* contém os artigos científicos aceitos para publicação ou submetidos, os quais estão apresentados de acordo com os objetivos específicos. Esta seção também apresenta os materiais, os métodos e as referências bibliográficas específicas de cada artigo e está dividida em *Capítulos I, II e III*.

A seção *Discussão* contém uma interpretação dos resultados obtidos nos diferentes artigos científicos. A seção *Conclusões* aborda as conclusões gerais obtidas na Tese. A seção *Perspectivas* apresenta as possibilidades de desenvolvimento de projetos futuros a partir dos resultados obtidos, dando continuidade a esta linha de pesquisa.

A seção *Bibliografia* lista as referências citadas na *Introdução* e *Discussão* da Tese. E por fim, a seção *Anexos* apresenta a carta de aprovação e de submissões dos artigos científicos elaborados nesta Tese e apresentados na seção *Capítulos*.

## RESUMO

As Mucopolissacaridoses (MPSs) são Erros Inatos do Metabolismo e pertencem ao grupo de Doenças Lisossômicas de Depósito. São causadas pela deficiência na atividade de enzimas responsáveis pela degradação dos glicosaminoglicanos (GAGs). As MPSs são graves e com um amplo espectro de anormalidades esqueléticas, comprometimento do sistema nervoso, disfunções orgânicas e acúmulo de lipídios complexos nos tecidos. Atualmente, a triagem para estas doenças é realizada pela quantificação de GAGs em amostra de urina e pela medida da atividade enzimática total em sangue colhido em papel filtro (SPF). O diagnóstico confirmatório é baseado na atividade específica das enzimas em leucócitos e plasma. O uso da urina impregnada em papel filtro (UPF) para triagem de MPSs juntamente com amostras de SPF fazem parte do objetivo geral deste trabalho, aprimorando as técnicas de análise das MPS I e VI. Primeiramente, adaptamos a técnica de eletroforese de GAGs urinários para um gel de agarose comercial, melhorando a separação do perfil eletroforético, quantificando as bandas de GAGs e reduzindo o tempo total da técnica. Demonstramos a forte correlação dos resultados de dosagens de GAGs urinários entre amostras de urina e de UPF. As amostras de UPF foram estáveis nas temperaturas de -20, 4 e 25 °C até um mês e à 37 °C até 3 semanas. Além disso, estas amostras ainda obtiveram bom desempenho ao serem submetidas à técnica de eletroforese, demonstrando bandas visíveis no perfil eletroforético. Usando SPF, estabelecemos os parâmetros bioquímicos de pH ótimo, constante de Michaelis-Menten e velocidade máxima, das enzimas  $\alpha$ -L-iduronidase (IDUA) e arilsulfatase B (ASB), nestas amostras. Determinamos nossos valores de referência para triagem de MPS I e VI em SPF, através de técnica fluorimétrica. A atividade da IDUA em SPF foi estável até 21 dias e a da ASB até 45 dias à 4°C. As amostras de UPF são, portanto, uma alternativa segura e prática para realização das análises bioquímicas de GAGs urinários, através da dosagem total e separação de GAGs por eletroforese, assim como, as amostras de SPF para medida da atividade enzimática. Através de nossos resultados, concluímos que as amostras biológicas de urina e sangue colhidas em papel filtro apresentam grande potencial para uso em triagens de MPS I e VI e acompanhamento de pacientes em tratamento. O uso do papel filtro tem diversas vantagens, tais como: fácil transporte e armazenamento, menor volume de reação e segurança de manipulação das amostras, e, através da metodologia proposta neste trabalho, resultados bioquímicos seguros.

## ABSTRACT

Mucopolysaccharidoses (MPS) are Inborn Errors of Metabolism and belong to the group of Lysosomal Storage Diseases. They are caused by deficiency in the activity of enzymes responsible for the degradation of glycosaminoglycans (GAGs). The MPS are serious and with a broad spectrum of skeletal abnormalities, involvement of the nervous system, organ dysfunction and accumulation of lipids in complex tissues. Currently, screening for these diseases is performed by quantification of GAGs in the urine sample and the measurement of total enzyme activity in blood collected on filter paper (DBS). Confirmatory diagnosis is based on the specific enzyme activity in leukocytes and plasma. The use of urine impregnated on filter paper (UFP) and DBS samples for screening of MPS are part of the overall goal of this work, improving the techniques for detection of MPS I and VI. First, we adapted the technique of electrophoresis of urinary GAGs for commercial agarose gel, improving the separation of the electrophoretic profile, quantifying bands GAGs and reducing the total time of the technique. We demonstrated the strong correlation of measurements of urinary GAGs between urine and UFP. UFP samples were stable at temperatures of -20, 4 and 25 °C until 1 month and at 37 °C until 3 weeks. Moreover, these samples still had good performance when undergoing electrophoresis, showing visible bands in the electrophoretic profile. Using DBS samples, we established biochemical parameters of pH optimum, Michaelis-Menten constant and Vmax of the  $\alpha$ -L-iduronidase enzyme (IDUA) and arylsulfatase B (ASB). We determine our reference values for screening of MPS I and VI in DBS, using fluorimetric technique. IDUA activity in DBS was stable up to 21 days and the ASB within 45 days at 4 °C. UFP samples are therefore a safe and practical alternative for achieving the biochemical analysis of urinary GAGs by total dosage and separation by electrophoresis of GAG as well as samples of DBS for the measurement of enzyme activity. Through our results, we conclude that the biological samples of urine and blood collected on filter paper have great potential for use in screening for MPS I and VI and monitoring of patients undergoing treatment. The use of filter paper has several advantages, such as easy transportation and storage, lower reaction volume and safety of sample manipulation, and, using the methodology proposed in this work, secure biochemical results.



## **LISTA DE ABREVIATURAS**

ASB: Arilsulfatase B

DLDs: Doenças Lisossômicas de Depósito

EIM : Erros Inatos do Metabolismo

GAGs: Glicosaminoglicanos

IDUA:  $\alpha$ -L-iduronidase

LC-MS/MS: Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa em Tandem

MPSs: Mucopolissacaridoses

SPF: Sangue impregnado em Papel Filtro

TRE: Terapia de Reposição Enzimática

UPF: urina impregnada em papel filtro

---

## **1. Introdução**

---

### 1.1. Erros Inatos do Metabolismo

Os Erros Inatos do Metabolismo (EIM) são doenças metabólicas genéticas que geralmente, correspondem a um defeito enzimático, capaz de causar a interrupção de uma via metabólica (Scriver, 2001; Sedel et al., 2007). Ocasionalmente, portanto, alguma falha de síntese, degradação, armazenamento ou transporte de moléculas no organismo. Como consequência, os EIM podem levar a ausência de um produto esperado, ao acúmulo de substrato da etapa anterior àquela que foi interrompida ou ao surgimento de uma rota metabólica alternativa (Saudubray et al., 2006).

A incidência isolada de cada uma destas doenças metabólicas genéticas é pequena, uma vez que, se tratam de doenças com padrão de herança autossômica recessiva em sua grande maioria. No entanto, já foram descritos mais de 1000 distúrbios conhecidos para os EIM, e assim, a frequência se torna mais expressiva, de aproximadamente 1/800 nascidos (Mak et al., 2013). Devemos considerar que os números baixos podem representar, não só a raridade dos distúrbios, como, também, a subestimação de seu diagnóstico.

Tratando-se de alterações metabólicas bastante distintas, os EIM possuem diversas classificações. No entanto, é conveniente descrever a estabelecida por Saudubray e Charpentier (2001), por ser apresentada de maneira didática e com maior aplicação clínica. De acordo com essa classificação, os EIM dividem-se em duas categorias: **Categoria 1**, que engloba as alterações que afetam um único sistema orgânico ou apenas um órgão, como o sistema imunológico e os fatores de coagulação, túbulos renais ou eritrócitos; **Categoria 2**, que abrange um grupo de doenças cujo defeito bioquímico compromete uma via metabólica comum a diversos órgãos, como, por exemplo, as Doenças Lisossômicas de Depósito, ou aquelas restritas a um único órgão, porém com manifestações humorais e sistêmicas, como a Hiperamonemia (defeito do ciclo da ureia).

## **1.2. As Doenças Lisossômicas de Depósito (DLDs)**

Os lisossomos são compartimentos celulares responsáveis, entre outras funções, pela degradação de macromoléculas através de enzimas contidas em seu interior. Quando existe um defeito em uma destas enzimas, em seu transporte ou em proteínas que modulam a sua atividade, produz-se um acúmulo de substrato dentro do lisossomo que leva a uma Doença Lisossômica de Depósito (DLD) (Alberts et al., 2008; Wenger et al., 2013). Existem mais de 50 enzimas lisossômicas, incluindo proteases, nucleases, glicosidases, lípases, fosfolipases, etc. Todas elas são hidrolases ácidas, que tem uma atividade ótima em pH entre 4 e 5 na luz lisossomal (Desnick e Schuchman, 2002; Alberts et al., 2008).

As DLDs são caracterizadas pelo envolvimento de múltiplos tecidos e órgãos o que ocasiona fenótipos heterogêneos. Entre as manifestações clínicas, as relacionados ao sistema nervoso central (SNC) com neurodegeneração progressiva e disfunção cognitiva, são altamente debilitantes. As DLDs são doenças progressivas, graves e predominantemente incuráveis, com risco de repetição de 25% na mesma família. Na maioria delas, o diagnóstico permite apenas medidas preventivas, tais como o aconselhamento genético, a detecção de heterozigotos e o diagnóstico pré-natal, entretanto, nas últimas décadas, diversos tipos de tratamentos como, terapia gênica, transplante de medula óssea, inibidores de síntese de substrato e terapia de reposição enzimática, vêm sendo desenvolvidos (Wenger et al., 2002; Eto et al., 2004). Essas terapias atenuam os sintomas e melhoram significativamente a qualidade de vida dos pacientes (Beck, 2010).

### **1.3. Mucopolissacaridoses**

As Mucopolissacaridoses (MPSs) são DLDs provenientes da deficiência na atividade de enzimas que catalisam a degradação dos glicosaminoglicanos (GAGs). O bloqueio das vias metabólicas de degradação de um ou mais GAGs, causa o acúmulo de sulfato de dermatan, sulfato de heparan, sulfato de queratan, sulfato de condroitin ou hialuran, no interior dos lisossomos de muitas células, resultando na disfunção celular, tecidual e conseqüentemente do órgão (Neufeld e Muenzer, 2001; Muenzer, 2004; Cimaz e La Torre, 2014).

As MPS são classificadas em diferentes tipos (Tabela 1), de acordo com a enzima que se encontra deficiente e os graus de comprometimento clínico (que podem ser causados pela deficiência de uma mesma enzima). São descritas 11 enzimas deficientes causadoras de sete tipos distintos de MPS. Todas as MPS são doenças hereditárias de origem autossômica recessiva, exceto a MPS II, que apresenta padrão de herança ligada ao cromossomo X, e por esta razão, acomete principalmente pacientes do sexo masculino (Neufeld e Muenzer, 2001; Muenzer, 2004; Glamuzina et al., 2011).

As mutações descritas para as MPS são muito heterogêneas, mas alguns alelos mutantes são predominantes em populações específicas. A maioria destas mutações são alterações pequenas ou pontuais do gene, embora rearranjos maiores e grandes deleções de DNA possam ocorrer na MPS II. A correlação da severidade da doença com o genótipo é possível em alguns casos, mas o efeito das mutações missense é geralmente difícil de prever (Neufeld e Muenzer, 2001; Pollard et al., 2013).

As MPS são doenças graves e comprometem o desenvolvimento de forma importante. Clinicamente, as MPS apresentam muitos sintomas em comum, principalmente esquelético, cardiopulmonar, fígado, baço e cérebro, o que permite uma suspeita diagnóstica inicial (Clarke et al., 2012). A causa de morte dos pacientes com MPS se deve geralmente às

complicações respiratórias e/ou insuficiência cardíaca. As MPS são consideradas raras, porém, a incidência conjunta é estimada entre 3,4 e 4,5 para 100.000 recém-nascidos vivos (Martin et al., 2008).

Tabela 1: Classificação das mucopolissacaridoses

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

Fonte: adaptada de Neufeld e Muenzer, 2001; Muenzer, 2004.

### **1.3.1. Glicosaminoglicanos**

Os glicosaminoglicanos (GAGs) são cadeias de polissacarídeos longas, lineares, de carga negativa, compostas por uma unidade de dissacarídeo que se repete (açúcar ácido-açúcar aminado)<sub>n</sub>. Geralmente estão associados a pequenas quantidades de proteínas formando proteoglicanos (Harvey e Ferrier, 2012). Devido à grande quantidade de cargas negativas, essas moléculas se repelem e são cercadas por grande quantidade de moléculas de água, e por isso, os GAGs adquirem uma consistência mucóide, viscosa, com função lubrificante e de resistência, protegendo, por exemplo, mucosas e fluído sinovial (Coutinho et al., 2012), sendo considerados constituintes essenciais de tecidos conectivos, como cartilagens e paredes de vasos (Fernandes et al., 2006).

Os GAGs são degradados nos lisossomos pelas hidrolases ácidas, no pH ótimo para a atividade das mesmas de aproximadamente 5. Possuem uma meia-vida curta, entre três dias para ácido hialurônico e dez dias para o sulfato de condroitin e sulfato de dematan, apenas o sulfato de queratan tem uma meia-vida maior, de 120 dias (Harvey e Ferrier, 2012). Os GAGs eram anteriormente denominados mucopolissacarídeos, o que deu origem o nome da doença Mucopolissacaridose, decorrente do acúmulo dessas moléculas no interior dos lisossomos (Neufeld e Muenzer, 2001).

### **1.3.2. Triagem para as MPSs**

Atualmente, a partir da suspeita clínica de uma MPS, se dá início a uma triagem realizada através da quantificação total de GAGs urinários, devido a importância destes como os principais marcadores bioquímicos para as MPSs. A dosagem de GAGs é um exame quantitativo que explora a afinidade de ligação dos GAGs com corantes azuis. Diferentes

métodos podem ser utilizados para esta determinação, porém o mais utilizado é a técnica colorimétrica do Azul de 1,9-Dimetilmetileno (DMB) (De Jong et al., 1992).

Para dosagem de GAGs urinários não há necessidade de utilizar-se a primeira urina da manhã, podendo utilizar-se amostras ocasionais, sem preparo inicial. A mensuração da creatinina é o parâmetro para a concentração da urina (Clarke e al., 2012). A excreção fisiológica de GAGs decresce com a idade, por esse motivo recém nascidos tem níveis de excreção de GAGs mais elevados (Schwartz et al., 2001; Gallegos-Arreola et al., 2000). Assim sendo, os valores de referência para os GAGs são divididos por faixas etárias (Giugliani e al., 1990; Mallolas et al., 1999).

Após a análise da quantificação total de GAGs, as análises qualitativas são necessárias para identificar quais os tipos de GAGs estão aumentados na urina. Atualmente o uso da eletroforese como método de separação para os GAGs é o mais indicado (Coppa et al., 2012). Conhecendo-se o padrão de excreção, direciona-se a investigação para os possíveis tipos de MPSs, através da avaliação enzimática específica, que representa, atualmente, o diagnóstico definitivo (Schwartz et al., 2001; Mabe et al., 2004). Os resultados eletroforéticos que evidenciem somente bandas de sulfato de condroitin são normais, isto é, o paciente não tem MPS. Diferentemente, a excreção de sulfato de dermatan, sulfato de heparan e sulfato de queratan são padrões de bandas que diagnosticam diferentes MPSs (Mabe et al., 2004). Os GAGs sulfato de heparan e sulfato de dermatan caracterizam as MPS I, II, e VII; padrões somente com sulfato de heparan a MPS III, enquanto os somente com sulfato de dermatan a MPS VI, e por fim, os com sulfato de queratan a MPS IV (Coutinho et al., 2012).

Outra forma de triagem das MPSs é através do uso de sangue impregnado em papel filtro (SPF). Diversos grupos de pesquisa vêm estudando e padronizando a aplicação deste tipo de amostra biológica (Chamoles et al., 2001; Chamoles et al., 2002; Civallero et al.,



2006; Castilhos et al., 2014), porém os resultados provenientes do SPF não é utilizada como forma de diagnóstico final, e sim, como forma de triagem. Isso ocorre devido os resultados destas análises com amostras de SPF expressarem a atividade total da enzima, em  $\eta\text{mol/h/ml}$ , e não a atividade enzimática específica, expressa em  $\eta\text{mol/h/mg}$  de proteína, como atualmente é realizada para amostras de leucócitos e de plasma. Para que o diagnóstico utilizando SPF seja considerado definitivo é necessário padronizar técnicas, como o controle de volume de amostra.

O volume de amostra que é impregnado no SPF é importante para a análise final, excluindo erros decorrentes de volumes inadequados de sangue no papel filtro. Outros fatores para a padronização destas técnicas devem ser considerados, como a qualidade do papel filtro e os procedimentos de coleta, transporte e armazenamento dos mesmos (Civallero et al., 2006).

### **1.3.3. Diagnóstico**

Em geral, o diagnóstico definitivo das DLDs, incluindo as MPSs, é baseado na medida da atividade específica da enzima em amostra de plasma, leucócitos ou fibroblastos. Para realização do ensaio em plasma e leucócitos são necessários aproximadamente 10 mL de sangue, variando conforme o número de enzimas a serem analisadas. Para maior segurança dos resultados, o processamento mais adequado destas amostras requer o preparo do material biológico imediatamente após a coleta, e armazenamento, a no mínimo,  $-20^{\circ}\text{C}$ . A coleta de material para diagnóstico utilizando biópsia de fibroblastos causa desconforto para o paciente, pois retira-se um pedaço de pele de aproximadamente 3 a 5 mm. O uso de fibroblastos não é comum para o diagnóstico de MPSs (Mello et al., 2006). O transporte das amostras até o laboratório de análise deve ser feito com refrigeração (Wajner et al., 2007).

Usualmente o ensaio de análise para a enzima de interesse implica o uso de substratos artificiais, acoplado a um determinante de fluorescência, como o 4-metilumbeliferil-sulfato, ou um substrato similar ao natural, o qual possui um fragmento marcado dependendo do esquema de detecção. Os resultados destes ensaios confirmatórios expressam a atividade específica, em  $\eta\text{mol/h/mg}$  de proteína, e este cálculo é feito levando-se em consideração a correção da atividade enzimática pelo tempo de incubação com o substrato da reação e o volume de amostra (Neufeld e Muenzer, 2001).

#### **1.3.4. Tratamento**

No passado o foco do tratamento para as MPSs era realizado baseando-se nas complicações que os pacientes apresentavam durante a progressão da doença. Atualmente o tratamento através da Terapia de Reposição Enzimática (TER) endovenosa já está disponível para as MPS I, II e VI. Além disso, a TRE para MPS IVA está em fase de desenvolvimento clínico assim como a TRE intratecal para MPS do tipo III (Beck, 2010; Giugliani, 2012).

O tratamento através da TRE oferece esperança aos portadores por evitar ou deter o progresso da doença, corrigindo a deficiência enzimática e evitando impedindo o acúmulo de GAG. Os melhores resultados para a TRE estão na sua aplicação precoce, nos primeiros anos de vida do paciente ou em variantes mais leves das MPSs. Desta forma, a TRE é capaz de melhorar consideravelmente a qualidade de vida dos indivíduos afetados e de suas famílias (Germain et al.; 2010; Beck, 2010).

Outras abordagens terapêuticas também estão sendo investigadas, especialmente para atender as necessidades dos tipos mais graves de MPSs. Entre as alternativas em investigação

incluem-se a terapia de redução de substrato, as chaperonas farmacológicas e a terapia gênica, além do transplante de medula óssea (Beck, 2010).

### **1.3.5. MPSs abordadas neste trabalho**

O primeiro critério de inclusão para escolha das MPSs estudadas nesta tese foi à disponibilidade de tratamento através da TRE. Atualmente a TRE é administrada para três dos sete tipos de MPS. São elas a MPS I, II e a VI (<http://www.clinicaltrials.gov>). O segundo critério de delimitação para este trabalho foi o padrão de herança genética, incluindo apenas as MPSs de herança autossômica recessiva, e, excluindo, o padrão genético com herança ligada ao cromossomo X encontrado na MPS II. As razões desta escolha foram baseadas para coletas de amostras de sangue de controle saudáveis para MPS, podendo assim, formar um grupo misto, ou seja, de ambos os sexos. Conforme os critérios expostos, os objetivos de estudo nesta Tese foram realizados com alvo nas MPS I e MPS VI.

Dependendo dos sintomas, a MPS I é conhecida também por Síndrome de Hurler, Huler-Scheie ou Scheie causada pelo defeito da enzima lisossômica  $\alpha$ -L-iduronidase (IDUA), EC 3.2.1.76. Em consequência disso, os GAGs acumulados nesta doença são o sulfato de dermatan e sulfato de heparan. A deficiência da IDUA resulta em uma ampla diversidade de manifestações clínicas, tais como: macrocefalia, macroglossia, perda auditiva, perda visual, baixa estatura, hepatomegalia, esplenomegalia, disostose múltipla, dificuldade respiratória, problemas coronarianos e valvulares, retardo mental entre outros. As síndromes de Hurler e Scheie representam os fenótipos grave e leve do espectro clínico, respectivamente, e a síndrome de Hurler-Scheie representa um fenótipo intermediário das manifestações clínicas. Estas classes não refletem adequadamente a diversidade e a progressão variável dos sintomas clínicos manifestados por pacientes individuais com MPS I (Kingma e al., 2013). O

diagnóstico da MPS I é confirmado por um nível de atividade enzimática baixa ou indetectável da enzima IDUA no plasma, leucócitos ou fibroblastos da pele, e também, por uma concentração alta de fragmentos de GAGs na urina (Neufeld e Muenzer, 2001). O tratamento disponível por TRE, comercialmente conhecida por Aldurazyme<sup>TM</sup>, consiste na administração semanal de infusão intravenosa nos pacientes, e é capaz de evitar ou deter o progresso da doença, corrigindo a deficiência de IDUA e evitando assim o acúmulo de GAGs (Jameson et al., 2013).

A MPS VI ou Síndrome de Maroteaux-Lamy é causada por uma deficiência hereditária autossômica recessiva na enzima arilsulfatase B (ASB), EC 3.1.6.12. O GAG acumulado na urina dos pacientes portadores é o sulfato de dermatan. O diagnóstico, assim como para as outras MPSs, é realizado através da medida da atividade da enzima deficiente em sangue, especificamente em leucócitos, e pela quantidade de GAGs acumulada na urina dos pacientes. Clinicamente, a MPS VI pode manifestar-se através da baixa estatura, displasia esquelética, hepatoesplenomegalia, anomalias de válvulas cardíacas e oftalmológicas, com intelecto normal. Atualmente o tratamento por TRE é oferecido através da enzima comercial Naglazyme<sup>TM</sup>. Este tratamento melhora consideravelmente a qualidade de vida dos pacientes (Harmatz et al., 2013).

#### **1.4. Aplicação do papel filtro para coleta de amostras biológicas**

A utilização de amostras de SPF é amplamente aceita para testes de triagem. Um exemplo deste uso é o teste do pezinho, incorporado ao Sistema Único de Saúde (SUS) no ano de 1992 (Portaria GM/MS n.º 22, de 15 de Janeiro de 1992) com uma legislação que então incorporou a obrigatoriedade do teste em todos os recém-nascidos vivos, incluindo a avaliação para Fenilcetonúria e Hipotireoidismo Congênito. Atualmente, desde 2001, o Ministério da Saúde, através da Secretaria de Assistência à Saúde, empenhou-se na

reavaliação da Triagem Neonatal no SUS, e criou o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) (Portaria GM/MS n.º 822, de 6 de junho de 2001) incluindo à triagem outras doenças: Anemia Falciforme, Hemoglobinopatias e Fibrose Cística.

A primeira publicação com uso de amostra de SPF foi realizada há quase um século, por Ivar Christian Bang (1869–1918), considerado o pai das microanálises clínicas. Os estudos com uso de SPF vêm crescendo exponencialmente, e o número de publicações nesta área aumentou consideravelmente nos dois últimos anos (Demirev, 2013). A ampla diversidade de áreas de pesquisa: farmacologia clínica, triagens neonatais, estudos genômicos, toxicologia forense, análise microbiológica de controle ambiental, estudos de vigilância de doenças epidemiológicas; bem como a introdução de novas metodologias de detecção: cromatografia, espectrometria de massas, imunoenaios, biologia molecular; juntamente com os aspectos éticos menos rigorosos para pesquisa com estas amostras, contribuíram para este aumento.

São muitas as vantagens atribuídas a amostras biológicas processadas desta forma. Entre as principais encontram-se: fácil transporte, podendo ser enviado via correio em envelope convencional, sem necessidade de refrigeração (Rodrigues, 2009); fácil armazenagem das amostras, com atividade preservada por meses a temperatura ambiente e anos sobre refrigeração (Gasparotto et al., 2009); menor volume de reação, sendo um procedimento mais barato do que o convencional (Civallero, 2006); segurança de manipulação das amostras, pois se trata de um material seco e não líquido, o que diminui as chances de riscos de eventuais contaminações biológica por parte do profissional que executa a análise (Reuser et al., 2011).

### **1.5. Triagem em amostra de sangue colhido em papel filtro para MPS**

A triagem neonatal e populacional em famílias de alto risco para as DLDs utilizando amostra de SPF iniciou com o trabalho de Chamoles e colaboradores em 2001, medindo a atividade da enzima IDUA, deficiente na MPS I. Desde então, muitos estudos possibilitaram a triagem para diversos ensaios enzimáticos com uso de técnicas avançadas e sofisticadas, como a imunoquantificação, uso de substratos artificiais, com marcação radioativa ou fluorescente, espectrometria de massas e biologia molecular (Pollard et al., 2013; Reuser et al., 2011; Meikle et al., 2006; Civallero et al., 2006; Li et al., 2004).

A ampla disponibilidade de amostras de SPF para triagem laboratorial de recém-nascidos estimulou o desenvolvimento de ensaios que utilizam este tipo de amostra. Como resultado, muitos laboratórios vêm trabalhando e desenvolvendo ensaios enzimáticos, e entre os mais utilizados para MPS estão os de fluorescência (Civallero et al., 2006; De Jesus et al., 2009; Castilhos et al., 2011a) e de espectrometria de massas (Gelb et al., 2006; Duffey et al., 2010). Além disso, o desenvolvimento nesta área também é motivado pela existência de tratamento farmacológico para os pacientes portadores de alguns tipos de MPS.

### **1.6. Triagem em amostra de urina colhida em papel filtro para MPS**

Da mesma forma que o sangue, a urina também é uma amostra biológica empregada para triagem de MPSs, devido a importância dos GAGs urinários como biomarcadores destas doenças. Recentemente, as análises de GAGs em amostras de urina impregnadas em papel filtro (UFP) foram demonstradas por diferentes metodologias, obtendo resultados positivos para aplicação deste tipo de amostra na área de investigação de MPS (Whitley et al., 2002; Alonso-Fernández et al., 2010; Auray-Blais et al., 2012; Civallero et al., 2013). O conteúdo

total de GAGs em amostra de UPF comparado com amostra líquida de urina não apresentou diferenças após análise colorimétrica com DMB e, por isso, sua incorporação aos centros de referência foi sugerida por Civallero e colaboradores (2013). Mais além, a análise individual de GAGs acumulados em pacientes foram quantificadas em amostras de UPF, através de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em tandem (Auray-Blais et al., 2012). A vantagem desta técnica é a possibilidade de direcionar o diagnóstico enzimático definitivo, com o envio prévio de apenas uma amostra de UPF. Entretanto, esta é uma ferramenta que requer equipamentos de alto custo, que inviabilizam sua aplicação em centros clínicos de médio e pequeno porte.

Outra característica interessante do uso da amostra de UPF para as MPSs é o acompanhamento dos pacientes que estão submetidos a tratamentos e necessitam de monitoramento. Durante o tratamento por TRE, por exemplo, o acompanhamento dos níveis de GAGs é um parâmetro avaliado no desempenho das administrações endovenosas, uma vez que, tratamentos bem sucedidos apresentam decaimento significativo da concentração de GAGs urinários (Valayannopoulos e Wijburg, 2011). Desta maneira, a facilidade para monitorar o tratamento dos pacientes periodicamente, através dos níveis acumulados de GAGs, é vantajosa em relação ao envio de amostras de urinas na forma líquida, que depende cuidados para envio, de refrigeração, frascos especiais e custos maiores que a de uma amostra de urina colhida em papel filtro.

---

## **2. Objetivos**

---



## **2. Objetivo Geral**

Considerando que a triagem e o diagnóstico das MPSs são realizados apenas em grandes centros de referência, a disponibilidade de tratamento crescente através de TRE e os benefícios diretos da mesma para os afetados, principalmente quando a identificação precoce é realizada, proporcionando um início de tratamento antes da evolução dos sintomas mais graves, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar técnicas para triagem das MPS I e VI com uso de amostras biológicas impregnadas em papel filtro. Além disso, as MPS são doenças raras e este é um fator que contribui para o seu subdiagnóstico entre outras patologias. Portanto, existe a necessidade de aprimoramento das técnicas de triagens, para que os pacientes sejam diagnosticados corretamente. Este trabalho foi dividido em três capítulos com os seguintes objetivos específicos:

### **2.1. Objetivos específicos**

Capítulo I:

- 1) Adaptar a técnica de eletroforese de GAGs urinários para um gel de agarose comercial, agregando melhorias durante a separação e identificação.
- 2) Realizar a quantificação das bandas de GAGs, através de software específico para géis.
- 3) Avaliar a aplicação desta técnica para o acompanhamento de pacientes em TRE, monitorando seus níveis de GAGs urinários.

## Capítulo II:

- 1) Correlacionar a técnica de dosagem colorimétrica de GAGs urinários em amostra de urina e urina impregnada em papel filtro, avaliando diferentes concentrações de GAGs.
- 2) Testar a estabilidade das amostras de UPF ao longo do tempo e em diferentes temperaturas de armazenamento.
- 3) Preparar e submeter às amostras de UPF a técnica de eletroforese proposta no Capítulo I.

## Capítulo III:

- 1) Estabelecer os parâmetros bioquímicos de pH ótimo, constante de Michaelis-Menten e velocidade máxima, das enzimas IDUA e ASB, deficientes na MPS I e VI respectivamente, em amostras de SPF.
- 2) Através do estabelecimento do melhor pH para a atividade enzimática das mesmas, determinar nossos valores de referência para triagem de MPS I e VI em SPF, através de técnica fluorimétrica.
- 3) Estudar a estabilidade da atividade enzimática nas amostras de SPF ao longo do tempo de armazenamento.

---

### 3. Capítulo I

**Artigo:** *Optimization of electrophoresis in agarose gel for urinary glycosaminoglycans and possible applications in the Mucopolysaccharidoses* - **Status:** *Submetido ao periódico Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.*

---

**Optimization of electrophoresis in agarose gel for urinary glycosaminoglycans  
and possible applications in Mucopolysaccharidoses**

Ana C. Breier, Jaqueline Cé and Janice C. Coelho

Department of Biochemistry and Postgraduate Program in Biochemistry,  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

*Corresponding author at:* Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos 2600, Anexo, Porto Alegre, RS, Brazil. Fax: +55 51 33085535

*E-mail address:* [anacarolina.breier@gmail.com](mailto:anacarolina.breier@gmail.com) (Ana C. Breier)

## Abstract

**Background:** Mucopolysaccharidoses (MPS) are a group of inherited metabolic disorders, caused by the deficiency of enzymes that degrade glycosaminoglycans (GAGs). The urinary GAG excretion is a common feature of MPS and is considered its major biomarker. We aimed to adapt the GAGs electrophoresis method to a commercial agarose gel, which is able to separate urinary GAGs in a simpler way, with sensitivity, reproducibility and adequate visualization of the bands.

**Methods:** We compared the use of lab-made agarose gel and a commercial agarose gel in electrophoresis method. Urine samples from patients previously diagnosed with MPS I, IV and VI were used as electrophoretic standards. GAGs bands were stained with toluidine blue dye and quantified using the AlphaEaseFC software.

**Results:** Commercial agarose gel electrophoresis was effective, showing proper definition and separation of the GAGs bands. Detection of sensitivity above 0.1 ug and bands reproducibility was consistent. Urine samples from patients on enzyme replacement therapy (ERT) obtained a 0.98 correlation coefficient with the values of total GAGs concentration.

**Conclusions:** This electrophoresis optimization show the possibility of monitoring patients treated with ERT by analyzing separately the accumulated GAGs in urine. It is suggested that this process should be applied to MPS screening, as well as, on the follow-up of patient's treatments.

**Keywords:** Electrophoresis; Glycosaminoglycans; Mucopolysaccharidoses.

**Abbreviations:** MPS, Mucopolysaccharidoses; GAGs, glycosaminoglycans; DS, dermatan sulfate; HS, heparan sulfate; KS, keratan sulfate; CS, chondroitin sulfate; ERT, enzyme replacement therapy; DMB, 1,9-dimethylmethylene blue; CPC, cetylpyridinium chloride.

## Introduction

Mucopolysaccharidoses (MPSs) are a group of inherited metabolic disorders, which are caused by the deficiency of enzymes that are needed for the degradation of glycosaminoglycans (GAGs). The intralysosomal accumulation of glycosaminoglycan molecules results in cell, tissue, and organ dysfunction, of chronic and progressive course, that involves multiple systems, organomegaly, dysostosis multiplex, and coarse facies (1).

Glycosaminoglycans are the degradation products of proteoglycans that exist in the extracellular matrix, giving origin to the GAGs, which enter the lysosomes for intracellular digestion. There are four different pathways of GAG lysosomal degradation that result in dermatan sulfate (DS), heparan sulfate (HS), keratan sulfate (KS), and chondroitin sulfate (CS). There are 11 deficiency enzymes that result in seven different MPS, all of which share the same clinical features, even though at different levels (2). The urinary excretion of GAG or its fragments is a common feature attributed to all MPSs and, for that reason, GAGs are considered the primary biochemical biomarkers for diagnosis and evaluation of disease progression (3).

Recently, several research groups have been developing methodologies for the analysis of urinary GAGs as a tool to be used in the diagnosis and follow-up treatment of MPSs through enzyme replacement therapy (ERT), which is currently available for MPS I, II and VI (4-6). This treatment brings new perspectives to patients since they can prevent or stop the course of the disease by correcting the enzyme deficiency, and therefore, avoid GAG accumulation. The best results for

ERT can be obtained when it is introduced in the first years of patients' life, or in MPS milder variants (7).

Among the techniques described in the literature, electrophoresis is widely used for separation and identification of different types of accumulated GAGs in the patients' urine. This method is known for its good sensitivity, reproducibility, and easy applicability for the laboratories since it doesn't require high-cost equipment (8-9). In addition to that, agarose gel electrophoresis has good visualization and definition of the GAG bands, representing a qualitative and semi-quantitative technique at the same time, after the densitometric scanning of the gel (10-11).

The main objective of this study was to adapt the conventional technique of GAG electrophoresis to a simple method using a commercial agarose gel, manufactured by CELM, to separate the GAGs with great visualization while maintaining the sensitivity, and band reproducibility.

## **Materials and methods**

This study was approved by the research and Ethics Committee from Federal University of Rio Grande do Sul and the participants provided informed consent.

### **Samples**

Urine samples collected from patients with MPS I, IV, VI, and normal controls, between 1 and 5 years old, were used as standards for the electrophoretic procedure. Solutions of chondroitin sulfate (CS) and dermatan sulfate (DS) were prepared at different concentrations with distilled water (type II) in order to generate the electrophoretic curve.

## Reagents and materials

Chondroitin sulfate (CS), dermatan sulfate (DS), 1,9-dimethylmethylene blue (DMB), cetylpyridinium chloride (CPC), barium acetate, and toluidine blue dye were purchased from Sigma Chemical Co. (Saint Louis, MO, USA). Ethanol PA was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Lithium chloride was purchased from Vetec Química Fina (Duque de Caxias, RJ, Brazil), sodium citrate from ACROS ORGANICS (New Jersey, USA), phenol red from LABSYNTH (Diadema, SP, Brazil), and agarose LE Analytical Grade from Promega (Madison, WI, USA). The general-purpose agarose films (0.9%) were obtained from CELM (Companhia Equipadora de Laboratórios Modernos, Barueri, SP, Brazil). The electrophoreses were performed in a DIGEL horizontal tray model DGH25 and a GSR power source model 300 STD (São Paulo, SP, Brazil).

## GAG Separation

The GAGs were extracted from urine samples based on the procedure described by Di Ferrante (1967) (12). The volume used for each urine sample was equivalent to 10  $\mu\text{mol}$  of creatinine, with the addition of an equal volume of CPC solution at pH 4.8. This mix was incubated for 30 minutes at 37 °C, followed by centrifugation at 2000 rpm for 10 minutes and, after that, the supernatant was discarded. The pellets were redissolved in 150  $\mu\text{L}$  of lithium chloride and mixed with 800  $\mu\text{L}$  of ethanol PA. After that, the mixture was centrifuged again, the supernatant was discarded, and the pellet was placed in a fume hood for complete evaporation. Finally, the GAGs were dissolved in 15  $\mu\text{L}$  of 0.05% phenol red dye solution for subsequent application in electrophoresis.

## Electrophoresis



The electrophoresis technique used in the laboratory was performed according to the principles of Hopwood and Harrison (1982) and Cappelletti *et al.* (1979) (8-9). The solid matrix selected for the procedure was agarose gel. This gel was made with 1% agarose solution on a level 12x15 cm glass plate. The samples of precipitated GAGs and standards were applied in wells made with printing combs. This agarose gel was denominated lab-made gel. In this paper, an alternative use of a solid matrix is presented for the electrophoresis technique with a ready-to-use 0.9% agarose gel, called commercial agarose gel, manufactured by CELM. For this new solid matrix, the the electrophoresis run times had to be adjusted, which made the technique faster when using the commercial gel compared to the lab-made one. The run times and other methodological data are presented in Table 1, which compares the electrophoreses with the different gels. The electrophoresis was performed in 0.30 M barium acetate buffer (pH 5) and developed in precipitation stages with ethanol and toluidine blue dye, followed by discoloration of the gel in water.

GAG standard curves and electrophoresis of patients on ERT

CS and DS solutions at concentrations of 0.25, 0.5, 1, and 2 mg/mL were applied to the commercial agarose gel and the GAG electrophoresis was performed according to the data in Table 1. Each curve was performed in different gels and days and the trials were repeated three times. The bands were quantified by the AlphaEase FC software (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA). The results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation and the difference between the quantification of bands was analyzed using one-way ANOVA, with significant p value  $< 0.0001$ .

Urine samples of patients on ERT were processed according to the GAG separation techniques and subjected to electrophoresis in commercial agarose gel for the analysis of individual accumulated GAGs. The results were compared to the total dosage of urinary GAGs. The urine samples from a patient on ERT treated with Aldurazyme® (MPS I) and from two other patients treated with Naglazyme® (MPS VI) were analyzed.

#### Quantification of eletrophoretic bands

The bands stained with toluidine blue dye were scanned and quantified using the AlphaEaseFC software. The results of the GAG bands were quantified in AVG (total pixels sum divided by the band size area) and expressed accordingly.

#### Total creatinine and GAG dosage

The concentrations of urinary creatinine in all samples, used to determine the required volume for the separation of GAGs with CPC, were measured according to the method by Jaffé (13), while the technique by De Jong (1992) (14) was used for the total urinary GAG dosage using 1,9-dimetihylmethylene blue (DMB).

## **Results**

#### Commercial agarose gel electrophoresis

The commercial agarose gel electrophoresis was effective, showing proper definition and separation of the GAG bands. The patients showed GAG accumulation patterns in accordance with the literature: MPS I with DS, HS and CS bands; MPS IV with accumulation of KS band; and MPS VI with accumulation of DS

and CS bands. The healthy controls did not show any accumulated GAG bands. This electrophoresis, which was adapted to this solid matrix, showed better GAG migration, with greater separation of the GAG bands in comparison to the lab-made agarose gel electrophoresis (Figure 1).

#### CS and DS curves

The sensitivity and reproducibility of the electrophoresis technique in commercial agarose gel were demonstrated through the GAG standard curves with solutions of 0.25; 0.5; 1.0, and 2.0 mg/mL. By detecting the dye in the bands, it was defined that this technique is sensitive and can detect very small GAG concentrations, above 0.1 µg. Three independent trials were carried out for both the CS ( $y = 58,86x + 1,19$ ) and DS ( $y = 89,60x + 10,89$ ) curves (Figure 2). The reproducibility was analyzed through the quantification of the bands, and their coloration intensities were significantly different considering  $p < 0.0001$ , which was calculated by one-way ANOVA.

#### Follow-up of patients on ERT and quantification

Figure 3 shows the electrophoreses of urine samples from patients with MPS and the pattern of the accumulated GAG bands over time after the ERT treatment.

The accumulated GAG bands visualized in the commercial agarose gel were quantified individually and the total sum was compared to the total GAG dosage carried out using the DMB method. The Pearson's correlation coefficient between the sum of GAG electrophoretic bands quantification (AVG) and the total GAG dosage was significant at  $r = 0.98$  ( $y = 0,43x + 7,15$ ) (Figure 4).

The individual analysis of each accumulated band made possible the observation of DS, HS, and CS accumulation in MPS I, as well as DS and CS in MPS VI, throughout the treatment, and their differences over time. The decrease in DS was higher than in HS during the treatment for patient A, who has MPS I. For patient B, who has MPS VI, the accumulated GAGs had a marked decrease for all the bands, while for patient C, who also has MPS VI, the accumulated GAG decrease only occurred in urine sample number 3 (Table 2).

## **Discussion**

Since the revision of the laboratory methodologies for the study of GAG excretion, published by Pennock in 1976 (15), several studies have been developed in order to improve, refine, and simplify the analysis of the GAGs, considering their important role for MPSs. In effect, GAGs are the main biochemical markers and, for this reason, researchers are constantly studying both their screening and treatment monitoring. In the 1960s, the paper spot tests were heavily used, however, due to the high rate of false negative results, these tests are no longer recommended (15-16). Thus, the analysis started being developed based on the GAG separation by precipitation followed by chromatography. For a long time, Thin Layer Chromatography (TLC) was considered the best qualitative method for GAG identification (17), however, since it is a time-consuming and exhausting procedure with many steps, it was unsuitable for smaller clinical laboratories and was replaced by electrophoresis.

Initially, the electrophoreses were used as a qualitative MPS screening method and, currently, they are described as a quantitative technique as well, after

the improvements in the separation, accuracy, and detection of GAG bands, as a result of several studies in the field, as suggested in the present study. This development evolved from the two-dimensional to the one-dimensional electrophoresis (9, 18), with the replacement of cellulose acetate plates by agarose gel and special dyes (8, 10-11).

In the present study, the principles of the electrophoretic techniques described in the literature were adapted to a commercial agarose gel, obtaining good results in the separation and definition of the bands. This can be explained by the small thickness of the gel, which allows for a faster migration rate of GAG molecules through the gel matrix and also reduces the time needed for the procedure. Additionally, the reproducibility was demonstrated through the CS and DS curves, solving a problem related to the electrophoresis in lab-made agarose gel, due to the frequent migrations and different separations of the GAG bands. This is attributed to the biases in lab-made agarose gel preparation, such as the thickness and flatness of the gel, well depth, and complete dissolution of agarose powder.

The sample volume of precipitated GAGs was better in the commercial agarose gel when compared to the lab-made agarose gel. Good reproducibility was obtained by using ten-fold less sample volume in comparison to the lab-made agarose gel. Another important aspect of this electrophoresis is the total runtime of the method due to the quicker electrophoretic runs and discoloration, providing the result in a few hours, unlike the technique with the lab-made agarose gel, which gives the result only after one or two days according to the gel discoloration process.

The definitive MPS diagnosis is only accomplished through the enzyme analysis, however, it is impossible to examine all the 11 deficient enzymes in every

suspected case because the tests used to measure enzyme activity require high-cost substrates (19-20). Urine screening through GAG dosage is ideal since all the MPSs accumulate GAGs, but just the total accumulated GAG quantification itself does not significantly aid in the clarification of the MPS type. Therefore, proper techniques are needed that individually evaluate the accumulated GAG profile in order to direct the enzyme analysis. Thus, neonatal screening, through to analysis of urinary GAGs, is suggested in the present research as an application of commercial agarose gel electrophoresis. The electrophoretic profile of GAG separated by electrophoresis has been applied as a screening tool to identify MPS with satisfactory results (21-23). The electrophoretic analysis can also rule out MPS suspicion, since the present results indicate that healthy patients do not accumulate GAGs through visible bands.

The urinary GAGs dosage in the treatment follow-up of MPS patients, either by ERT or hematopoietic stem cell transplant, is an assessment practice due to the importance of GAGs as biomarkers (6, 24). This field has been widely explored and the total GAG analyses have been replaced by methods that directly explore the individual detection of substrates accumulation. Liquid chromatography, ELISA, and mass spectrometry are examples of techniques that have already been evaluated for the direct quantification of DS and HS during treatment follow-up (4-5, 25). Moreover, the DS/CS ratio combined with the enzymatic activity has already been studied as a selection criterion for transplant donors (26). In this sense, the electrophoresis technique presented in this research is simple and can be used in small-sized laboratories. In the current study, an individual profile of each accumulated GAG in patients on ERT was obtained. After the quantification, the results showed differences in the GAG accumulation from patient to patient. This is

in accordance with the literature, since the decrease in GAG accumulation as a response to the ERT treatment depends on the type of mutation involved, age of diagnosis and therapy initiation, the presence of neutralizing antibodies, and the GAG accumulation status itself (24). Thus, another application suggested by the researchers for GAG electrophoresis with commercial agarose gel is in the follow-up of patients treated with ERT by monitoring the urinary GAG levels.

The densitometry technique in the electrophoresis is used as an instrumental method to quantify and determine an approximate rate of each type of accumulated GAGs (8, 10, 11, 21). Indeed, this technique contributes with the gel analysis, showing percentage relations of each band, and, therefore, it should be classified as a semi-quantitative method. When the use of a quantification program for the gels in this electrophoresis is demonstrated and the values obtained are correlated with the total urinary GAG dosage, it is suggested that this electrophoresis technique should be both qualitative and quantitative. Additionally, the researchers believe that electrophoresis is a method that excludes possible false positive results from the total urinary GAG dosage, using the DMB method, for instance. Although high values of GAGs/creatinine found in urine samples of healthy controls do not show the GAG accumulated bands in the electrophoretic profile, such as those from MPS patients, this may happen in neonatal urine samples. in which the GAG excretion value is high (15). According to this, the present electrophoresis technique did not detect any accumulated GAG in control urine samples, even in those from infants.

In this study, the electrophoresis technique was adapted to a commercial agarose gel, making the process simpler and faster, as well as assuring the reproducibility and sensitivity. Besides separating and identifying accumulated GAGs in MPS patient's urine, the GAG bands were quantified for the evaluation of ERT

treatment. It is suggested that this methodology can be applied by clinical laboratories for the screening of neonatal MPS among high-risk populations and also during the follow-up of patients on ERT treatment in order to quantify the accumulated urinary GAG levels, since it is a simple, suitable, and reliable analysis method.

### **Conflict of interest statement**

**Authors' conflict of interest disclosure:** The authors stated that there are no conflicts of interest regarding the publication of this article. Research support played no role in the study design, in the collection, analysis, and interpretation of data, in the writing of the report, or in the decision to submit the report for publication.

**Research funding:** The study was supported by CNPq.

**Employment or leadership:** None declared.

**Honorarium:** None declared.



## References

1. Neufeld EF, Muenzer J. The Mucopolysaccharidoses. In: Scriver CR, editor. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw–Hill, 2001:3421-3452.
2. Coutinho MF, Lacerda L, Alves S. Glycosaminoglycan storage disorders: a review. *Biochem Res Int* 2012; 2012:471325.
3. Clarke LA, Winchester B, Giugliani R, Tyłki-Szymanska A, Amartino H. Biomarkers for the mucopolysaccharidoses: Discovery and clinical utility. *Mol Genet Metab* 2012; 106:395-402.
4. Aurays-Blais C, Bhérer P, Gagnon R, Young SP, Zhang HH, An Y et al. Efficient analysis of urinary glycosaminoglycans by LC-MS/MS in mucopolysaccharidoses type I, II and VI. *Mol Genet Metab* 2011; 102:49-56.
5. Tomatsu S, Montaña AM, Oguma T, Dung VC, Oikawa H, Carvalho TG et al. Dermatan sulfate and heparin sulfate as a biomarker for mucopolysaccharidosis I. *J Inherit Metab Dis* 2010; 33:141-50.
6. Swiedler SJ, Beck M, Bajbouj M, Giugliani R, Schwartz I, Harmatz P et al. Threshold effect of urinary glycosaminoglycans and walk test as indicators of disease progression in a survey of subjects with Mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy Syndrome). *Am J Med Genet A* 2005; 134:144-50.
7. Beck M. Therapy for Lysosomal Storage Disorders. *Life* 2010; 62 :33-40.
8. Hopwood JJ, Harrison JR. High-Resolution of Urinary Glycosaminoglycans: An Improved Screening Test for the Mucopolysaccharidoses. *Anal Biochem* 1982; 119:120-7.

9. Cappelletti R, Rosso MD, Chiarugi VP. A New Electrophoretic Method for the complete Separation of all Known Animal Glycosaminoglycans in a Monodimensional Run. *Anal Biochem* 1979; 99:311-15.
10. Coppa GV, Buzzega D, Zampini L, Maccari F, Galazzi T, Padella L et al. Agarose-gel electrophoresis for the diagnosis of mucopolysaccharidoses. *Clin Chem Lab Med* 2012; 50:589-92.
11. Volpi N, Maccari F. Detection of submicrogram quantities of glycosaminoglycans on agarose gels by sequential staining with toluidine blue and Stains-All. *Electrophoresis* 2002; 23:4060-66.
12. Di Ferrante N, Rich C. The mucopolysaccharide of normal human urine. *Clin Chim Acta* 1956; 1:519-24.
13. Bosnes RW, Taussky HH. On the colorometric determination of creatinine by the Jaffé reaction. *J Biol Chem* 1945; 158:581-91.
14. De Jong JCN, Wevers RA, Sambek RL. Measuring Urinary Glycosaminoglycans in the Presence of Protein: An Improved Screening Procedure for Mucopolysaccharidoses Based on Dimethylmethylene Blue. *Clin Chem* 1992; 38:803-7.
15. Pennock CA. A review and selection of simple laboratory methods used for the study of glycosaminoglycan excretion and the diagnosis of the mucopolysaccharidoses. *J Clin Path* 1976; 29:111-23.
16. Berry HK, Spinanger J. A paper spot test useful in study of Hurler's syndrome. *J Lab Clin Med* 1960; 55:136-8.

17. Humbel R, Chamoles NA. Sequential thin layer chromatography of urinary acid glycosaminoglycans. *Clin Chim Acta* 1972; 40:290-3.
18. Hata R, Nagai Y. A Rapid and Micro Method for Separation of Acidic Glycosaminoglycans by Two-Dimensional Electrophoresis 1972; 45:462-8.
19. Reuser AJ, Verheijen FW, Bali D, van Diggelen OP, Germain DP, Hwu W et al. The use of dried blood spot samples in the diagnosis of lysosomal storage disorders – Current status and perspectives. *Mol Genet Met* 2011; 104:144-8.
20. Metz TF, Mechtler TP, Orsini JJ, Martin M, Shushan B, Herman JL et al. Simplified Newborn Screening Protocol for Lysosomal Storage Disorders. *Clin Biochem* 2011; 57:1286-94.
21. De Lima CR, Baccarin RYA, Michelacci YM. Reliability of 1,9-dimethylmethylene blue tests in comparison to agarose gel electrophoresis for quantification of urinary glycosaminoglycans. *Clin Chim Acta* 2007; 378:206-15.
22. Gallegos-Arreola MP, Machorro-Lazo MV, Flores-Martínez SE, Zúñiga-González GM, Figuera LE, González-Noriega A, Sánchez-Corona J. Urinary Glycosaminoglycan Excretion in healthy Subjects and in Patients with Mucopolisaccharidoses. *Arch Med Res* 2000; 31:505-10.
23. Piraud M, Boyer S, Mathieu M, Maire I. Diagnosis of mucopolysaccharidoses in a clinically selected population by urinary glycosaminoglycan analysis: a study of 2,000 urine samples. *Clin Chim Acta* 1993; 221:171-81.
24. Wynn RF, Wraith JE, Mercer J, O'Meara A, Tylee K, Thornley M, et al. Improved Metabolic Correlation in Patients with Lysosomal Storage Disease Treated with

Hematopoietic Stem Cell Transplant Compared with Enzyme Replacement Therapy.  
J Pediatr 2009; 154:609-11.

25. De Ru MH, van der Tol L, van Vlies N, Bigger BW, Hollak CEM, Ijlst L, Kulik et al. Plasma and urinary levels of dermatan sulfate and heparan sulfate derived disaccharides after long-term enzyme replacement therapy (ERT) in MPS I: correlation with the timing of ERT and with total urinary excretion of glycosaminoglycans. J Inherit Metab Dis 2013; 36:247-55.

26. Church H, Tylee K, Cooper A, Thornley M, Mercer J, Wraith E et al. Biochemical monitoring after hematopoietic stem cell transplant for Hurler syndrome (MPSIH): implications for functional outcome after transplant in metabolic disease. Bone Marrow Transplant 2007; 39:207-10.

Table 1. Electrophoresis technique: lab-made gel *versus* commercial gel.

Electrophoresis with lab-made gel			Electrophoresis with commercial gel		
<b>Volume</b>		5 uL	<b>Volume</b>		0.5 uL
<b>Run</b>		<b>Precipitation</b>	<b>Run</b>		<b>Precipitation</b>
1	45-60 min	15 min ethanol 50%	1	5-7 min	5 min ethanol 50%
2	80-90 min	15 min ethanol 35%	2	20-35 min	5 min ethanol 35%
3	120-180 min	15 min toluidine blue 1%	3	40-50 min	10 min toluidine blue 1%
<b>Discoloration</b>		24-48 h in water	<b>Discoloration</b>		20-30 min in water
Constant voltage of 100 V and current between 10-20 mA					

Table 2: Quantification of GAGs in patients treated with ERT.

Patient	AVG					DMB (mg/L)
	Urine	DS	HS	CS	Total	
A	1	122	24	20	166	569.47
	2	61	20	10	91	195.77
	3	93	23	12	128	338.40
B	1	135	NP	17	152	140.78
	2	25	NP	6	31	41.86
	3	35	NP	3	38	64.35
C	1	64	NP	9	73	138.45
	2	70	NP	7	77	182.40
	3	40	NP	4	44	79.34

Note: Comparison between the quantification of electrophoretic GAG bands (AVG) with the total dosage of GAGs using DMB (mg/L) according to the figure 3. Patients A = MPS I, B and C = MPS VI; NP = not present.

## Legends

Fig.1. Comparison between electrophoretic methods for GAGs analysis in agarose gel: (a) electrophoresis with lab-made agarose gel and (b) electrophoresis made in commercial agarose gel from CELM. The migration rate values of GAG bands accumulated in commercial gel electrophoresis was better when compared to the lab-made gel. S = standard and C = control sample.

Fig. 2. Electrophoretic curve of CS and DS; (a) electrophoresis with different concentrations of CS and DS (0.25; 0.5; 1.0, and 2.0 mg/mL), samples of 5  $\mu$ l of each solution were applied; (b) analysis of CS and DS quantification curves (AVG) calculated as mean  $\pm$  standard deviation. Three independent curves were performed for each GAG.

Fig. 3. Electrophoresis of GAGs in patients treated with ERT. Patient A with MPS I with accumulation of DS, HS and CS. Patients B and C with MPS VI with accumulation of DS and CS. Numbers 1, 2 and 3 represent urine samples over time: 1 = before ERT; 2 = a year post treatment initiation and 3 = 6 months after sample 2.

Fig. 4. Correlation between quantification of GAG bands (AVG) of electrophoresis (Figure 3) and total urinary GAGs using DMB reaction technique. Pearson  $r = 0.98$ .

Figure 1:

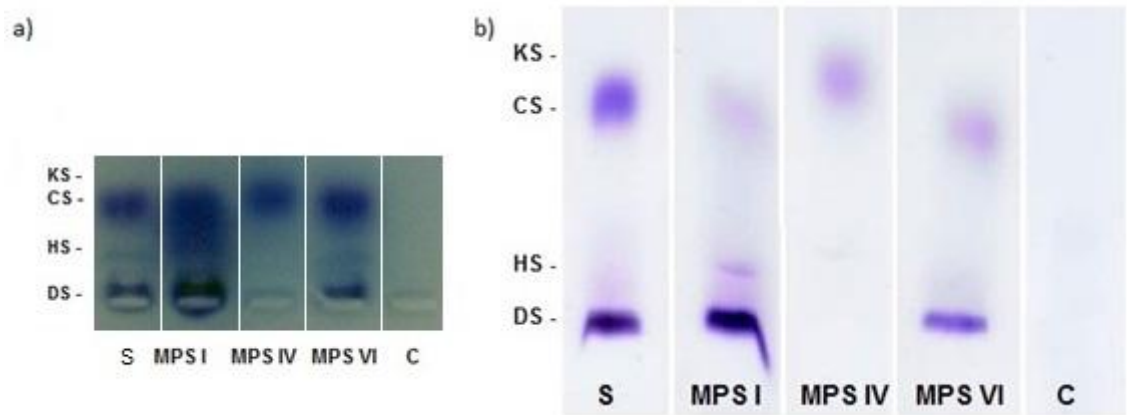




Figure 2:

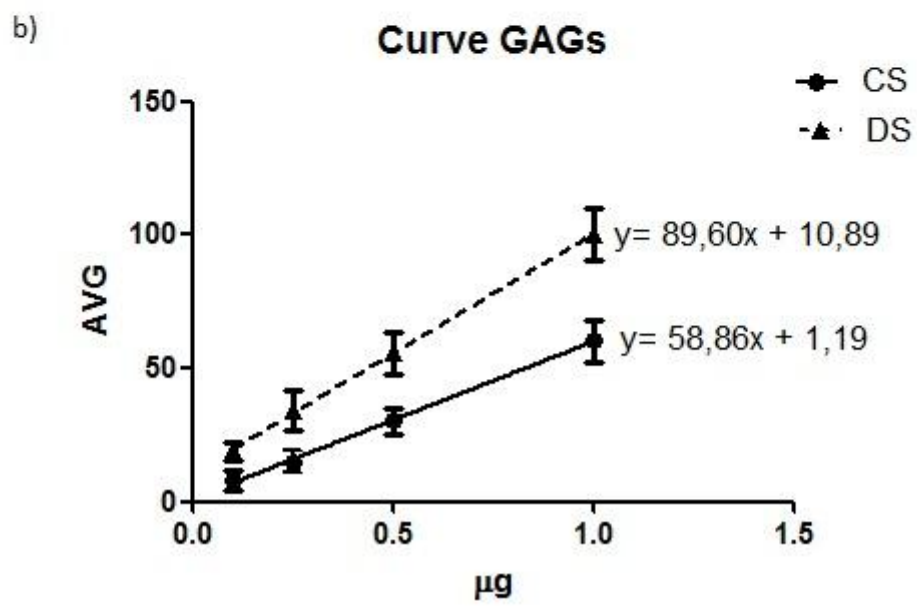
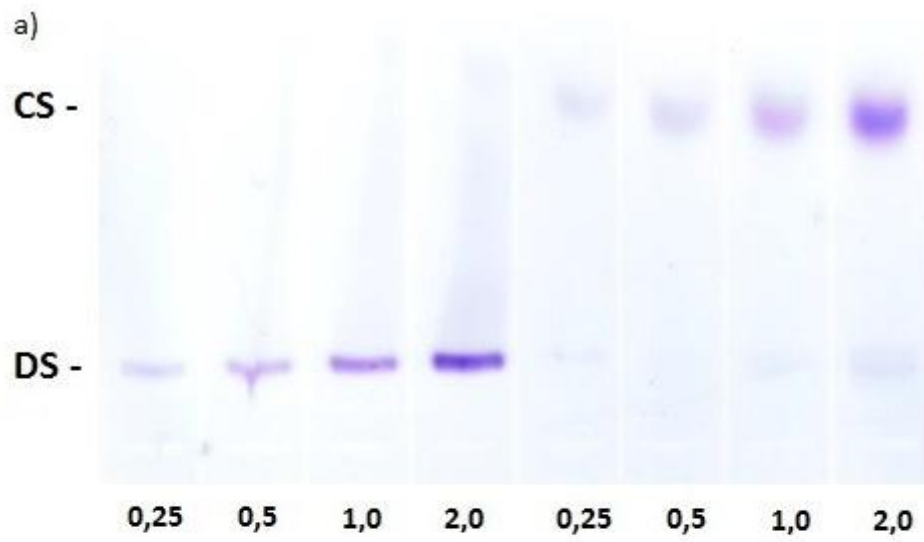


Figure 3:

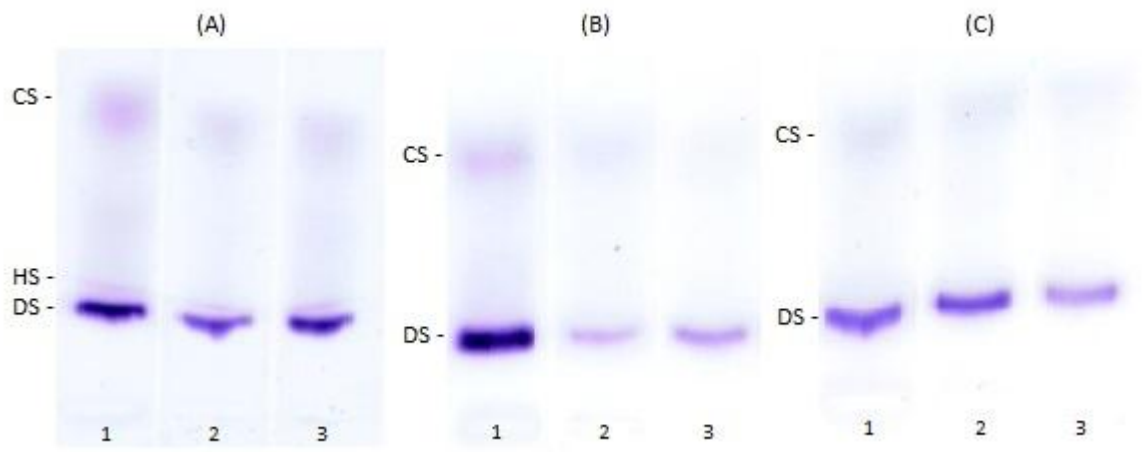
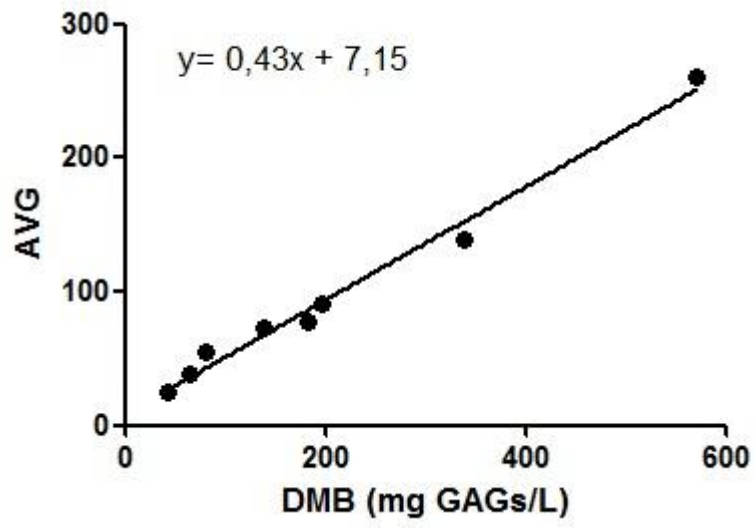


Figure 4:



---

## 4. Capítulo II

**Artigo:** *Correlation of the glycosaminoglycans levels between urine and dried urine filter paper samples and their stability over time under different storage temperatures*

- **Status:** *Aceito para publicação no periódico Clinica Chimica Acta*

---



Contents lists available at ScienceDirect

Clinica Chimica Acta

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/clinchim](http://www.elsevier.com/locate/clinchim)

1 Correlation of the glycosaminoglycans levels between urine and dried  
 2 urine filter paper samples and their stability over time under different  
 Q4 storage temperatures

Q1 Ana Carolina Breier, Jaqueline Cé, Janice Carneiro Coelho \*

5 Department of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

6 A R T I C L E I N F O

7 Article history:  
 8 Received 10 December 2013  
 9 Received in revised form 20 February 2014  
 10 Accepted 24 February 2014  
 11 Available online xxx

12 Keywords:  
 13 Mucopolysaccharidoses  
 14 Glycosaminoglycans  
 15 Dried urine in filter paper

A B S T R A C T

*Background:* Mucopolysaccharidoses (MPSs) are a group of lysosomal storage diseases caused by the deficiency/ Q6  
 Q7 absence of enzymes which catalyze the degradation of glycosaminoglycans (GAGs). The use of biological samples  
 16 dried on filter paper has been increasing because it makes it easy to ship them to reference laboratories. Urinary  
 17 GAGs are the main biomarkers of MPS and, thus, we studied the correlations of determinations to GAGs and cre-  
 18 atinine, as well as compared the GAGs' profile on electrophoresis, between urine and dried urine in filter paper  
 19 (DUFPP) samples. We also assessed the GAG stability over time under different storage temperatures.  
 20  
 Q8  
 21 *Methods:* We quantified the GAG concentration in both sample types and compared the results by Pearson  
 22 correlation.  
 23  
 24 *Results:* The results were very similar, with  $r = 0.97$  for creatinine and with  $r = 0.94$  and  $r = 0.98$  for GAGs for  
 25 controls and patients, respectively, with similar electrophoretic profiles. The GAG stability in DUFPP was up to  
 26 30 days at  $-20, 4,$  and  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  and up to 21 days at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .  
 27  
 28 *Conclusion:* Our proposal assessed urinary GAGs in DUFPP and concluded that these samples can be used in the  
 29 investigation of MPS, replacing urine samples in neonatal screening and monitoring of therapies, due to ease of  
 30 transportation and storage.

© 2014 Published by Elsevier B.V.

31  
 32  
 33  
 34  
 35 1. Introduction

36 Mucopolysaccharidoses (MPSs) are a group of related lysosomal  
 37 storage diseases caused by deficiency/absence of enzymes which cata-  
 38 lyze the intra-lysosomal degradation of glycosaminoglycans (GAGs).  
 39 Depending on the affected enzyme, the catabolism of dermatan sulfate  
 40 (DS), heparan sulfate (HS) and keratan sulfate (KS) can be blocked  
 41 alone or in combination. It is also suggested that the chondroitin sulfate  
 42 (CS) accumulation may be involved in MPS. The lysosomal accumula-  
 43 tion of GAG molecules leads to cellular, tissue and organ dysfunctions,  
 44  
 45 Q11 resulting in several symptoms such as: coarse facies, progressive  
 46 neurological deterioration, multiple bone dysplasias, short stature,  
 47 macrocephaly and cardiorespiratory damage [1]. Patients show great  
 48 results in their quality of life when MPS has an early diagnosis and  
 49 this is a strong motivation for continuing the researches and treatment  
 [2].

*Abbreviations:* MPS, mucopolysaccharidosis; GAGs, glycosaminoglycans; DUFPP, dried  
 urine in filter paper; DS, dermatan sulfate; HS, heparan sulfate; KS, keratan sulfate; CS,  
 chondroitin sulfate; DMB, 1,9-dimethylmethylene blue.

Q5 \* Corresponding author at: Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio  
 Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600 Anexo, Porto Alegre, RS, Brazil. 90035-003.  
 Tel.: +55 51 33085550; fax: +55 51 33085535.

E-mail address: [janice.coelho@ufrgs.br](mailto:janice.coelho@ufrgs.br) (J.C. Coelho).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2014.02.022>  
 0009-8981/© 2014 Published by Elsevier B.V.

In the field of genetic research, the use of biological samples dried on 50  
 filter paper is accepted worldwide in order to facilitate the shipping of 51  
 samples to reference laboratories for analyses. Urinary GAGs are the 52  
 main biomarkers of MPS and, thus, have great potential for use in 53  
 diagnostic areas, neonatal screening and therapy monitoring, so, the de- 54  
 termination of these biomarkers has become the subject of many studies 55  
 [3]. Recently, analyses of GAGs in dried urine in filter paper (DUFPP) 56  
 samples were demonstrated by different methodologies, with positive results 57  
 for the application of this type of sample in the investigation of MPS [4–7]. 58

59 2. Materials and methods

This study was approved by the Research Ethics Committee of 60  
 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, and the participants signed 61  
 the free informed consent. 62

63 2.1. Reagents and materials

Chondroitin sulfate (CS), dermatan sulfate (DS), 1,9- 64  
 dimethylmethylene blue (DMB), cetylpyridinium chloride (CPC), and 65  
 toluidine blue dye were purchased from Sigma Chemical Co. Agarose 66  
 gel films Geral® were from CELM (Companhia Equipadora de 67  
 Laboratórios Modernos, SP). Electrophoresis was performed in a hori- 68  
 zontal gel tank of the brand DIGEL, model DGH25, and a power source 69

Please cite this article as: Breier AC, et al, Correlation of the glycosaminoglycans levels between urine and dried urine filter paper samples and their stability over time under different storage temperatures, Clin Chim Acta (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2014.02.022>



70 GSR, model 300STD. For impregnation of urine into filter paper 903  
71 Protein Saver Card of brand Whatman™ (GE Healthcare Sciences) was  
72 used.

### 73 2.2. Impregnation of urine into filter paper

74 The urine samples were impregnated into Whatman 903 filter paper  
75 cards, cut into 3 cm × 5 cm rectangles. These cards were immersed in  
76 urine collection bottles containing approximately 10 ml of liquid  
77 sample. After complete impregnation of filter paper with urine for a  
78 few seconds, DUFFP samples were dried in an exhaust chamber for ap-  
79 proximately 4 h [7]. Some samples were air dried overnight for about  
80 12 h that allowed the evaluation of a usual method to prepare the  
81 samples.

### 82 2.3. Quantification of glycosaminoglycans

83 In this study, 74 urine samples from healthy controls of different  
84 ages (from 1 month to 32 y) and 7 samples from patients (2 with  
85 MPS I, 1 with MPS II, 1 with MPS IV and 3 with MPS VI) were quantified  
86 by a colorimetric technique using 1,9-dimethylmethylene blue (DMB),  
87 according to De Jong et al. [8]. After analyzing the quantification of  
88 urine samples, 20 urine samples from healthy controls were selected  
89 for tests in DUFFP, as well as all the urine samples from the patients.  
90 The criterion for selection of urine samples was the values of excretion  
91 of GAGs/creatinine to ensure the assessment of a wide range of concen-  
92 trations, from the lowest to the highest value, of healthy controls and  
93 patients.

94 GAGs analyzed from DUFFP were previously extracted from the filter  
95 paper through 15 circles of 6 mm diameter and were eluted with 1.1 ml  
96 of distilled water (type II) for 24 h under refrigeration. The measure-  
97 ment of creatinine was also obtained from the same eluate, using the  
98 method of Jaffé et al. [9].

### 99 2.4. Electrophoresis of glycosaminoglycans

100 The agarose gel electrophoresis was performed according to the  
101 technique described by Cappelletti et al. and Hopwood and Harrison  
102 [10,11] with some modifications for comparison of the GAG profile be-  
103 tween the urine samples and DUFFP. Thus, cards with DUFFP samples  
104 from patients with MPSs I and VI were used. Previously, the cards  
105 were cut into narrow longitudinal strips and then eluted with 3.8 ml  
106 of distilled water (type II) for 24 h under refrigeration. After elution,  
107 the urine GAGs and DUFFP were extracted with 1% CPC solution using  
108 the method of Di Ferrante and Rich [12]. The aliquots of the extracted  
109 GAGs were subjected to agarose gel electrophoresis to separate the  
110 GAG bands, followed by staining with toluidine blue and discoloration  
111 of gel in water. The bands stained with toluidine blue were scanned  
112 and quantified using AlphaEase FC software (Alpha Innotech Corpora-  
113 tion). The results obtained with the GAG bands were quantified in  
114 AVG (total sum of pixels divided by the size of the band area) and sub-  
115 sequently assessed in order to compare the GAG bands.

### 116 2.5. Stability of DUFFP samples over time and storage temperatures

117 The evaluation of GAG stability was performed with DUFFP cards  
118 stored at different temperatures: -20, 4, 25 and 37 °C. When the  
119 urine was impregnated in filter paper, the analyses were repeated on  
120 different days after the first: 3, 15, 30, and 60 days. Therefore, we divid-  
121 ed the urine samples into 3 groups of GAG concentrations as follows:  
122 low, medium and high. For the low group, we have selected 3 urine sam-  
123 ples from control individuals, with excretion values between 30 and  
124 80 µg GAGs/mg creatinine; for the medium group, three other urine  
125 samples were collected, between 90 and 150 µg GAGs/mg creatinine  
126 and, finally, for the high group of GAG concentration, we have selected  
127 four urine samples >200 µg GAGs/mg creatinine.

### 2.6. Statistical analysis

128 Pearson's correlation coefficient was used to compare the results be-  
129 tween urine samples and DUFFP. For analysis of DUFFP stability over time at  
130 -20, 4 and 25 °C temperatures, the results were expressed as mean ±  
131 standard deviation, for each group, and compared by one-way ANOVA  
132 followed by the Tukey test, considering a significant p value < 0.05. The  
133 results of stability at 37 °C and the ways of drying the filter paper are  
134 expressed as mean ± SD and compared by 2-way ANOVA. All analyses  
135 were performed using the statistical program GraphPad Prism ver. 5.

## 3. Results

### 3.1. Quantification of GAGs and creatinine in urine

136 First, we used a total of 74 samples of urine from individuals of dif-  
137 ferent ages to analyze the profile of urinary excretion of GAGs, according  
138 to the age, as well as urine samples from seven patients with MPSs I and  
139 VI (Table 1). Based on these findings, we selected 20 urine samples from  
140 healthy controls, as well as urine samples from patients, for experi-  
141 ments in DUFFP. Urine samples from all age ranges were selected to en-  
142 sure minimum and maximum µg GAGs/mg creatinine values.

### 3.2. Correlation between the levels of GAGs in urine samples and DUFFP

143 Twenty urine samples from healthy controls of different ages (from  
144 1 month to 32 y) and from 7 patients with MPS (of types I and VI)  
145 were quantified for GAGs and creatinine. Creatinine and GAGs in urine  
146 and DUFFP are very similar. Pearson's correlation coefficients found for  
147 creatinine in healthy controls and in patients were  $r = 0.9752$  ( $y =$   
148  $1.08x + 14.45$ ) and  $r = 0.9743$  ( $y = 1.22x - 21.92$ ), respectively.  
149 For GAGs, Pearson's correlation coefficients in healthy controls and in  
150 patients were  $r = 0.9420$  ( $y = 0.79x + 13.85$ ) and  $r = 0.9810$  ( $y =$   
151  $0.99x + 9.11$ ), respectively (Fig. 1). Recovery calculations of GAGs in  
152 DUFFP were 95.4% and 92.8% for patients and controls, and for creatinine,  
153 were 83.6% and 89.9%, respectively.

154 In addition to the quantification of GAGs using DMB, we also deter-  
155 mined the levels of GAGs accumulated in the urine samples from pa-  
156 tients with MPS, separating them by agarose gel electrophoresis. We  
157 compared the GAG profile in urine and DUFFP, visualizing the same elec-  
158 trophoretic bands. However, the staining of the bands in the DUFFP sam-  
159 ples was fainter than that in the urine samples (Fig. 2). Pearson's  
160 coefficient correlation between the values obtained in quantifications  
161 of bands of GAGs in electrophoresis between urine and DUFFP samples  
162 was  $r = 0.9636$ .

### 3.3. Stability of GAGs in DUFFP sample

163 Initially, we assessed the stability of DUFFP samples at 3 different  
164 temperatures: -20, 4 and 25 °C over time. A significant decrease was  
165

**Table 1**  
Concentration of GAGs in urine samples from healthy controls and patients. Values are expressed in µg/mg creatinine.

Age range	Healthy controls			Patients	
	Mean ± SEM	Range	n	MPS	
0–6 months	247.4 ± 37.5	120.5–465.5	9	501.1	t1.1
6 months–1 y	239.0 ± 55.0	92.2–408.9	5	380.4	t1.2
1–2 y	178.4 ± 30.1	75.5–227.3	5	465.2	t1.3
2–3 y	153.1 ± 28.5	103.5–264.8	6	–	t1.4
3–5 y	133.5 ± 20.4	67.3–233.4	8	–	t1.5
5–7 y	130.2 ± 28.4	49.36–317.4	8	326.8	t1.6
7–9 y	94.26 ± 18.4	40.1–181.2	7	503.2	t1.7
9–14 y	84.45 ± 9.7	19.1–164.4	11	200.8	t1.8
14–18 y	77.18 ± 17.9	18.7–124.4	8	–	t1.9
>18 y	36.41 ± 6.7	18.4–68.8	7	91.9	t1.10

Please cite this article as: Breier AC, et al, Correlation of the glycosaminoglycans levels between urine and dried urine filter paper samples and their stability over time under different storage temperatures, Clin Chim Acta (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2014.02.022>



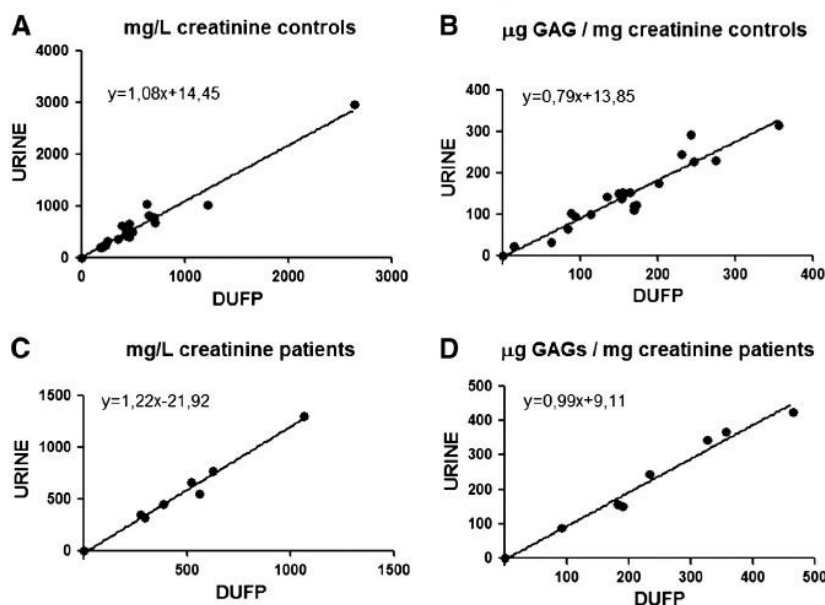


Fig. 1. Correlation between samples of urine and DUFF. In A and B the Pearson correlation coefficient for creatinine for controls and patients was  $r = 0.9752$  and  $r = 0.9743$ , respectively. In C and D, the Pearson correlation coefficient for GAGs for controls and patients was  $r = 0.9420$  and  $r = 0.9810$ , respectively.

170 found in the concentration of GAGs over the period of 60 days at all the  
 171 temperatures analyzed in the group with low excretion of GAGs. In the  
 172 groups with medium and high concentrations of GAGs there was no significant  
 173 difference of stability at the different temperatures and time periods analyzed (Fig. 3).

175 Analysis of stability to DUFF at 37 °C was performed on samples from  
 176 patients for up to 3 weeks. The result showed that GAGs in DUFF samples  
 177 are stable for biochemical analysis up to 21 days. Besides, during this  
 178 experiment, two ways of drying the filter paper were also compared, in the  
 179 exhaust chamber and air dried, that showed no difference for the stability  
 180 of GAGs (Fig. 4).

181 In order to confirm the results of the GAG quantification through  
 182 DMB of DUFF samples, we performed electrophoresis of DUFF samples  
 183 from patients with MPS I and MPS VI to monitor the stability of the profile  
 184 of GAGs, as shown in Fig. 5, and found the same profile of bands of  
 185 GAGs even after 60 days of storage, at the three different temperatures  
 186 analyzed. The obtained correlation was  $r = 0.99$  when comparing the  
 187 values of the quantification GAG band.

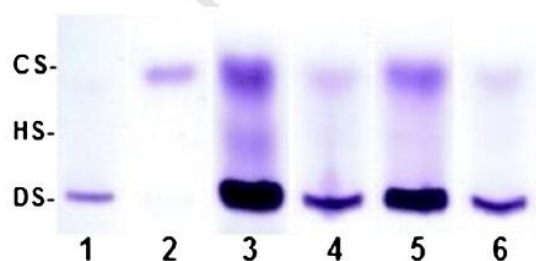


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of samples of urine and DUFF: 1 and 2 are standards of DS and CS, respectively; 3 and 4 represent a sample of a patient with MPS I in urine and DUFF, respectively, and 5 and 6, represent a sample of a patient with MPS VI, in urine and DUFF, respectively. The Pearson correlation coefficient obtained after individual quantification of the bands of GAGs was  $r = 0.9636$ .

#### 4. Discussion

188 Our findings indicated that the determination of urinary metabolites,  
 189 GAGs and creatinine, quantified in investigations of MPS, can be performed  
 190 with DUFF samples using conventional colorimetric methods. Using this type  
 191 of sample it is possible to separate the different GAGs accumulated in urine  
 192 samples from patients using agarose gel electrophoresis. Our experiments  
 193 also assessed the temperature and time of storage of these samples to ensure  
 194 reliable results.

196 The use of DUFF samples is increasing in studies on different metabolites  
 197 because this type of sample provides convenient and safe transportation,  
 198 storage and handling of samples [13–16]. Our study aimed to assess the  
 199 main MPS urinary biomarker in DUFF samples, correlating the results  
 200 obtained with urine quantification results. Creatinine and GAG concentration  
 201 values were very similar, resulting in a strong correlation, indicating that  
 202 this type of sample is suitable for biochemical evaluation. Other studies  
 203 using colorimetric method with DMB reagent showed favorable results,  
 204 suggesting the application of this sample in MPS screening as the analysis  
 205 sample [4,5,7]. Another proposal of screening with DUFF for the quantification  
 206 of GAGs was described by Auray-Blais et al. [6], using liquid chromatography–  
 207 tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) for MPSs I, II and VI. With the  
 208 methodology used it was possible to separately identify the peaks of DS,  
 209 HS and CS, an advantage over the previous methods, which express total  
 210 concentrations of GAGs corrected by the creatinine value. However, the  
 211 LC–MS/MS is still a difficult technique to apply due to the high cost of the  
 212 equipment.

213 GAG accumulated profile is very important in the investigation and  
 214 monitoring of MPS for two reasons: it indicates the type of MPS, helping  
 215 establish the definitive diagnosis, and, it acts as a biochemical marker  
 216 during the monitoring of MPS treatments, either by enzyme replacement  
 217 therapy or by bone marrow transplantation. Thus, we tested the use of  
 218 DUFF samples in agarose gel electrophoresis. Our results demonstrated that  
 219 the GAG profile in urine and DUFF samples was similar for both MPSs I and  
 220 VI. We observed that the bands of GAGs accumulated in the DUFF samples  
 221 were weaker than those in the urine samples.

Please cite this article as: Breier AC, et al, Correlation of the glycosaminoglycans levels between urine and dried urine filter paper samples and their stability over time under different storage temperatures, Clin Chim Acta (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2014.02.022>



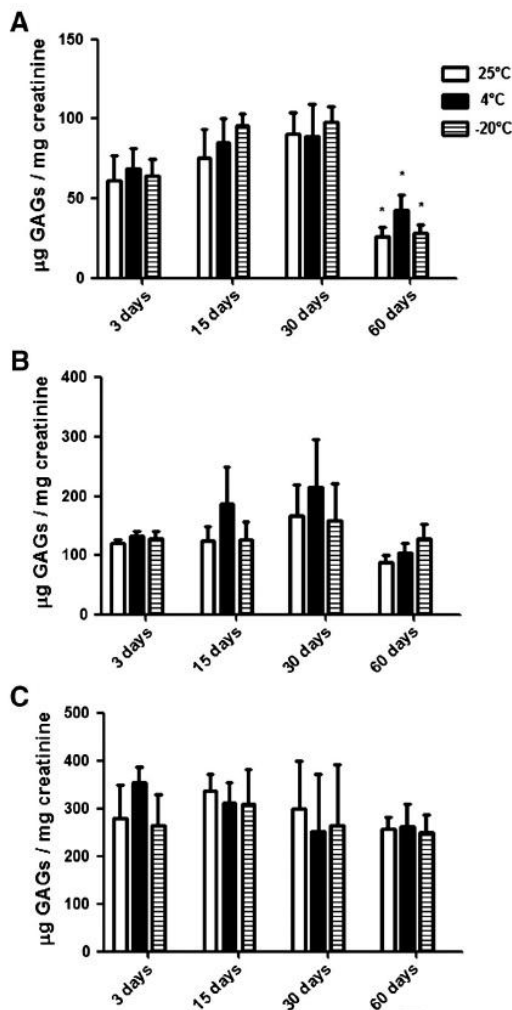


Fig. 3. Concentration of GAGs ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  creatinine) in DUFP at different storage temperatures: 25, 4 and  $-20^\circ\text{C}$ ; on days: 3, 15, 30 and 60 days of storage after impregnation of the card with urine. A, B and C represent groups with different GAG concentrations, respectively: low, medium and high excretion. \*Significant difference ( $p < 0.05$ ) between the concentrations of GAGs throughout time for each assessed temperature.

223 However, after quantification, the correlation between the results was  
224 very strong, with  $r = 0.96$ . Therefore, considering the history assess-  
225 ments of each patient, the analysis through GAG profile by electropho-  
226 resis would not be affected during the treatment follow-up and  
227 monitoring process. Our study was the first to report the separation of  
228 different GAGs, by agarose gel electrophoresis, and constitutes an alter-  
229 native to LC-MS/MS, for DUFP analysis with high values of GAGs and  
Q24 needs careful investigation on the type of accumulated GAGs.

231 The stability of GAGs in urine was described up to 10 days at room  
232 temperature. However, when the urine samples are stored under refrig-  
233 eration between  $5^\circ\text{C}$  and  $-30^\circ\text{C}$ , the stability of GAGs increases, being  
234  $> 15$  days [17]. In order to assess the stability of DUFP samples, we first  
235 divide the urine samples into three groups of concentration of GAGs  
236 to express the results as mean  $\pm$  SD. After repeating the analysis of con-  
237 centration at different temperatures during 60 storage days, we found a  
238 significant difference in the group of low concentration (GAGs/mg of  
239 creatinine) for the three storage temperatures. The reason for that is  
240 due to a decrease in their concentration and, for the other groups

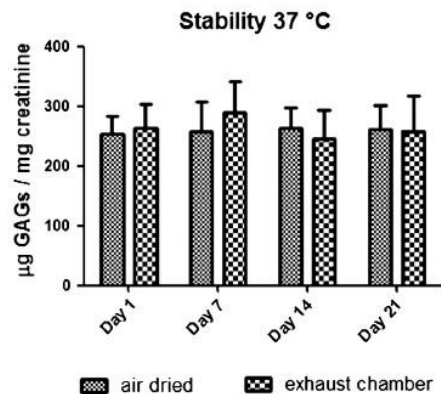


Fig. 4. Concentration of GAGs ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  creatinine) in DUFP at  $37^\circ\text{C}$  on 1, 7, 15 and 21 storage days after impregnation of the card with urine dried in an exhaust chamber or air dried. Data are mean  $\pm$  SD for 6 patient samples. Statistically not different from groups (2-way ANOVA). Q3

(medium and high concentrations of GAGs), there was no difference 241  
in the analyzed temperatures and times. Corroborating our data, other 242  
researchers had already reported that the stability over time for solu- 243  
tions of DS and HS in DUFP was up to 6 weeks for room temperature, 244  
 $4^\circ\text{C}$ ,  $-20^\circ\text{C}$  and  $-80^\circ\text{C}$  [6]. Our results also showed a GAG stability 245  
at  $37^\circ\text{C}$  for three weeks. We performed this experiment considering 246  
that the samples could be exposed to an analytical laboratory at high 247  
temperatures during transit. Therefore, we recommend that analysis 248  
of GAGs in DUFP is performed within three weeks after impregnation 249  
on filter paper with urine air dried, without the need for cooling during 250  
transport, since this fact contributes greatly to increase shipping costs. 251

Besides the total quantifications, the profile of GAGs from patients 252  
with MPSs I and VI, which were demonstrated by agarose gel electropho- 253  
resis, has confirmed the results of GAG stability in DUFP. Such results 254  
are explained by the similarity of the accumulated bands in the 255  
three temperatures ( $-20$ ,  $4$  and  $25^\circ\text{C}$ ), where the correlation coeffi- 256  
cient was  $r = 0.99$  among all temperatures. 257

The use of DUFP samples is more convenient due to its easy collec- 258  
tion, transport and storage, which reduces costs, particularly, when 259  
the sample needs to be transported over long distances. Our proposal 260  
considered a complete evaluation of urinary GAGs in DUFP, determining 261  
the total concentration of GAGs/creatinine followed by the profile of 262  
GAGs, which are separated by agarose gel electrophoresis and 263  
demonstrate stability up to one month for  $-20$ ,  $4$ ,  $25^\circ\text{C}$  and three 264  
weeks at  $37^\circ\text{C}$ . We conclude that DUFP samples can be used in the 265  
MPS investigation, therapy monitoring and replacement of urine 266  
samples during neonatal screening, once they are more convenient 267  
and provide safer storage and transportation. Q27 268

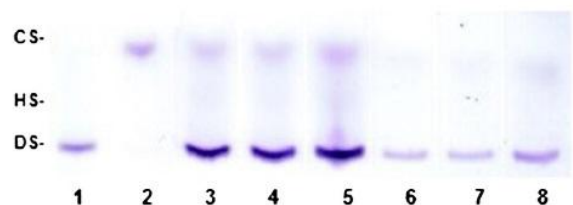


Fig. 5. Agarose gel electrophoresis of DUFP sample: 1 and 2 are standards of DS and CS, respectively; 3, 4 and 5 represent samples of a patient with MPS I, stored at  $25$ ,  $4$  and  $-20^\circ\text{C}$ , respectively, after 60 days; 6, 7 and 8 represent samples of patient with MPS VI, also stored at  $25$ ,  $4$  and  $-20^\circ\text{C}$ , respectively, after 60 days. The correlation coefficient after individual quantification of bands of GAGs was  $r = 0.99$ .



269 **Acknowledgments**

270 We thank the genetic specialist responsible for supplying the sam-  
 271 ples from patients with MPS used in this paper, Dr. Charles Marques  
 Q28 Lourenço. This study was funded by CNPq, CAPES and Propesq/UFRGS.

273 **References**

- 274 [1] Neufeld EF, Muenzer J. The mucopolysaccharidoses. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly  
 275 WS, Valle D, editors. The metabolic & molecular basis of inherited disease. New  
 276 York: McGraw-Hill; 2001. p. 3421.
- 277 [2] Beck M. Therapy for lysosomal storage disorders. *Life* 2010;62:33–40.
- 278 [3] Clarke LA, Winchester B, Giugliani R, Tylki-Szymanska A, Amartino H. Biomarkers for  
 279 the mucopolysaccharidoses: discovery and clinical utility. *Mol Genet Metab*  
 280 2012;106:395–402.
- 281 [4] Whitley CB, Spielmann RC, Herro G, Teragawa SS. Urinary glycosaminoglycan excre-  
 282 tion quantified by an automated semimicro method in specimens conveniently  
 283 transported from around the globe. *Mol Genet Metab* 2002;75:56–64.
- 284 [5] Alonso-Fernández JR, Fidalgo J, Colón C. Neonatal screening for  
 285 mucopolysaccharidoses by determination of glycosaminoglycans in the elu-  
 286 ate of urine-impregnated paper: preliminary results of an improved DMB-  
 287 based procedure. *J Clin Lab Anal* 2010;24:149–53.
- 288 [6] Aurays-Blais C, Lavoie P, Zhang H, Gagnon R, Clarke JT, Maranda B, et al. An improved  
 289 method for glycosaminoglycan analysis by LC-MS/MS of urine samples collected on  
 290 filter paper. *Clin Chim Acta* 2012;413:771–8.
- 291 [7] Civalero G, Bender F, Gomes A, Marasca G, Guidobono R De, Mari J, et al. Reliable de-  
 292 tection of mucopolysacchariduria in dried-urine filter paper samples. *Clin Chim Acta*  
 293 2013;415:334–6.
- [8] De Jong JG, Wevers RA, Liebrand-van Sambeek R. Measuring urinary glycosaminogly-  
 cans in the presence of protein: an improved screening procedure for  
 mucopolysaccharidoses based on dimethylmethylene blue. *Clin Chem* 1992;38:803–7.  
 296
- [9] Bosnes RW, Taussky HH. On the colorimetric determination of creatinine by the Jaffé  
 reaction. *J Biol Chem* 1945;158:581–91.  
 297
- [10] Cappelletti R, Rosso MD, Chiarugi VP. A new electrophoretic method for the com-  
 plete separation of all known animal glycosaminoglycans in a monodimensional  
 run. *Anal Biochem* 1979;99:311–5.  
 299
- [11] Hopwood JJ, Harrison JR. High-resolution of urinary glycosaminoglycans: an improved  
 screening test for the mucopolysaccharidoses. *Anal Biochem* 1982;119:120–7.  
 300
- [12] Di Ferrante N, Rich C. The mucopolysaccharide of normal human urine. *Clin Chim*  
 Acta 1956;1:519–24.  
 301
- [13] Blau N, Matasovic A, Lukasiewicz-Wedlechowicz A, Heizmann CW, Leumann E. Sim-  
 ultaneous determination of oxalate, glycolate, citrate and sulfate from dried  
 urine filter paper spots in a pediatric population. *Clin Chem* 1998;44:1554–6.  
 302
- [14] Auray-Blais C, Cyr D, Mills K, Giguère R, Drouin R. Development of a filter paper  
 method potentially applicable to mass and high-risk urinary screenings for Fabry  
 disease. *J Inher Metab Dis* 2007;30:106.  
 303
- [15] Forman M, Valsamakis A, Arav-Boger R. Dried urine spot for detection and quantifi-  
 cation of cytomegalovirus in newborns. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012;73:326–9.  
 304
- [16] Antunes MV, Niederauer CG, Linden R. Development, validation and clinical evalua-  
 tion of dried urine spot method for determination of hippuric acid and creatinine.  
 Clin Biochem 2013;46:1276–80.  
 305
- [17] Andrade F, Prieto JA, Elorz J, Martín S, Sanjurjo P, Aldámiz-Echevarría L. Stability of  
 urinary glycosaminoglycans in patients with mucopolysaccharidoses. *Clin Chim*  
 Acta 2008;388:73–7.  
 306

---

## 5. Capítulo III

**Artigo:** *Alpha-L-Iduronidase and arylsulphatase B in dried blood spots on filter paper: biochemical parameters and time stability* - **Status:** *Submetido ao periódico Applied Biochemistry and Biotechnology*

---

**Alpha-L-iduronidase and arylsulfatase B in dried blood spots on filter paper:  
biochemical parameters and time stability**

Ana Carolina Breier, Jaqueline Cé, Jamila Mezzalira, Vanessa V. Daitx,

Vitoria C. Moraes, Mariana P. S. Goldim and Janice C. Coelho

Postgraduate Program, Biochemistry Department, Lysosomal Storage Diseases  
Testing Laboratory, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto  
Alegre, RS, Brazil

**Abbreviations:** MPS, Mucopolysaccharidoses; Km, Michaelis-Menten constant;  
Vmax, maximum velocity; IDUA,  $\alpha$ -L-iduronidase; ASB, arylsulfatase B;

Correspondence to: Prof<sup>a</sup> Dra. Janice C Coelho

Departamento de Bioquímica  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Rua Ramiro Barcelos, 2600, anexo  
Porto Alegre – RS – Brazil 90035-003  
Phone: 55 51 33085550  
Fax: 55 51 33085535  
E-mail: [janice.coelho@ufrgs.br](mailto:janice.coelho@ufrgs.br)

## Abstract

The goal of this study was to assess the biochemical parameters of the enzymes  $\alpha$ -L-iduronidase (IDUA) and arylsulfatase B (ASB), which are deficient in mucopolysaccharidosis (MPS) I and VI, respectively, in dried blood spot (DBS) samples impregnated on filter paper. The optimal pH,  $K_m$ , and  $V_{max}$  of IDUA and ASB in DBS are hereby presented. After these analyses, the reference values for the activities of these enzymes in DBS with cutoff of 3.65 nmol/h/mL for IDUA and 6.80 nmol/h/mL for ASB were established. The research also showed that the stability (21 days) of the IDUA activity is lower than ASB's, which maintained its enzymatic activity stable up until 60 days of analysis after impregnating the filter paper with blood. Currently, DBS ensures important advantages in handling storage and transportation of samples with respect to neonatal screening programs. This study contributes to characterizing and differentiating the biochemistry of deficient enzymes in MPSs I and VI in DBS samples.

Keywords: Dried blood spots, Mucopolysaccharidosis, optimum pH,  $K_m$ , maximum velocity.

## 1. Introduction

Mucopolysaccharidoses (MPSs) are caused by deficiency in the activity of lysosomal enzymes needed to degrade glycosaminoglycans (GAGs), which are long unbranched polysaccharides consisting of repeating disaccharides. Lysosomal storage of GAGs molecules results in cell, tissue, and organ dysfunction. There are 11 known enzyme deficiencies that give rise to seven distinct MPSs [1].

MPSs share many clinical features, although to variable degrees. Most MPSs patients are asymptomatic at birth, with subsequent onset of clinical signs and symptoms. These clinical features include a chronic and progressive disease course, multiple organ system involvement, organomegaly, dysostosis multiplex, and abnormal facies [2]. Mucopolysaccharidosis type I (MPS I) is caused by the deficient activity of lysosomal hydrolase  $\alpha$ -L-iduronidase (IDUA) (EC 3.2.1.76) and can manifest three major clinical phenotypes: Hurler, Scheie, and Hurler-Scheie syndromes. The major characteristic in MPS I is the profound neurological impairment [3]. Another type is mucopolysaccharidosis VI (MPS VI), that is caused by the deficient activity of arylsulfatase B enzyme (ASB) (EC 3.1.6.12), also known as Maroteaux-Lamy syndrome. MPS VI has characteristic bone lesions without central nervous system (CNS) involvement [4]. The estimated incidences of MPS I and VI are 1.22 and 0.33 cases/100,000 births, respectively [5].

Currently, the course of the disease can be changed and patient health significantly improved through bone marrow transplantation and enzyme replacement therapy [6, 7]. However, the effectiveness of these treatments is maximized when they are applied before the establishment of permanent damage to

tissues and organs. Therefore, it is very important to have a reliable diagnostic method, which even allows the detection of asymptomatic neonatal patients [8].

Chamoles *et al.* (2001) [3] first reported IDUA activity determination by fluorometric assay on dried blood spots (DBS) on filter paper. This matrix provides important advantages in sample handling, storage and transportation compared to traditional methods in leukocyte homogenates. In addition, collecting DBS is a less invasive process and is routinely performed in neonatal screening programs [9, 10]. Studies to standardize and optimize the techniques [11, 12], besides the development and evaluation of the quality control for this type of sample [13, 14], has contributed to the reliability and safety of the results from DBS.

The main goal of this study was to establish the biochemical parameters for optimal pH, Michaelis-Menten constant ( $K_m$ ), and maximum velocity ( $V_{max}$ ) of the deficient enzymes in MPS I and VI, IDUA, and ASB, respectively, in DBS samples. From the optimal pH, the reference and cutoff values were established for these enzymes in DBS samples for healthy individuals and patients. Moreover, the stability of the enzyme activity was established for these samples over the storage period for greater reliability of the results.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Reagents**

The substrates used were 4-methylumbelliferyl  $\alpha$ -L-iduronide (Glycosynth, Warrington, England) and 4-methylumbelliferyl sulfate (Sigma, Sta. Louis, MO,

USA). Paper punches were Harris Unicore 1.2 mm (Saint Louis, MO, USA). Heparin tubes were purchased from BD Vacutainer (Becton and Dickinson, São Paulo, SP, Brazil). The filter paper 903 Protein Saver Card was from Whatman™ (GE Healthcare Sciences, Florham Park, USA).

## 2.2. Sample

The blood samples were collected in heparin tubes from 20 healthy donors. The samples were homogenized and the whole blood was impregnated onto filter paper, with one drop of blood in each circle of the card. The cards were left to dry at room temperature for 4 hours and then stored in a refrigerator until the analysis. In order to establish the reference values and the cutoff points of the enzyme activities, DBS samples from patients previously diagnosed with MPS I and VI were sent to the laboratory, from different parts of Brazil, by the physicians in charge of their follow-up.

This study was approved by the Research Ethics Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul in accordance with the World Medical Association Declaration of Helsinki - Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects.

## 2.3. Methodology

All trials carried out in this study followed the principles described in the techniques by Chamoles *et al.* (2001), Castilhos *et al.* (2011), and Castilhos *et al.* (2013) [9, 11, 3]. The 50 mmol/L buffer in pH 2.8 and fluorescent substrate 4-

methylumbelliferyl  $\alpha$ -L-iduronide 2mM was used to measure IDUA activity. To measure ASB, the buffer used was lead acetate 15 mmol/L in sodium acetate 0.05 mol/L in pH 5.0 and fluorescent substrate 4-methylumbelliferyl sulfate 10 mM. The enzyme assays were carried out with 1.2 mm punches of DBS in duplicates on black 96-well microplates with an incubation time of 20 h at 37 °C. The stop buffers were glycine-NaOH 0.5 mol/L in pH 10.3 for IDUA and glycine-NaOH 0.085 mol/L in pH 10.5 for ASB, added to the reaction blanks immediately after adding the substrates and after 20 hours of incubation to the test samples. The fluorescences were measured in a plate fluorometer at 365 nm of excitement and 450 nm of emission (Spectramax Multi-Mode Microplate reader, Molecular Devices – M5). The enzyme activities were expressed in  $\eta$ mol per hour of incubation per mL of blood ( $\eta$ mol/h/mL).

#### 2.4. Optimal pH, $K_m$ , and $V_{max}$ analysis

The optimal pH analysis of IDUA was carried out through pH variations in the range of 2.5 to 3.1 for the sodium formate buffer 2 mmol/mL and in the range of 4.7 to 5.2 in lead acetate 15 mmol/L for ASB.

The substrate concentration range used to determine the substrate curve through the Michaelis-Menten graph for IDUA was 0.25 to 4. After the linearity was determined,  $K_m$ , and  $V_{max}$  were obtained with substrate concentrations ranging from 0.125 to 1.0 mM. For ASB, the range of 2.5 to 15 mM for the substrate concentration was used for the Michaelis-Menten curve.  $K_m$  and  $V_{max}$  were determined through the curve's linearity, with substrate concentrations between 3.0 and 6.0 mM. The parameters were calculated using the Lineweaver-Burke plot [15].



## 2.5. Determining cutoff values and stability

After the optimal pH was determined, fluorescence trials were performed to measure the enzyme activity while differentiating the reference (maximum and minimum) values for the controls and patients, as well as the cutoff values to differentiate normal individuals from patients, with 100% sensitivity and specificity (ROC curve).

The stability of both enzymes was assessed by measuring their activities over time on days 1, 7, 15, 21, 30, 45, and 60 after the filter paper was impregnated with blood. During this time, the samples were stored in airtight bags with desiccant at 4 °C.

## 2.4 Statistical analysis

The results of optimal pH and enzyme stability over time were expressed as mean±standard deviation and one-way ANOVA was applied followed by Dunnett's test when  $p < 0.05$ . All the analyses were calculated using the statistical software GraphPad Prism version 5, including the biochemical parameters of  $K_m$ ,  $V_{max}$ , and cutoff values.

# 3. Results

## 3.1. Optimal pH

Figure 1 shows the optimal pH for enzyme activity of IDUA and ASB in DBS. The highest enzyme activity for IDUA ( $6.06 \pm 2.9$  nmol/h/mL) was found at pH 2.8, which was significantly different ( $p < 0.0294$ ) when compared to the other pH values assessed, except for pH 2.9. For ASB, the highest enzyme activity was found at pH 4.9 ( $12.58 \pm 1.13$  nmol/h/mL), which was significantly different ( $p < 0.0321$ ) from the other pH values.

### 3.2. Km and Vmax

IDUA's Km in DBS was  $1.48 \pm 0.67$  mM, while Vmax was  $12.80 \pm 0.38$  nmol/h/mL. For ASB, Km in DBS was  $7.5 \pm 0.14$  mM and Vmax was  $16.38 \pm 1.64$  nmol/h/mL.

The Km and Vmax curves were developed according to the Lineweaver-Burke plot and are presented in Figure 2.

### 3.3. Reference values and stability in DBS

The enzyme activity analyses of the controls and patients at the optimal pH enabled establishing reference values for IDUA and ASB in DBS for healthy individuals and patients, as well as, the cutoff point between patients and healthy individuals, as seen in Table 1. The IDUA reference values for normal individuals ranged from 4.28 to 25.68 nmol/h/mL with cutoff point at 3.65 nmol/h/mL, while for ASB the reference values ranged from 7.81 to 21.3 nmol/h/mL and the cutoff point was at 6.80 nmol/h/mL.

The enzyme activity stability in DBS was analyzed over time through fluorometric assays. This showed the enzymes IDUA and ASB had different stabilities over time in this material. IDUA's enzyme activity significantly decayed starting at 21 days (Figure 3A) after the filter paper was impregnated with blood compared to the first day after impregnation. Moreover, the activity values after 45 days decayed to values in the patients' reference range. On the other hand, ASB's enzyme stability in DBS (Figure 3B) was the same for all times analyzed, i.e., up to 60 days.

#### **4. Discussion**

Several studies with different methodologies [9, 12, 16-18] have been developed lately for MPS screening and diagnosis with the use of DBS samples. These studies show how important applying DBS is to investigate these diseases and, at the same time, how much the biochemical knowledge must increase on this type of sample since it is still scarce in the scientific literature. The present study assessed for the first time the enzymatic biochemical parameters of optimal pH, Km, and Vmax in DBS samples for the enzymes IDUA and ASB, which are deficient in MPS I and VI. These parameters enabled establishing reference and cutoff values so that the enzyme activities expressed from them provide more reliable results.

The biochemical parameters optimal pH, Km, and Vmax had already been studied in plasma and leukocyte samples for IDUA by Mandelli *et al.* (2001 and 2002) [19, 20]. Their results enabled characterizing IDUA from plasma and leukocytes, besides distinguishing normal individuals from heterozygote ones from

the different Km results. This type of strategy to differentiate healthy individuals from heterozygotes and patients has also been described for other lysosomal storage diseases such as Gaucher disease, GM1-gangliosidosis, Krabbe disease, and Niemann-Pick disease [21-23].

In the present study, the attempts to determine the biochemical parameters from DBS samples of MPS I and VI patients yielded very low enzyme activities, in the range of zero, which made such evaluation impossible. On the other hand, the authors believe that heterozygote individuals could be differentiated from healthy ones, which is a perspective to be sought from these results.

By measuring the enzyme activity of IDUA and ASB at different pH levels, the optimal pH was found for the fluorometric assay of these enzymes. The optimal pH for IDUA in DBS for healthy individuals (2.8) is in accordance with the literature, also for other types of samples such as plasma and leukocytes [19, 20]. On the other hand, the present research found an optimal pH of 4.9 for ASB in DBS samples, while the protocols in the literature suggest pH 5.0 [11, 24]. It must be pointed out that this is a critical parameter since small changes in pH during the enzymatic reactions greatly influence the yield of the biochemical reaction.

By establishing the optimal pH for the fluorometric reactions of IDUA and ASB, their reference values in DBS samples were set as 4.28 to 25.68  $\eta\text{mol/h/mL}$  ( $10.90 \pm 6.05$   $\eta\text{mol/h/mL}$ ) for IDUA and 7.81-21.3  $\eta\text{mol/h/mL}$  ( $10.90 \pm 6.05$   $\eta\text{mol/h/mL}$ ) for ASB. In addition, cutoff values for DBS samples were established by measuring the patients' enzyme activity, which distinguish them from healthy individuals. These values must be defined for each analysis methodology and protocol. Therefore, it is

reasonable to find in the literature other reference values for these enzymes depending on the method of analyzing DBS samples [17, 18, 24].

$K_m$  for plasma IDUA in control individuals had already been described as 0.21 mM [19] and as 0.60 [20] for leukocyte samples. For the present DBS samples, a higher  $K_m$  was found at 1.48 mM, which shows that IDUA in this type of sample has less affinity with the substrate than in plasma and leukocyte samples. Consequently, the  $V_{max}$  value found (12.80  $\eta\text{mol/h/mL}$ ) was higher than in plasma samples (8.89  $\eta\text{mol/h/mL}$ ) [19].

The  $K_m$  and  $V_{max}$  results for ASB were 7.5 mM and 16.38  $\eta\text{mol/h/mL}$ , respectively. There are no studies in the literature describing the kinetic parameters for DBS samples or other types of biological samples.

DBS ensures important advantages in sample handling, storage, and transportation of samples for neonatal screening programs. Thus, the higher use of these samples has contributed to developing stability studies and to validating techniques [13, 14, 25]. The present study assessed the stability of DBS samples over storage to find out how long they may be stored while still yielding a reliable analysis.

These studies have shown that IDUA and ASB have different stability behaviors. It was found that IDUA activity significantly decreased after 21 days of impregnating the filter paper with blood. These results match those described by Müller *et al.* [18]. ASB activity remained stable in all analyses, i.e., for 60 days, as shown by Castilhos *et al.* [11].

Enzyme stability is a relevant parameter for these samples and it has been studied for several lysosomal enzymes such as  $\alpha$ -galactosidase,  $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -galactosidase, total hexosaminidase and acid sphingomyelinase [11, 13, 26]. Based on the results, the authors recommend these enzymes in DBS samples be analyzed within 21 days and, moreover, suggest that ASB may be used as a control to assess the material conditions, instead of the currently used  $\beta$ -galactosidase, due to its good stability of up to 180 days [26].

## **5. Conclusions**

This is a pioneer study in the biochemical characterization of the enzymes IDUA and ASB in DBS samples. Given how relevant it is to investigate these enzymes for the screening and diagnosis of MPS I and VI, as well as the increasing use of this type of sample, the results showed the optimal pH,  $K_m$ , and  $V_{max}$ , besides the different enzyme stabilities over storage, which contributes to more reliable results from DBS samples.

## **Acknowledgements**

The authors thank all the physicians who contributed and sent DBS samples from their patients for this research. The authors also thank CAPES and CNPq for the financial support and the HCPA Blood Bank.

## References

1. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al. (2001) *Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, 8th ed., McGraw Hill, New York, NY.
2. Tomatsu S., Fujii, T., Fukushi, M., Oguma, T., Shimada, T., Maeda, M., Kida, K., Shibata, Y., Fututsumori, H., Montaña, AM., Mason, RW., Yamaguchi, S., Suzuki, Y. and Orri, T. (2013) *Mol. Genet. Metab.* 110, 42-53.
3. Chamoles, NA., Blanco, MB., Gaggioli, D. and Casentini, C. (2001) *Clin. Chem.* 47, 2098-2102.
4. Wood, T., Bodamer, OA., Burin, MG., D'Almeida, V., Fietz, M., Giugliani, R., Hawley, SM., Hendriksz, CJ., Hwu, WL., Ketteridge, D., Lukacs, Z., Mendelsohn, NJ., Miller, N., Pasquali, M., Schenone, A., Schoonderwoerd, K., Winchester, B. and Harmatz, P. (2012) *Mol. Genet. Metab.* 106, 73-82.
5. Giugliani, R. (2012) *J. Inherit. Metab. Dis.* 35, 871-877.
6. Church, H., Tylee, K., Cooper, A., Thornley, M., Mercer, J., wraith, E., Carr, T., O'Meara, A. and Wunn, RF. (2007) *Bone Marrow Transplant.* 39, 207-210.
7. Valayannopoulos, V. and Wijburg, FA. (2011) *Rheumatology.* 50, suppl 5:49-59.
8. McGill, JJ., Inwood, AC., Coman, DJ., Lipke, ML., de Lore, D., Swiedler, SJ, and Hopwood, JJ. (2009) *Clin. Genet.* 77, 492-498.
9. Castilhos, CD., Mezzalira, J., Goldim, MPS, Daitx, VV., Garcia, CS., Andrade, CV., Breier, AC., Cé, J., Mello, AS., Coelho, JC. (2014) *Gene.* 536, 344-347.

10. Reuser, AJ., Verheijen, FW., Bali, D., van Digglan, OP., Germain, DP., Hwu, W., Lukacs, Z., Mühl, A., Olivova, P., Piraud, M., Wuyts, B., Zhang, K. and Keutzer, J. (2011) *Mol. Genet. Metab.* 104, 144-148.
11. Castilhos, CD., Mezzalira, J., Goldim, MPS. and Coelho, JC. (2011) *Clin. Biochem.* 44, 922-926.
12. Campos, D., Monaga, M., González, EC., Herrera, D. and Peña, D. (2013) *Clin. Biochem.* 46, 805-809.
13. De Jesus, VR., Zhang, XK., Keutzer, J., Bodamer, AO., Mühl, A., Orsini, JJ., Caggana, M., Vogt, RF. and Hannon, WH. (2009) *Clin. Chem.* 55, 158-164.
14. Adam, BW., Orsini Jr, JJ., Martin, M., Hall, EM., Zobel, SD., Caggana, M. and Hannon, WH. (2011) *Clin. Biochem.* 44, 704-710.
15. Lineweaver, H. and Burk, D. (1934) *J. Am. Chem. Soc.* 56, 658-666.
16. Hein, LK., Meikle, PJ., Dean, CJ., Bockmann, MR., Auclair, D., Hopwood, JJ. and Brooks, DA. (2005) *Clin. Chim. Acta.* 353, 67-74.
17. Metz, TF., Mechtler, TP., Orsini, JJ., Martin, M., Shushan, B., Herman, JL., Ratschamann, R., Item, CB., Streubel, B., Herkner, KR., Kasper, DC. (2011) *Clin. Chem.* 57, 1286-1294.
18. Muller, KB., Pereira, VG., Martins, AM. and D'Almeida, V. (2011) *J. Clin. Lab. Anal.* 25, 251-254.
19. Mandelli, J., Wajer, A., Pires, RF., Giugliani, R. and Coelho, JC. (2001) *Clin. Chim. Acta.* 312, 81-86.
20. Mandelli, J., Wajer, A., Pires, RF., Giugliani, R. and Coelho, JC. (2002) *Arch. Med. Res.* 33, 20-24.



21. Wajner, A., Michelin, K., Burin, MG., Pires, RF., Pereira, MLS., Giugliani, R. and Coelho, JC. (2007) Clin. Biochem. 40, 365-369.
22. Wajner, A., Michelin, K., Burin, MG., Pires, RF., Pereira, MLS., Giugliani, R. and Coelho, JC. (2004) Clin. Biochem. 37, 893-897.
23. Michelin, K., Wajner, A., Bock, H., Fachel, A., Rosenberg, R., Pires, RF., Pereira, MLS., Giugliani, R. and Coelho, JC. (2005) Clin. Chim. Acta. 362, 101–109.
24. Civallero, G., Michelin, K., de Mari, J., Viapiana, M., Burin, M., Coelho, JC. and Giugliani, R. (2006) Clin. Chim. Acta. 371, 98-102.
25. Adam, BW., Hall, EM., Sternberg, M., Lim, TH., Flores, SR., O'Brien, S., Simms, D. Li, LX., De Jesus, VR And Hannon, WH. (2011) Clin. Biochem. 44, 1445-1450.
26. Castilhos, CD, Mezzalira, J., Goldim, MPS., Werlang, FG. And Coelho, JC. (2011) Clin. Chem. Lab. Med. 49, 1299-1302.

Table 1. Reference values for IDUA and ASB in DBS samples ( $\eta\text{mol/h/mL}$ ).

IDUA			ASB		
Controls	4.28-25.68 (10.90 $\pm$ 6.05)	n = 20	Controls	7.81-21.3 (12.48 $\pm$ 4.41)	n = 20
MPS I	ND – 3.02 (0.50 $\pm$ 1.22)	n = 5	MPS VI	1.77-5.67 (3.53 $\pm$ 1.64)	n = 6
Cutoff	3.65		Cutoff	6.80	

Legends:

Figure 1. Effect of pH on the enzyme activity of IDUA (1A) and ASB (1B) in DBS samples. The data express the means±standard deviation for 10 control individuals in  $\eta\text{mol/h/mL}$ . \* $p < 0.0321$ , statistically different from other groups (one-way ANOVA followed Dunnet's test).

Figure 2. Lineweaver-Burk plot for IDUA (2A) and ASB (2B) in DBS samples from normal controls ( $n=10$ ). S = substrate; V = velocity. Data are means of all individuals.

Figure 3. IDUA (2A) and ASB (2B) activity ( $\eta\text{mol/h/mL}$ ) in DBS samples. The data express the means±standard deviation for 10 control individuals for each analysis day. \* $p < 0.001$ , statistically different in comparison with the other storage days (one-way ANOVA followed Dunnet's test).

Figure 1:

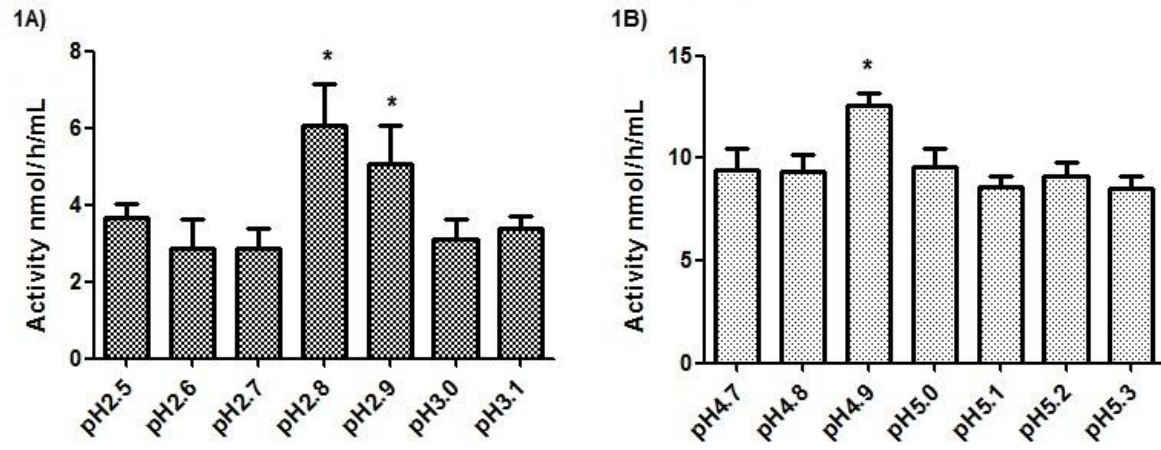


Figure 2:

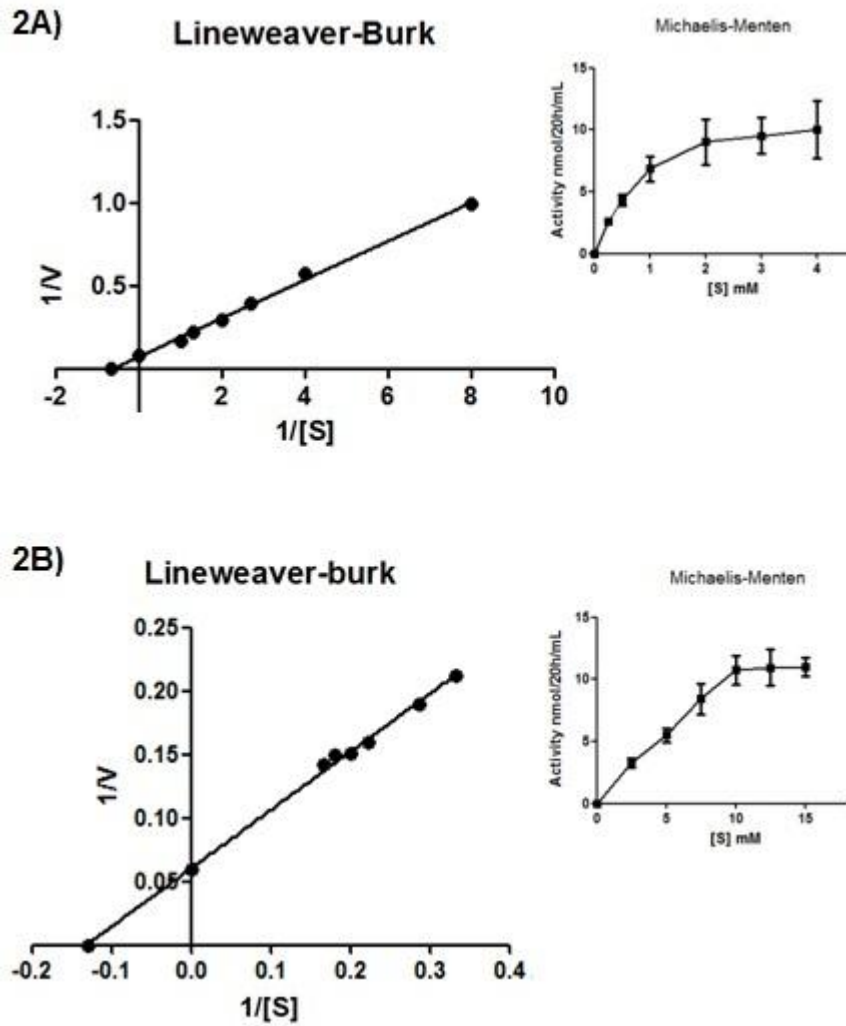
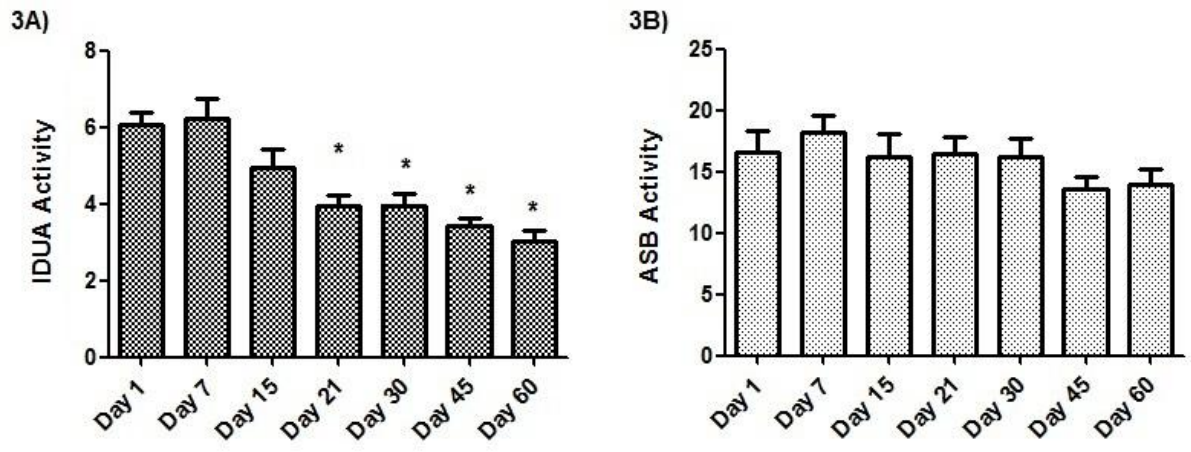


Figure 3:



---

## **6. Discussão**

---

As MPSs são doenças genéticas causadas pela deficiência de hidrolases ácidas, que levam, por sua vez, ao acúmulo de GAGs no interior dos lisossomos. Entre as principais características clínicas das MPSs, podemos citar estatura baixa, face grosseira, opacidade de córnea, displasias esqueléticas e articulares, cardiopatias e comprometimento do sistema respiratório. O diagnóstico precoce é fundamental para iniciar o tratamento adequado, e assim, controlar e retardar a manifestação dos sintomas. Contudo, o diagnóstico das MPSs é concentrado e realizado somente em laboratórios especializados para estas análises, e, portanto, as amostras biológicas viajam longas distâncias para serem processadas.

O envio de amostras de sangue e urina a laboratórios de referência requerem cuidados, como, por exemplo, refrigeração permanente e rapidez de entrega ao destino final, necessários para manter os parâmetros de qualidade, garantindo a confiabilidade dos resultados finais. As triagens realizadas em amostras impregnadas em papel filtro são ótimas alternativas de envio, pois diminuem o custo do transporte, além de reduzir a quantidade dos reagentes necessários para as análises. O presente estudo foi desenvolvido para adaptar as técnicas de triagem urinária existentes para as MPSs em amostras de UPF, além de, caracterizar bioquimicamente as enzimas deficientes na MPS I e VI em amostras de SPF, visando aprimorar os métodos que auxiliam no diagnóstico destas doenças, como também, sugerir a inclusão de amostras de UPF, alternativamente a amostras de urina, em programas de triagem neonatal e de população de alto risco.

Desde a revisão de metodologias laboratoriais para estudo de excreção de GAGs publicada por Pennock em 1976 muitos trabalhos foram desenvolvidos com o intuito de melhorar, aperfeiçoar e simplificar as análises de GAGs devido a importância dos mesmos nas MPSs. De fato, os GAGs são os principais marcadores bioquímicos e por esta razão a triagem e o monitoramento de pacientes em tratamento continuam sendo alvo de muitos estudos.



Na década de 60 os testes conhecidos como “*paper spot test*”, ou seja, testes em amostras de urina pingadas em papel onde ocorria a reação direta desta com corantes, que resultavam ou não na visualização de uma mancha correspondente à presença do GAG acumulado, eram muito utilizados. Pela alta incidência de resultados falsos negativos nos “*paper spot tests*”, estes deixaram de ser recomendados (Berry e Spinanger, 1960; Pennock, 1976). O campo de análise voltou-se então para a precipitação de GAGs seguida de cromatografia. A cromatografia em camada delgada (CCD) foi considerada por muito tempo o melhor método qualitativo para identificação de GAGs (Humbel e Chamoles, 1972), mas por ser uma técnica demorada e extenuante, com muitos passos, e inadequada para laboratórios clínicos menores, as CCDs foram substituídas pelo desenvolvimento de eletroforeses.

As eletroforeses iniciaram como técnicas qualitativas de triagens de MPSs e atualmente já são descritas também como técnicas quantitativas, após estudos desenvolvidos nesta área, obtendo melhorias na separação, nitidez e detecção das bandas de GAGs, como sugerido no primeiro capítulo deste trabalho. Esta evolução transcorreu de eletroforeses bi-dimensional para mono-dimensional (Hata e Nagai, 1972; Cappelletti et al., 1979), com o uso de placas de acetato de celulose para gel de agarose além de colorações especiais (Hopwood e Harrison, 1981; Volpi e Maccari, 2002; Coppa et al., 2012).

Neste estudo testamos o uso de um gel de agarose comercial, obtendo bons resultados de separação e nitidez das bandas. Atribuímos isso, a pequena espessura do gel, que permite uma migração mais rápida das moléculas de GAGs pela agarose, o que ainda reduz o tempo de execução da técnica total. Além disso, a reprodutibilidade foi demonstrada através das curvas de CS e DS, solucionando um problema que enfrentávamos na eletroforese com gel de agarose “caseiro”, isto é, preparado em laboratório, que apresentava frequentes diferenças na migração e separação dos GAGs. Atribuímos este fato a preparação do gel de agarose em

laboratório, como a falta de padronização da espessura e nivelamento do gel, profundidade dos poços e, ainda, dissolução incorreta do pó de agarose.

O gel de agarose geral® utilizado neste trabalho é um gel comercial, vendido através de representantes de produtos para laboratórios de análises clínicas. Ele já vem pronto, ou seja, não há necessidade de preparação. Originalmente o gel é vendido para separação de lipoproteínas e proteínas do soro ou plasma. Entretanto, como se trata de um gel de agarose geral, pensamos que sua aplicação poderia ser adequada também para outras amostras biológicas. Após contato com os fabricantes, a composição do mesmo não foi completamente revelada, nos comunicando apenas a concentração de agarose de 0,9%.

Assim, aplicamos as amostras no gel comercial e adaptamos o mesmo para a eletroforese de GAGs, demonstrando com isto, vantagens deste método em relação àquele com o gel preparado em laboratório. A primeira vantagem do uso do gel de agarose comercial em relação ao gel do laboratório foi o volume de amostra de GAGs precipitados, uma vez que, com o gel comercial passamos a utilizar 0,5 µL de amostra, enquanto no gel preparado no laboratório, utilizamos um volume de 5 µL, ou seja, uma diminuição de 10 vezes no volume de amostra aplicado.

Outra importante qualidade para a eletroforese de GAGs com este gel comercial é o tempo total de execução da técnica. Esta técnica é mais rápida devido às reduções nos tempos das corridas eletroforéticas e no tempo de descoloração, fornecendo o resultado poucas horas após seu início, ao contrário da técnica com o gel feito em laboratório, que requer um tempo maior e conseqüentemente, o resultado é obtido somente depois de um ou dois dias conforme o processo de descoramento do gel.

O diagnóstico definitivo das MPSs é realizado somente através da análise enzimática, entretanto é infactível examinar todas as 11 enzimas deficientes em cada caso suspeito. A

triagem urinária através da dosagem de GAGs é ideal, uma vez que estes são acumulados em todas as MPSs. Por outro lado, somente a quantificação do total de GAGs acumulados não contribui de forma significativa no esclarecimento do tipo de MPS, por isso são necessárias técnicas que avaliem o perfil de GAGs acumulados, de forma individual, para direcionar a análise enzimática. Sendo assim, sugerimos como aplicação para esta eletroforese de gel de agarose comercial seu uso em programas de triagem neonatal, através da análise de GAGs urinários. O perfil eletroforético de GAGs obtido através de eletroforese é uma opção considerável e inclusive, já foi aplicado como ferramenta de triagem de MPSs e seus resultados foram bem aceitos (Piraud et al., 1993; de Lima et al., 2007; Church et al., 2007). Outra vantagem do estudo do perfil eletroforético de GAGs é que este pode excluir uma suspeita de MPS, uma vez que, indivíduos saudáveis para MPSs não apresentam quantidade de GAGs na urina visíveis dentro dos limites de sensibilidade da técnica, como demonstrado em nossos resultados.

A dosagem de GAGs urinários no acompanhamento do tratamento das MPSs, quer seja por TRE ou por transplante de células hematopoiéticas, é uma prática de avaliação devido a importância dos GAGs como biomarcadores (Swiedler et al., 2005; Metz et al., 2011). Este campo vem sendo muito explorado e a análise de GAGs total tem sido ultrapassada por técnicas que exploram diretamente a detecção individual dos diferentes GAGs. Técnicas de cromatografia líquida, ELISA e espectrometria de massa, são exemplos já avaliados para a quantificação direta de DS e HS a fim de acompanhando de pacientes em tratamento (Gallegos-Arreola et al., 2000; Tomatsu et al., 2010 e Auray-Blais et al., 2011), e mais além, a razão de DS/CS somada a atividade enzimática já foi estudada como critério de seleção de doadores para transplantes (Church et al., 2007). Neste sentido, a nossa técnica de eletroforese adaptada com o gel de agarose comercial é uma técnica simples, aplicável inclusive a laboratórios pequenos e com ela obtivemos o perfil individual de cada GAG

acumulado nos pacientes tratados por TRE. Após a quantificação, os resultados mostraram diferenças no acúmulo de GAGs de paciente para paciente, o que vai de acordo com a literatura. Esta diferença no acúmulo de GAGs de paciente para paciente pode ser devida à resposta ao tratamento por TRE, pois depende de diversos fatores, como: o tipo de mutação envolvida, a idade do diagnóstico e de início da aplicação da terapia, a presença de anticorpos neutralizantes e da própria quantidade acumulada de GAGs (Wynn et al., 2009). Portanto, outra aplicação que sugerimos para a eletroforese de GAGs com gel comercial é servir para o acompanhamento de pacientes submetidos à TRE, monitorando os níveis de GAGs urinários.

O uso de densitometria é um recurso utilizado para quantificar e estimar uma proporção relativa de cada tipo de GAGs acumulado (Hopwood e Harrison, 1981; Volpi e Maccari 2002; Coppa et al 2012; de Lima et al, 2007). De fato, ela é uma técnica que contribui com análises do gel apresentando relações percentuais de cada banda, e assim sendo deve ser classificada como um método semi-quantitativo. Ao demonstrar a aplicabilidade do uso de um programa de quantificação densitométrica para géis e correlacionarmos seus valores com o da dosagem total de GAGs urinários sugerimos que esta técnica de eletroforese seja tanto qualitativa como quantitativa. Além disso, a eletroforese é um método que elimina os possíveis resultados falso positivos da dosagem de GAGs total, por DMB. Assim, altos valores de GAGs/creatinina encontrados em urinas de controles saudáveis não correspondem a bandas de GAGs no perfil eletroforético, assim como ocorre com pacientes com MPS. Urinas de recém-nascidos também podem apresentar altas concentrações de GAGs urinários sem correspondência com bandas eletroforéticas (Pennock et al., 1976). Como nossa eletroforese não detectou nenhuma banda de GAGs em urinas de indivíduos saudáveis, mesmo sendo de faixa etária infantil, consideramos que é um método eficiente.

Nesta primeira parte do trabalho, o objetivo de adaptar a técnica de eletroforese para um gel de agarose comercial foi alcançado, tornando-a mais rápida, garantindo a

reprodutibilidade e sensibilidade. Além de separar e identificar os GAGs acumulados nas urinas de pacientes com MPSs, quantificamos as bandas de GAGs para avaliação do tratamento por TRE. Nós sugerimos que esta metodologia possa ser aplicada em laboratórios clínicos para triagem de MPSs neonatal em populações de alto risco e também no acompanhamento de pacientes em TRE, quantificando os níveis de GAGs urinários acumulados, por ser um método simples, adequado e confiável de análise.

No segundo capítulo, foram avaliadas amostras de UPF. O uso de amostras de UPF vem crescendo em pesquisas que avaliam diferentes metabólitos, uma vez que, este tipo de amostra oferece uma forma conveniente e segura de transporte, de armazenamento e de manipulação (Blau et al., 1998; Auray-Blais et al., 2007; Forman et al., 2012; Antunes et al., 2013). Neste capítulo avaliamos os GAGs urinários acumulados em amostras de UPF, correlacionando os resultados com os quantificados em urina. Na área das MPSs, o número de publicações com uso de amostras de UPF ainda é pequeno, porém nos últimos anos, os estudos com as mesmas vêm aumentando consideravelmente.

Após as análises realizadas, nossos resultados indicaram que a determinação dos metabólitos urinários, GAGs e creatinina, quantificados nas investigações de MPS, pode ser realizada através de amostras de UPF pelas técnicas colorimétricas convencionais. Com este tipo de amostra, também é possível separar os diferentes GAGs acumulados nas urinas dos pacientes através da eletroforese em gel de agarose. Os valores de concentrações de creatinina e GAGs foram muito aproximados entre ambos tipos de amostras, resultando em uma forte correlação, indicando que este tipo de amostra é confiável para avaliação bioquímica. Outros trabalhos utilizando UPF para quantificação de GAGs por técnica colorimétrica com DMB demonstraram bons resultados para este tipo de amostra, sugerindo a aplicação da mesma em triagem de MPS como amostra de análise (Whiley et al., 2002; Alonso-Fernández et al., 2010; Civallero et al., 2013).

Outra proposta de triagem com uso de UPF para quantificação de GAGs foi descrita por Auray-Blais e colaboradores (2012), utilizando espectrometria de massa tandem acoplada a cromatografia líquida (LC-MS/MS) para as MPS I, II e VI. Através da metodologia aplicada, foi possível identificar separadamente os picos de DS, HS e CS, uma vantagem diante das técnicas anteriores, que expressam concentrações totais de GAGs corrigidas pelo valor de creatinina. Entretanto a LC-MS/MS ainda é uma técnica de difícil aplicação, em decorrência do alto custo do equipamento, dificultando a implantação destas análises na rotina de pequenos laboratórios.

Como relatado anteriormente, o perfil de GAGs acumulados tem grande importância na investigação e acompanhamento das MPS por duas razões, uma porque ele indica o tipo de MPS, e assim, contribui para o direcionamento do diagnóstico definitivo, e outra, porque ele serve como marcador bioquímico durante o monitoramento de tratamentos das MPS, quer seja por terapia de reposição enzimática ou por transplante de medula óssea. Por isso, testamos o uso das amostras de UPF na técnica de eletroforese em gel de agarose. Nossos resultados demonstraram que o perfil de GAGs entre amostras de urina e UPF foi semelhante tanto para a MPS I quanto para a VI. Visualizamos que as bandas de GAGs acumuladas nas amostras de UPF foram mais fracas que as das amostras de urina, entretanto, após a quantificação das mesmas, a correlação entre os resultados foi muito forte, indicando um  $r = 0.96$ . Por isso, a análise através do perfil de GAGs obtido pela eletroforese não seria prejudicada durante o acompanhamento individual de cada paciente em tratamento. Nosso trabalho foi o primeiro a relatar a separação de GAGs em amostras de UPF por eletroforese em gel de agarose, sendo assim, uma opção à técnica de LC-MS/MS.

Nossos experimentos também avaliaram a temperatura e tempo de armazenamento destas amostras para que as análises apresentem resultados confiáveis. Na literatura, a estabilidade dos GAGs em urina foi descrita como sendo de até 10 dias em temperatura

ambiente, porém quando as amostras de urinas são armazenadas sob refrigeração de 5 e -30 °C, a estabilidade dos GAGs aumenta, sendo superior à 15 dias (Andrade et al., 2008). Para avaliar a estabilidade das nossas amostras de UPF, dividimos primeiramente as urinas em três grupos de concentrações de GAGs para expressar os resultados em média  $\pm$  desvio padrão. Após as repetidas dosagens em diferentes temperaturas por até 60 dias de armazenamento, encontramos uma diferença significativa no grupo com baixa concentração de GAGs/mg de creatinina, para as três temperaturas de armazenamento, -20, 4 e 25 °C, devido a um decaimento da concentração dos mesmos. Para os demais grupos, de média e alta concentração de GAGs, não houve diferença entre as temperaturas e tempos analisados. Corroborando com nossos dados, outros pesquisadores já haviam relatado que a estabilidade encontrada para soluções estabelecidas de DS e HS em UFP era até 6 semanas para temperatura ambiente, 4, -20 e -80 °C (Aurays-Blais et al., 2012). Diante disso, recomendamos que a análise dos GAGs em UPF seja realizada em até um mês após a impregnação do papel filtro com a urina, sem necessidade de refrigeração para o transporte, uma vez, que este é um fator que contribui muito para aumentar os custos de envio. Ainda testamos em outra análise, a estabilidade das amostras de UPF em temperatura de 37 °C, uma vez que, nosso país está localizado em uma região tropical e as temperaturas ultrapassam facilmente os 25 °C, principalmente na estação do verão. Nossos resultados demonstraram que a estabilidade não foi alterada durante os 21 dias de armazenamento.

Além das quantificações totais, o perfil de GAGs de pacientes com MPS I e VI, demonstrado por eletroforese em gel de agarose, confirmou os resultados da estabilidade dos GAGs em UFP, pois as bandas acumuladas se mantiveram e foram semelhantes para as três temperaturas, apresentando um coeficiente de correlação de  $r = 0.99$  quando comparadas entre elas nas diferentes temperaturas de armazenamento.

O uso de amostras UPF é conveniente pela facilidade de coleta, de transporte e de armazenamento, reduzindo custos, principalmente em casos que a amostra necessita percorrer grandes distâncias. A nossa proposta seguiu uma avaliação completa dos GAGs urinários em UPF, determinando a concentração total de GAGs/creatinina, seguida do perfil de GAGs, separados por eletroforese em gel de agarose, demonstrando estabilidade de até um mês nas temperaturas de -20, 4 e 25 °C e por três semanas à 37 °C. Concluímos através das análises do capítulo II, que as amostras de UPF podem ser aplicadas na investigação de MPS, substituindo as amostras de urinas em triagem neonatal e em monitoramento de terapias, por ser um tipo de amostra mais conveniente e segura para transporte e armazenamento.

Outra abordagem deste trabalho foram as análises bioquímicas das enzimas deficientes nas MPS I e VI em amostras de SPF proposto como objetivos do capítulo III.

Atualmente, diversos estudos vêm sendo desenvolvidos na área de triagem e diagnóstico de MPSs com o uso de amostras de SPF, através de diferentes metodologias (Hein et al., 2005; Metz et al., 2011; Müller et al., 2011; Campos et al., 2013; Castilhos et al., 2014). Estes trabalhos demonstram a importância e a aplicabilidade do SPF para a investigação destas doenças, e ao mesmo tempo, a necessidade de aprofundar os conhecimentos bioquímicos neste tipo de amostra, pois estes ainda são escassos na literatura científica.

Nosso trabalho avaliou pela primeira vez, parâmetros bioquímicos enzimáticos de pH ótimo, Km e Vmax em amostras de SPF das enzimas IDUA e ASB, deficientes nas MPS I e VI. A partir dos mesmos, podemos estabelecer nossos valores de referência e de corte, a fim de que as atividades enzimáticas expressas para amostras de SPF tenham resultados mais seguros e confiáveis.



Os parâmetros bioquímicos de pH ótimo, Km e Vmax, já haviam sido estudados em amostras de plasma e de leucócitos para a enzima IDUA por Mandelli e colaboradores (2001 e 2002). Os resultados de Mandelli e colaboradores permitiram caracterizar a IDUA de plasma e leucócitos, e ainda distinguir indivíduos normais de indivíduos heterozigotos através das diferenças nos resultados de Km. Este tipo de estratégia, para diferenciar indivíduos normais de indivíduos heterozigotos e de pacientes, também já foi descrita para outras doenças lisossômicas de depósito, como a Doença de Gaucher, Gangliosidose GM1, Doença de Krabbe e Doença de Niemann-Pick (Wajner et al., 2004; Michelin et al., 2005; Wajner et al., 2007).

No atual trabalho as tentativas para determinação dos parâmetros bioquímicos a partir das amostras de SPF de pacientes com Mucopolissacaridoses I ou VI, mostraram atividades enzimáticas muito baixas, na faixa do zero, sendo assim, não nos foi permitido avaliar tais parâmetros para amostras de SPF destes pacientes. Por outro lado, acreditamos que a diferenciação de indivíduos controles de indivíduos heterozigotos seja viável, e esta, segue como uma perspectiva a partir de nossos resultados.

Através da medida da atividade enzimática de IDUA e ASB em diferentes pHs, obtivemos o pH ótimo para a realização do ensaio fluorimétrico destas enzimas. O pH ótimo para IDUA em SPF de indivíduos normais (2,8), esta de acordo com a literatura, inclusive para outros tipos de amostras, como plasma e leucócitos (Mandelli et al., 2001 e 2002). Por outro lado, para a enzima ASB, encontramos um pH ótimo de 4,9, para a atividade da enzima em amostras de SPF, enquanto nos protocolos descritos, o pH sugerido é de 5.0 (Civallero et al., 2006; Castilhos et al., 2011a). É importante salientar que este parâmetro é crítico, uma vez que, pequenas mudanças de pH durante as reações enzimáticas, influenciam muito no rendimento da reação bioquímica.

A partir da definição do pH ótimo para as reações fluorimétricas das enzimas IDUA e ASB, definimos nossos valores de referência para as mesmas em amostras de SPF como sendo de 4,28 a 25,68 nmol/h/mL ( $10,90 \pm 6,05$  nmol/h/mL) para IDUA e 7,81 a 21,3 nmol/h/mL ( $12,48 \pm 4,41$  nmol/h/mL) para ASB. Além disso, através das medidas das atividades enzimáticas dos pacientes, estabelecemos nossos valores de corte para SPF, distinguindo pacientes de indivíduos normais. É fundamental que para cada metodologia e protocolo de análise, estes valores sejam definidos. Sendo assim, é razoável que sejam encontrados na literatura científica outros valores de referência para estas enzimas, conforme o método de análise para as amostras de SPF (Civallero et al., 2006; Metz et al., 2011; Müller et al., 2011).

O Km da IDUA em plasma para indivíduos controles já havia sido descrito como sendo 0,21 mM (Mandelli et al., 2001), e para amostras de leucócitos, igual a 0,60 mM (Mandelli et al., 2002). Para nossas amostras em SPF, encontramos um Km maior, equivalente a 1,48 mM, demonstrando que a IDUA neste tipo de amostra apresenta uma afinidade menor pelo seu substrato que em amostras de plasma e de leucócitos. O resultado de Vmax que encontramos (12,80 nmol/h/mL) foi maior que para as amostras de plasma (8,89 nmol/h/mL) (Mandelli et al., 2001).

Nossos resultados de Km e Vmax para a enzima ASB foram iguais a 7,5 mM e 16,38 nmol/h/mL, respectivamente. Na literatura, não estão descritos estudos de parâmetros cinéticos da ASB para amostras de SPF, bem como, em outros tipos de amostras biológicas.

As amostras de SPF garantem vantagens importantes de manuseio, armazenamento e transporte para programas de triagem neonatal. Consequentemente, o aumento da utilização destas amostras contribuiu para que estudos de estabilidade e de validação de técnicas tenham sido desenvolvidos (De Jesus et al., 2009; Adam et al., 2011a e 2011b). Desta forma,

avaliamos a estabilidade das amostras em SPF ao longo do tempo de armazenamento, definindo até quando o SPF pode ser armazenado levando a uma análise segura, expressando um resultado confiável.

Nossos estudos demonstraram que IDUA e ASB comportam-se de maneiras diferentes quanto à estabilidade ao longo do tempo. Observamos que a atividade da IDUA decaiu significativamente a partir de 21 dias após a impregnação do sangue no papel filtro. Estes resultados estão de acordo com aqueles descritos por Müller e colaboradores (2011). Estes autores descreveram a estabilidade da IDUA também por 3 semanas à temperatura ambiente. Já a atividade da ASB manteve-se estável em todas as análises, ou seja, por 60 dias. Este dado já havia sido demonstrado por Castilhos e colaboradores (2011a).

A estabilidade enzimática durante o armazenamento é um parâmetro relevante para estas amostras e, a mesma também já foi alvo de estudo para diversas enzimas lisossômicas, como  $\alpha$ -galactosidase,  $\alpha$ -glicosidase,  $\beta$ -galactosidase, hexosaminidase total e esfingomielinase ácida (De Jesus et al., 2009; Castilhos et al., 2011a e 2011b). Conforme nossos dados, recomendamos que as análises em SPF para estas enzimas não ultrapassem um tempo de 21 dias, e, além disso, sugerimos que a medida da ASB também possa ser utilizada como um controle na avaliação das condições do material, atualmente realizado pela medida da atividade da  $\beta$ -galactosidase, devido a sua boa estabilidade de até 180 dias (Castilhos et al., 2011b).

Os resultados obtidos a partir deste trabalho, tanto para amostras de UPF como para SPF, demonstraram ser adequados para aplicação das técnicas de avaliação para as MPS além de ser uma excelente alternativa às amostras convencionais de triagem, apresentando como vantagens o fácil transporte, armazenamento e segurança biológica.

---

## **7. Conclusões**

---

De acordo com os objetivos estabelecidos para este trabalho, obtivemos as seguintes conclusões:

#### Capítulo I:

- 1) Adaptamos a técnica de eletroforese de GAGs urinários para um gel de agarose comercial, melhorando a visualização e separação do perfil eletroforético e reduzindo o tempo total de execução da técnica.
- 2) Demonstramos a quantificação das bandas de GAGs através de software específico para géis.
- 3) Diante dos resultados obtidos, sugerimos a aplicação desta eletroforese com o gel comercial como uma alternativa às triagens de MPSs e monitoramento de pacientes em TRE, através do acompanhamento dos níveis de GAGs urinários.

#### Capítulo II:

- 1) A técnica de dosagem colorimétrica de GAGs urinários em amostra de urina está intimamente correlacionada com aquela com UPF.
- 2) A amostra de UPF é estável quando armazenada até um mês em temperaturas de -20, 4 e 25 °C 3 semanas à 37 °C.
- 3) As amostras de UPF, portanto, são uma alternativa segura e prática para realização das análises de GAGs urinários, através da dosagem total e separação de GAGs por eletroforese, e por isso, as mesmas são uma opção às triagens de MPSs e acompanhamento de pacientes em tratamento.

### Capítulo III:

- 1) Estabelecemos os parâmetros bioquímicos de pH ótimo, constante de Michaelis-Menten e velocidade máxima, das enzimas IDUA e ASB, em amostras de SPF de indivíduos normais.
- 2) Com o melhor pH para a atividade da IDUA e da ASB, determinamos nossos valores de referência para triagem de MPS I e VI em SPF, através de técnica fluorimétrica.
- 3) A atividade da IDUA foi estável até 21 dias e a da ASB até 45 dias quando o papel foi armazenado à 4°C.

---

## **8. Perspectivas**

---

Como continuação deste trabalho as seguintes perspectivas são colocadas:

- Testar o uso do Tampão Universal para eluição do SPF, para a medida a atividade enzimática de mais de uma enzima a partir do mesmo eluato, e com isso, economizar o material biológico de amostras e, desta maneira, também tornar ágil o processamento das mesmas, a fim de obter resultados mais rápidos;

- Determinar os parâmetros bioquímicos de pH, Km e V<sub>máx</sub> em amostras de SPF de indivíduos heterozigotos para MPS, e avaliar a possibilidade de diferenciação dos mesmos à indivíduos normais para MPS;

- Realizar uma triagem para MPS em todo território brasileiro, com o uso de amostra biológica impregnada em papel filtro. Aplicando as técnicas de quantificação total de GAGs e eletroforese com a UPF e análise enzimática, através da medida da atividade em SPF.



---

## **9. Bibliografia**

---

- Adam BW, Hall EM, Sternberg M, Lim TH, Flores SR, O'Brien S, Simms D Li, LX, De Jesus VR and Hannon WH (2011b). The stability of markers in dried-blood spots for recommended newborn screening disorders in the United States. *Clin Biochem* 44: 1445-1450.
- Adam BW, Orsini JJ Jr, Martin M, Hall EM, Zobel SD, Caggana M and Hannon WH (2011a). The preparation and storage of dried-blood spot quality control materials for lysosomal storage disease screening tests. *Clin Biochem*, 44: 704-710.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2008). *Molecular Biology of the Cell*. 5th Ed., Garland Science, New York.
- Alonso-Fernández JR, Fidalgo J, Colón C (2010). Neonatal Screening for Mucopolysaccharidoses by Determination of Glycosaminoglycans in the Eluate of Urine-Impregnated Paper: Preliminary Results of an Improved DMB-Based Procedure. *J Clin Lab Anal*, 24: 149-153.
- Andrade F, Prieto JA, Elorz J, Martín S, Sanjurjo P, Aldámiz-Echevarría L (2008). Stability of urinary glycosaminoglycans in patients with mucopolysaccharidoses. *Clin Chim Acta*, 388: 73-77.
- Antunes MV, Niederauer CG, Linden R (2013). Development, validation and clinical evaluation of dried urine spot method for determination of hippuric acid and creatinine. *Clin Biochem*, 46: 1276-1280.
- Auray-Blais C, Cyr D, Mills K, Giguère R, Drouin R (2007). Development of a filter paper method potentially applicable to mass and high-risk urinary screenings for Fabry disease. *J Inherit Metab Dis*, 30: 106.

- Auray-Blais C, Bhérier P, Gagnon R, Young SP, Zhang HH, An Y, Clarke JTR, Millington DS (2011). Efficient analysis of urinary glycosaminoglycans by LC-MS/MS in mucopolysaccharidoses type I, II and VI. *Mol Genet Metab*, 102: 49-56.
- Auray-Blais C, Lavoie P, Zhang H, Gagnon R, Clarke JTR, Maranda B, Young SP, An Y, Millington DS (2012). An improved method for glycosaminoglycan analysis by LC-MS/MS of urine samples collected on filter paper. *Clin Chim Acta*, 413: 771-778.
- Beck M (2010). Therapy for Lysosomal Storage Disorders. *Life*, 62: 33–40.
- Berry HK, Spinanger J (1960). A paper spot test useful in study of Hurler's syndrome. *J Lab Clin Med*, 55: 136-138.
- Blau N, Matasovic A, Lukasiewicz-Wedlechowicz A, Heizmann CW, Leumann E (1998). Simultaneous Determination of Oxalate, Glycolate, Citrate and Sulfate from Dried Urine Filter Paper Spots in a Pediatric Population. *Clin Chem*, 44: 1554-1556.
- Campos D, Monaga M, González EC, Herrera D and Peña D (2013), Optimization of enzymatic diagnosis for mucopolysaccharidosis I in dried blood spots on filter paper. *Clin Biochem*, 46: 805-809.
- Cappelletti R, Rosso MD, Chiarugi VP (1979). A new electrophoretic method for the complete separation of all known animal glycosaminoglycans in a monodimensional run. *Anal Biochem*, 99: 311-315.
- Castilhos CD, Mezzalira J, Goldim MPS and Coelho JC (2011a). Influence of pre-analytical factors on  $\alpha$ -galactosidase A, arylsulfatase B and  $\alpha$ -glucosidase activities measured on dried blood spots on filter paper. *Clin Biochem*, 44: 922-926.
- Castilhos CD, Mezzalira J, Goldim MPS, Daitx VV, Garcia CS, Andrade CV, Breier AC, Cé J, Mello AS, Coelho JC (2014). Determination of the lysosomal hydrolase activity in

- blood collected on filter paper, an alternative to screen high risk populations. *Gene*, 536: 344-347.
- Castilhos CD, Mezzalira J, Goldim MPS, Werlang FG and Coelho JC (2011b). Effect of sample collection, temperature and time of storage on  $\beta$ -galactosidase and total hexosaminidase activities in dried blood collected on filter paper. *Clin Chem Lab Med*, 49: 1299-1302.
- Chamoles NA, Blanco M, Gaggioli D (2001). Fabry disease: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. *Clin Chim Acta*, 308: 195-196.
- Chamoles NA, Blanco M, Gaggioli D, Casentini C (2002). Gaucher and Niemann-Pick diseases-enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper: retrospective diagnoses in newborn-screening cards. *Clin Chim Acta*, 317: 191–197.
- Church H, Tylee K, Cooper A, Thornley M, Mercer J, Wraith E, Carr T, O’Meara A, Wynn RF (2007). Biochemical monitoring after hematopoietic stem cell transplant for Hurler syndrome (MPSIH): implications for functional outcome after transplant in metabolic disease. *Bone Marrow Transplant*, 39: 207-210.
- Cimaz R, La Torre F (2014). Mucopolysaccharidoses. *Curr Rheumatol Rep*, 16: 389.
- Civallero G, Bender F, Gomes A, Marasca G, Guidobono R, De Mari J, Burin M, Giugliani R (2013). Reliable detection of mucopolysacchariduria in dried-urine filter paper samples. *Clin Chim Acta*, 415: 334-336.
- Civallero G, Michelin K, de Mari J, Viapiana M, Burin M, Coelho JC and Giugliani R (2006). Twelve different enzyme assays on dried-blood filter paper samples for detection of patients with selected inherited lysosomal storage diseases. *Clin Chim Acta*, 371: 98-102.

- Clarke LA, Winchester B, Giugliani R, Tytki-Szymanska A, Amartino H (2012). Biomarkers for the mucopolysaccharidoses: Discovery and clinical utility. *Mol Genet Met*, 106: 395-402.
- Coppa GV, Buzzega D, Zampini L, Maccari F, Galazzi T, Padella L, Santoro L, Gabrielli O, Volpi N (2012). Agarose-gel electrophoresis for the diagnosis of mucopolysaccharidoses. *Clin Chem Lab Med*, 50: 589-592.
- Coutinho MF, Lacerda L, Alves S (2012). Glycosaminoglycan Storage Disorders: A Review. *Biochem Res Int*, 2012:471325.
- De Jesus VR, Zhang XK, Keutzer J, Bodamer AO, Mühl A, Orsini JJ, Caggana M, Vogt RF and Hannon WH (2009). Development and evaluation of quality control dried blood spot materials in newborn screening for lysosomal storage disorders. *Clin Chem*, 55: 158-164.
- De Jong JGN, Wevers RA, Sambek RL (1992). Measuring urinary glycosaminoglycans in the presence of protein: an improved screening procedure for mucopolysaccharidoses based on dimethylmethylene blue. *Clin Chem*, 38: 803-807.
- de Lima CR, Baccarin RYA, Michelacci YM (2007). Reliability of 1,9-dimethylmethylene blue tests in comparison to agarose gel electrophoresis for quantification of urinary glycosaminoglycans. *Clin Chim Acta*, 378: 206-215.
- de Ru MH, van der Tol L, van Vlies N, Bigger BW, Hollak CEM, Ijlst L, Kulik W, van Lenthe H, Saif MA, Wagemans T, van der Wal WM, Wanders RJ, Wijburg FA (2013). Plasma and urinary levels of dermatan sulfate and heparan sulfate derived disaccharides after long-term enzyme replacement therapy (ERT) in MPS I: correlation with the timing of ERT and with total urinary excretion of glycosaminoglycans. *J Inherit Metab Dis*, 36: 247-255.

- Demirev PA (2013). Dried Blood Spots: Analysis and Applications. *Anal Chem*, 85: 779-789.
- Desnick RJ, Schuchman EH (2002). Enzyme replacement and enhancement therapies: lessons from lysosomal disorders. *Nat Rev Genet*, 12: 954-66.
- Duffey TA, Bellamy G, Elliott S, Fox AC, Glass M, Turecek F, Gelb MH, Scott CR (2010). A Tandem Mass Spectrometry Triplex Assay for the Detection of Fabry, Pompe and Mucopolysaccharidosis-I (Hurler). *Clin Chem*, 56: 1854-1861.
- Eto Y, Shen JS, Meng XL, Ohashi T (2004). Treatment of lysosomal storage disorders: cell therapy and gene therapy. *J Inherit Metab Dis*, 27: 411-415.
- Fernandes J, Saudubray JM, Berghe GVD, Walter JH (2006). Inborn metabolic diseases: diagnosis and treatment. 4a edição. Springer-Verlag, Nova Iorque, 561pp.
- Forman M, Valsamakis A, Arav-Boger R (2012). Dried Urine Spot for Detection and Quantification of Cytomegalovirus in Newborns. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 73: 326-329.
- Gallegos-Arreola MP, Machorro-Lazo MV, Flores-Martínez SE, Zúñiga-González GM, Figuera LE, González-Noriega A, Sánchez-Corona J (2000). Urinary glycosaminoglycan excretion in healthy subjects and in patients with mucopolisaccharidoses. *Arch Med Res*, 31: 505-510.
- Gasparotto N, Tomanin R, Frigo AC, Niizawa G, Pasquini E, Blanco M, Donati MA, Keutzer J, Zacchello F, Scarpa M (2009). Rapid diagnostic testing procedures for lysosomal storage disorders: alpha-glucosidase and beta-galactosidase assays on dried blood spots. *Clin Chim Acta*, 402: 38-41.

- Gelb MH, Turecek F, Scott CR, Chamols NA (2006). Direct multiplex assay of enzymes in dried blood spots by tandem mass spectrometry for the newborn screening of lysosomal storage disorders. *J Inherit Metab Dis*, 29: 397-404.
- Germain DP, Boucly C, Carlier RY, Caudron E, Charlier P, Colas F, Jabbour F, Martinez V, Mokhtari S, Orlikowski D, Pellegrini N, Perrone C, Prigent H, Rubinstain R, Benistan K (2010) Enzyme replacement therapy of lysosomal storage diseases. *Rev Med Interne*, 31 Suppl 2: S279-291.
- Giugliani R (2012). Newborn screening for lysosomal diseases: current status and potential interface with population medical genetics in Latin America. *J Inherit Metab Dis*, 35: 871-877.
- Giugliani R, Dutra-Filho CS, Barth ML, Enk V, Netto CA (1990). Age-related concentrations of glycosaminoglycans in Random urine: a contribution to the laboratorial detection of mucopolysaccharidoses. *Brazil J Genetics*, 13: 599-605.
- Glamuzina E, Fettes E, Bainbridge K, Crook V, Finnegan N, Abulhoul L (2011). Treatment of mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome) with idursulfase: the relevance of clinical trial end points. *J Inherit Metab Dis*, 34: 749-754.
- Harmatz PR, Garcia P, Guffon N, Randolph LM, Shediach R, Braunlin E, Lachman RS, Decker C (2013). Galsulfase (Naglazyme®) therapy in infants with mucopolysaccharidosis VI. *J Inherit Metab Dis*, online publication.
- Harvey RA, Ferrier DR (2012). Bioquímica ilustrada. 5ª ed. Artmed, Porto Alegre. 2006.
- Hata R, Nagai Y (1972). A Rapid and Micro method for Separation of Acidic Glycosaminoglycans by Two-Dimensional. *Electrophoresis*, 45: 462-468.

- Hein LK, Meikle PJ, Dean CJ, Bockmann MR, Auclair D, Hopwood JJ and Brooks DA (2005). Development of an assay for the detection of mucopolysaccharidosis type VI patients using dried blood-spots. *Clin Chim Acta*, 353: 67-74.
- Hopwood JJ, Harrison JR (1981). High-Resolution of Urinary Glycosaminoglycans: An Improved Screening Test for the Mucopolysaccharidoses. *Anal Biochem*, 119: 120-127.
- <http://www.clinicaltrials.gov>. Acessado em 10 de dezembro de 2013.
- Humbel R, Chamoles NA (1972). Sequential thin layer chromatography of urinary acid glycosaminoglycans. *Clin Chim Acta*, 40: 290-293.
- Jameson E, Jones S, Wraith JE (2013). Enzyme replacement therapy with laronidase (Aldurazyme) for treating mucopolysaccharidosis type I. *Cochrane Database Syst Ver*, 9: CD009354.
- Kingma SD, Langereis EJ, De Klerk CM, Zoetekouw L, Wagemans T, Ijlst L, Wanders RJ, Wijburg FA, van Vlies N (2013). An algorithm to predict phenotypic severity in mucopolysaccharidosis type I in the first month of life. *Orphanet J Rare Dis*, 8: 99.
- Li Y, Scott CR, Chamoles N, Ghavami A, Pinto BM, Turecek F, Gelb MH (2004). Direct multiplex assay of lysosomal enzymes in dried blood spots for newborn screening. *Clin Chem*, 50: 1785-1796.
- Mabe P, Valiente A, Souto V, Cornejo V, Raimann E (2004). Evaluation of reliability for urine mucopolysaccharidosis screening by dimethylmethylene blue and Berry spot tests. *Clin Chim Acta* 345: 135-140.
- Mak CM, Lee HC, Chan AY, Lam CW (2013). Inborn errors of metabolism and expanded newborn screening: review and update. *Crit Rev Clin Lab Sci* 50: 142-62.



- Mallolas CC, Berga MQ, Quintana RMP, García JM, Buscà MAV, Iriberrí RA (1999). Determinación de glucosaminoglicanos en orina por un procedimiento espectrométrico. Valores de referència para una población pediátrica. *Revista Química Clínica*, 18: 278-281.
- Mandelli J, Wajer A, Pires RF, Giugliani R and Coelho JC (2001). Detection of mucopolysaccharidosis type I heterozygotes on the basis of the biochemical properties of plasma alpha-L-iduronidase. *Clin Chim Acta*, 312: 81-86.
- Mandelli J, Wajer A, Pires RF, Giugliani R and Coelho JC (2002). Detection of mucopolysaccharidosis type I heterozygotes based on the biochemical characteristics of leukocyte alpha-L-iduronidase. *Arch Med Res*, 33: 20-24.
- Martin R, Beck M, Eng C, Giugliani R, Harmatz P, Muñoz V, Muenzer J (2008). Recognition and Diagnosis of Mucopolysaccharidosis II (Hunter Syndrome). *Pediatrics*, 121: e377-386.
- Meikle PJ, Grasby DJ, Dean CJ, Lang DL, Bockmann M, Whittle AM, Fietz MJ, Simonsen H, Fuller M, Brooks DA, Hopwood JJ (2006). Newborn screening for lysosomal storage disorders. *Mol Genet Metab*, 88: 307-314.
- Mello AS, Burin MG, Michellin K, Viapiana M, Giugliani R, Coelho JC, Bauer ME (2006). Epstein-Barr virus-induced transformation of B cells for the diagnosis of genetic metabolic disorders - enumerative conditions for cryopreservation. *Cell Proliferation*, 39: 29-36.
- Metz TF, Mechtler TP, Orsini JJ, Martin M, Shushan B., Herman JL, Ratschmann R, Item CB, Streubel B, Herkner KR, Kasper DC (2011). Simplified Newborn Screening Protocol for Lysosomal Storage Disorders. *Clin Biochem*, 57: 1286-1294.

- Michelin K, Wajner A, Bock H, Fachel A, Rosenberg R, Pires RF, Pereira MLS, Giugliani R and Coelho JC (2005). Biochemical properties of beta-glucosidase in leukocytes from patients and obligated heterozygotes for Gaucher disease carriers. *Clin Chim Acta*, 362: 101–109.
- Muenzer J (2004). The mucopolysaccharidoses: a heterogeneous group of disorders with variable pediatric presentations. *J Pediatr*, 144: S27- 34.
- Muller KB, Pereira VG, Martins AM and D’Almeida V (2011). Evaluation of  $\alpha$ -iduronidase in dried blood spots is an accurate tool for mucopolysaccharidosis I diagnosis. *J Clin Lab Anal*, 25: 251-254.
- Neufeld EF, Muenzer J (2001). The mucopolysaccharidoses. In: Scriver CR, Sly WS (eds) *The metabolic e molecular bases of inherited disease* 8<sup>a</sup>ed. MC Graw Hill, Montreal, pp. 3421-3452.
- Pennock CA (1976). A review and selection of simple laboratory methods used for the study of glycosaminoglycan excretion and the diagnosis of the mucopolysaccharidoses. *J Clin Path*, 29: 111-123.
- Piraud M, Boyer S, Mathieu M, Maire I (1993). Diagnosis of mucopolysaccharidoses in a clinically selected population by urinary glycosaminoglycan analysis: a study of 2,000 urine samples. *Clin Chim Acta*, 221: 171-181.
- Pollard LM, Jones JR, Wood TC (2013). Molecular characterization of 355 mucopolysaccharidosis patients reveals 104 novel mutations. *J Inherit Metab Dis*, 36: 179-187.
- Portaria GM/MS n.º 22, de 15 de Janeiro de 1992.
- Portaria GM/MS n.º 822, de 6 de Junho de 2001.

- Reuser AJ, Verheijen FW, Bali D, van Diggelen OP, Germain DP, Hwu W, Lukacs Z, Mühl A, Olivova P, Piraud M, Wuyts B, Zhang K, Keutzer J (2011). The use of dried blood spot samples in the diagnosis of lysosomal storage disorders – Current status and perspectives. *Mol Genet Met*, 104: 144-148.
- Rodrigues MD, de Oliveira AC, Muller KB, Martins AM, D’Almeida V (2009). Chitotriosidase determination in plasma and in dried blood spots: a comparison using two different substrates in a microplate assay. *Clin Chim Acta*, 406: 86-88.
- Saudubray J and Charpentier C. (2001). Clinical Phenotypes: Diagnosis/Algorithms. In: Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., Valle, D. (eds.) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8th ed., McGraw-Hill, New York.
- Saudubray JM, Sedel F, Walter JH (2006). Clinical approach to treatable inborn metabolic diseases: Na introduction. *J inherit Metab Dis*, 29: 261-274.
- Schwartz IVD, Matte US, Leistner S, Giugliani R (2001) Mucopolissacaridoses. In: Carakushansky G (Org). *Doenças genéticas em pediatria*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 180-184.
- Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (2001) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8th ed., McGraw-Hill, New York.
- Sedel F, Lyon-Caen O, Saudubray JM (2007) Therapy insight: inborn errors of metabolism in adult neurology--a clinical approach focused on treatable diseases. *Nat Clin Pract Neurol*, 3: 279-290.
- Swiedler SJ, Beck M, Bajbouj M, Giugliani R, Schwartz I, Harmatz P, Wraith JE, Roberts J, Ketteridge D, Hopwood JJ, Guffon N, Miranda MCS, Teles EL, Berger KI, Piscia-Nichols C (2005). Threshold effect of urinary glycosaminoglycans and walk test as

indicators of disease progression in a survey of subjects with Mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy Syndrome). *Am J Med Genet A*, 134: 144-150.

Tomatsu S, Montaña AM, Oguma T, Dung VC, Oikawa H, Carvalho TG, Gutiérrez ML, Yamaguchi S, Suzuki Y, Fukushi M, Sakura N, Barrera L, Kida K, Kubota M, Orii T (2010). Dermatan sulfate and heparin sulfate as a biomarker for mucopolysaccharidosis I. *J Inherit Metab Dis*, 33: 141-150.

Valayannopoulos V, Wijburg FA (2011). Therapy for the mucopolysaccharidoses. *Rheumatology*, 50: 49-59.

Volpi N, Maccari F (2002). Detection of submicrogram quantities of glycosaminoglycans on agarose gels by sequential staining with toluidine blue and Stains-All. *Electrophoresis*, 23: 4060-4066.

Wajner A, Michelin K, Burin MG, Pires RF, Pereira MLS, Giugliani R and Coelho JC (2007). Comparison between the biochemical properties of plasma chitotriosidase from normal individuals and from patients with Gaucher disease, GM1-gangliosidosis, Krabbe disease and heterozygotes for Gaucher disease. *Clin Biochem*, 40: 365-369.

Wajner A, Michelin K, Burin MG, Pires RF, Pereira MLS, Giugliani R and Coelho JC (2004). Biochemical characterization of chitotriosidase enzyme: comparison between normal individuals and patients with Gaucher and with Niemann-Pick diseases. *Clin Biochem*, 37: 893-897.

Wajner A, Michelin K, Burin MG, Pires RF, Pereira ML, Giugliani R, Coelho JC (2007). Comparison between the biochemical properties of plasma chitotriosidase from

normal individuals and from patients with Gaucher disease, GM1-gangliosidosis, Krabbe disease and heterozygotes for Gaucher disease. *Clin Biochem*, 40: 365-369.

Wenger DA, Coppola S, Liu SL (2002). Lysosomal storage disorders: diagnostic dilemmas and prospects for therapy. *Genet Med*, 4: 412-419.

Wenger DA, Luzi P, Rafi M (2013). Lysosomal Storage Diseases: Heterogeneous Group of Disorders. *Bioimpacts*, 3: 145–147.

Whitley CB, Spielmann RC, Herro G, Teragawa SS (2002). Urinary Glycosamoglycan Excretion Quantified by an Automated Semimicro Method in Specimens Conveniently Transported from Around the Globe. *Mol Genet Metab*, 75: 56-64.

Wynn RF, Wraith JE, Mercer J, O'Meara A, Tylee K, Thornley M, Church HJ, Bigger BW (2009). Improved metabolic correlation in patients with lysosomal storage disease treated with hematopoietic stem cell transplant compared with enzyme replacement therapy. *J Pediatr*, 154: 609-611.

---

## **10. Anexos**

---

## 10.1.

### APÊNDICE B - Termo de Consentimento livre e esclarecido único - TCLEU

Você ou seu filho (a) está sendo convidado a participar do trabalho cujo objetivo é implantar técnicas de avaliação bioquímica de mucopolissacaridoses adaptadas para amostras de urina e sangue impregnado em papel filtro, dentro do projeto *“Avaliação bioquímica de pacientes com mucopolissacaridose I, II e VI: análise enzimática em sangue e dosagem de glicosaminoglicanos em urina em amostra ocasional e colhida em papel filtro antes e após o tratamento com a reposição enzimática”* aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa-UFRGS sob número 21.880.

Está sendo solicitada a doação de urina ocasional e/ou 9mL de sangue periférico. O desconforto causado será o de uma coleta habitual de sangue. Os dados advindos com a sua doação são de importância científica relevante para o estabelecimento de novas formas de diagnóstico na área de doenças lisossômicas de depósito. O material será utilizado apenas para fins do projeto de pesquisa, sendo garantida a confidencialidade das informações obtidas, sendo reservado ao doador acesso às mesmas.

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

Tipo de Amostra doada: ( ) urina ( ) sangue

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

Indivíduo ou Responsável: \_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador: \_\_\_\_\_

Pesquisadora responsável: Profa. Dra. Janice Coelho (fone 3308 5549)

Pesquisadora: Ana Carolina Breier (fone 3308 5549)

CEP-UFRGS: (51) 3308 3738

10.2.

 <b>UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL / PRÓ-REITORIA DE PESQUISA -</b> 
<b>PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP</b>
<b>DADOS DO PROJETO DE PESQUISA</b>
<b>Título da Pesquisa:</b> MONITORAMENTO DE GLICOSAMINOGLICANOS EM URINA DE PACIENTES COM MUCOPOLISSACARIDOSE I, II E VI EM AMOSTRA OCASIONAL E COLHIDA EM PAPEL FILTRO ANTES E APÓS O TRATAMENTO COM REPOSIÇÃO ENZIMÁTICA.
<b>Pesquisador:</b> Janice Carneiro Coelho
<b>Área Temática:</b>
<b>Versão:</b> 2
<b>CAAE:</b> 07137612.7.0000.5347
<b>Instituição Proponente:</b> Universidade Federal do Rio Grande do Sul
<b>DADOS DO PARECER</b>
<b>Número do Parecer:</b> 150.802
<b>Data da Relatoria:</b> 08/11/2012
<b>Apresentação do Projeto:</b> Todas as pendências apontadas em parecer anterior foram atendidas, de forma que o projeto encontra-se aprovado.
<b>Objetivo da Pesquisa:</b> Todas as pendências apontadas em parecer anterior foram atendidas, de forma que o projeto encontra-se aprovado.
<b> Avaliação dos Riscos e Benefícios:</b> Todas as pendências apontadas em parecer anterior foram atendidas, de forma que o projeto encontra-se aprovado.
<b>Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:</b> Todas as pendências apontadas em parecer anterior foram atendidas, de forma que o projeto encontra-se aprovado.
<b>Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:</b> Todas as pendências apontadas em parecer anterior foram atendidas, de forma que o projeto encontra-se aprovado.
<b>Recomendações:</b> Recomendamos a aprovação do projeto.

<b>Endereço:</b> Av. Paulo Gama, 119 - 2º andar do Prédio da Relatoria - Campus Centro <b>Bairro:</b> Farroupilha <b>Município:</b> PORTO ALEGRE <b>CEP:</b> 90.040-060 <b>UF:</b> RS <b>Telefone:</b> (51)3308-3738 <b>Fax:</b> (51)3308-4085 <b>E-mail:</b> mica@propeq.ufrgs.br

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Aprovado

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Aparecer adequado, encaminha-se.

PORTO ALEGRE, 22 de Novembro de 2012

  
Assinador por:  
**MARIA DA GRAÇA CORSO DA MOTTA**  
(Coordenador)

CAAE: 07137612.7.0000.5347



### 10.3.

---

#### Your manuscript ID CCLM.2014.0145 - submission confirmation

---

cclm.editorial@degruyter.com <cclm.editorial@degruyter.com>

10 de fevereiro de 2014 16:52

Para: anacarolina.breier@gmail.com

10-Feb-2014

Dear Mrs. Breier,

Your manuscript entitled "Optimization of electrophoresis in agarose gel for urinary glycosaminoglycans and possible applications in Mucopolysaccharidoses" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM).

Your manuscript ID is CCLM.2014.0145.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your affiliation, street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <http://mc.manuscriptcentral.com/cclm> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/cclm>.

Thank you for submitting your manuscript to CCLM.

Kind regards,  
Heike Jahnke  
Clinical Chemistry and Laboratory Medicine

## 10.4.

---

### Fwd: ABAB-D-14-00100

---

Ana C <anacarolina.breier@gmail.com>  
Para: Ana Carolina Breier <anacarolina.breier@gmail.com>

25 de fevereiro de 2014 10:41

----- Mensagem original -----

**Assunto:**ABAB-D-14-00100  
**Data:**26-01-2014 23:23  
**Remetente:**"Applied Biochemistry and Biotechnology" <abab@engr.ucr.edu>  
**Para:**"Janice Cameiro Coelho" <janice.coelho@ufrgs.br>

Dear Janice:

This is to notify you that the editor who will manage the review of your paper is Ashok Mulchandani. Please reference your manuscript number (ABAB-D-14-00100) in all correspondence.

Thank you for your submission.

Best wishes,

Applied Biochemistry and Biotechnology  
Journals Editorial Office