

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**ISOELETRIFOCALIZAÇÃO DA TRANSFERRINA EM SORO PARA
INVESTIGAÇÃO DAS DOENÇAS CONGÊNITAS DA GLICOSILAÇÃO:
PERFIL DOS CASOS INVESTIGADOS PELO LABORATÓRIO DE ERROS
INATOS DO METABOLISMO DO SERVIÇO DE GENÉTICA MÉDICA DO
HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE**

ANA PAULA PEREIRA SCHOLZ DE MAGALHÃES

PORTO ALEGRE

2018

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

**ISOELETROFOCALIZAÇÃO DA TRANSFERRINA EM SORO PARA
INVESTIGAÇÃO DAS DOENÇAS CONGÊNITAS DA GLICOSILAÇÃO:
PERFIL DOS CASOS INVESTIGADOS PELO LABORATÓRIO DE ERROS
INATOS DO METABOLISMO DO SERVIÇO DE GENÉTICA MÉDICA DO
HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE**

ANA PAULA PEREIRA SCHOLZ DE MAGALHÃES

Orientadora: Prof^a Dr^a Ida Vanessa Doederlein
Schwartz

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção de Mestre em Medicina: Ciências
Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina:
Ciências Médicas

PORTO ALEGRE

2018

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho, em especial:

A Ida Schwartz, professora incrível que admiro muito como profissional e mulher, que aceitou o desafio de me orientar. Acreditou em mim e me deu esta oportunidade, obrigado pela paciência, apoio, ensinamentos, estímulos e incentivos para concluir este trabalho.

A todos os membros do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do HCPA: A Maira Burin, pelo constante aprendizado, A Kristiane Michelin, e a equipe de Fernandas, Fernanda Medeiros, Fernanda Bitencourt e Fernanda Bender que sempre me deram muita força nos momentos difíceis, e também muito carinho e amizade, sem elas não conseguiria e não tenho palavras para agradecer tudo o que fizeram por mim! Estarão sempre em meu coração!

Ao Thiago Silva, médico residente da genética, que foi incansável na busca dos dados dos pacientes no sistema informatizado do hospital, muito obrigada pelo seu empenho, dedicação e companheirismo para a realização deste trabalho.

Aos colegas da secretaria do Serviço de Genética médica, Zeniara Lompa, Régis Guidobono, Karen Lucas e Tânia Braga pela paciência, e colaboração na busca e arquivamento das fichas laboratoriais dos pacientes investigados neste estudo.

A minha família que é a base de tudo, meu pai Carlos, irmãos Aline, Felipe e Francisco, e cunhada Roberta, que me deram muito apoio nessa caminhada e compreenderam a minha ausência.

A minha sogra Vera, sogro Luiz e cunhada Fabiana que são como pais e irmã pra mim, por todo apoio que recebi, me auxiliaram muito nos cuidados e dedicação com minha filha e compreenderam os momentos que não pude estar presente.

Ao meu marido Rafael, que me deu todo o apoio nos momentos mais difíceis, que supriu as necessidades da minha filha e os afazeres do lar, para que eu pudesse me dedicar a realização desse trabalho, que não me deixou cair e nem

desistir e sempre tinha uma palavra de amor, de apoio e incentivo, que acreditou em mim, mais do que eu mesma acreditei e sabe que tudo o que conquistamos foi com muita luta. Obrigada meu amor, sou grata a Deus por te ter em minha vida!

A minha filha Helena, que muitas vezes ficou chateada por eu não poder estar presente em passeios, brincadeiras, na historinha antes de dormir, mas soube compreender a dedicação da mãe para estudar e se tornar Mestre e fica toda orgulhosa dizendo que a mãe depois vai ser doutora. Te amo muito filha, e agradeço a deus por te ter em minha vida!

E por fim dedico esse trabalho a minha Mãe Juraci, pois sei que de onde ela está, ela me enviou muito amor, energia e muita luz para eu trilhar meus caminhos, e tenho certeza que ela estaria muito orgulhosa de ver a filha se tornar Mestre na Faculdade de Ciências Médicas da UFRGS.

RESUMO

Introdução: As doenças congênitas da glicosilação (CDG) são doenças genéticas do metabolismo das glicoproteínas, glicanos e glicolipídios, de herança autossômica recessiva em sua maioria, caracterizadas pela deficiência total ou parcial de enzimas ou proteínas envolvidas na glicosilação de proteínas. A maioria das CDG ocorrem por defeitos nas vias de N-glicosilação ou O-glicosilação. Atualmente, temos mais de 100 CDGs descritas. Os aspectos clínicos dessas doenças são graves e multissistêmicos, envolvendo desde sintomas pré-natais (hidropsia ou ascite) até malformações congênitas e retardo de desenvolvimento neuropsicomotor (RDNPM). Para a triagem das CDG que envolvem a N-glicosilação, o exame mais utilizado é a isoeletrofocalização da transferrina (IEFTF), sendo o único realizado para investigação de CDG no laboratório de erros inatos do metabolismo (LEIM) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). A confirmação do diagnóstico das CDG envolve, na maioria dos casos, exames genéticos ainda de difícil acesso via Sistema Único de Saúde.

Objetivos: Caracterizar os casos triados para CDG, pela IEFTF, no período de 2008 a 2017, no LEIM-HCPA.

Metodologia: Estudo observacional, transversal, retrospectivo, baseado na revisão das fichas laboratoriais dos pacientes investigados pelo LEIM-HCPA de 2008-2017. As seguintes variáveis foram analisadas: idade, sexo, sintomas, consanguinidade e ocorrência de outros casos na família. Os casos com padrão alterado e com padrão normal na IEFTF foram comparados. Foi criado um banco de dados para a análise estatística no programa *SPSS*, onde o nível de significância considerado para as análises foi de $p < 0,05$.

Resultados: No período analisado, 1546 pacientes foram triados pela IEFTF; destes, cinquenta e um (3%; mediana de idade = 24 meses, IQ 25-75= 11-57; sexo masculino = 27) apresentaram padrão alterado ($5 \pm 2,8$ casos/ano). Para 14 pacientes, foi possível a obtenção de dados sobre a conclusão do diagnóstico, sendo que 10 foram confirmados para outras doenças (galactosemia clássica= 4; intolerância hereditária à frutose= 4; doenças peroxissomais= 2). Os demais receberam o diagnóstico de PMM2-CDG (n= 2), MPDU1-CDG (n= 1) e SLC35A2-CDG (n=1) . Quando comparados os casos com padrão alterado e normal,

constata-se que uma maior prevalência de casos alterados ocorreu quando a investigação foi realizada na faixa etária de 11m-3 anos. A ocorrência de mamilos invertidos, hepatopatia, hipoglicemia, alterações oftalmológicas e recorrência familiar aumentam em 11x, 4.6x, 2.9x, 2.8x e 2.5x a probabilidade de ocorrência de alteração na IEFTF, respectivamente.

Conclusões: Os nossos dados sugerem que a investigação de um caso com suspeita de CDG é complexa, sendo agravada pela ocorrência de resultados falso-positivos na IEFTF e pela falta de acesso aos exames diagnósticos. A triagem para CDG deve ser sugerida principalmente aos pacientes que apresentam: mamilos invertidos hepatopatias e hipoglicemia.

Palavras chave: Isoeletrofocalização; Transferrina; Doenças Congênitas da Glicosilação; triagem; N-glicosilação; O-glicosilação;

ABSTRACT

Introduction: Congenital disorders of glycosylation (CDG) are genetic diseases of the glycoprotein, glycan and glycolipid metabolism, most of which are autosomal recessive, characterized by total or partial deficiency of enzymes or proteins involved in the glycosylation of proteins. Most CDGs occur by defects in N-glycosylation or O-glycosylation pathways. Currently, there are over 100 CDGs reported. The clinical aspects of these diseases are severe and multisystemic, ranging from prenatal symptoms (hydrops or ascites) to congenital malformations and neuropsychomotor developmental delay (NPMD). The most commonly used test for screening of CDGs involving N-glycosylation is isoelectric focusing (IEF) of serum transferrin, which is the only test being performed for CDG investigation in the Inborn Errors of Metabolism Laboratory (IEML) of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). In most cases, confirmation of diagnosis of CDGs involves genetic tests that are still difficult to access through the Unified Health System.

Objectives: To characterize cases screened for CDG, by IEF, from 2008 to 2017, in the IEML-HCPA. **Methodology:** Observational, cross-sectional, retrospective study based on the review of laboratory records of patients investigated by the IEML-HCPA from 2008-2017. The following variables were analyzed: IEF results, age at investigation, sex, history of consanguinity and occurrence of other cases in the family, clinical manifestations. Cases with altered and normal patterns in IEF were compared. A database was created for the statistical analysis in the SPSS program, where the level of significance considered for analyzes was $p < 0.05$.

Results: 1546 patients were screened by IEF; of these, fifty-one (3%; mean age = 24 months, IQ 25-75 = 11-57; male = 27) presented an altered pattern (5 ± 2.8 cases / year). It was possible to obtain data on the conclusion of diagnosis for 14 patients, of which 10 were false-positive (classical galactosemia = 4; hereditary fructose intolerance = 4; peroxisomal diseases = 2). The others were diagnosed with PMM2-CDG (n = 2), MPDU1-CDG (n = 1), and SLC35A2-CDG (n = 1). When compared with cases of altered and normal patterns, we observed that a higher

prevalence of altered cases occurred when the investigation was performed in the age group of 11mo-3y. The occurrence of inverted nipples, hepatopathy, hypoglycemia, ophthalmologic alterations, and familial recurrence increases the probability of occurring alterations in IEF, respectively, by 11x, 4.6x, 2.9x, 2.8x, and 2.5x.

Conclusions: Our data suggest that investigation of cases with suspicion of CDG is complex, and it is exacerbated by the occurrence of false positives in IEF and lack of access to diagnostic tests. Screening for CDG should be suggested mainly for patients who present: inverted nipples, liver disease and hypoglycemia.

Keywords: Isoelectric focusing; Transferrin; Congenital Glycosylation Disorders; screening; N-glycosylation; O-glycosylation;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Localização das doenças congênitas da glicosilação (CDG) nos componentes celulares.

Figura 2 - Estratégia de busca de referências bibliográficas

Figura 3 - Fluxograma de diagnóstico atualizado para os casos de CDG não resolvidos

Figura 4 - Via de glicosilação da proteína N-ligada no retículo endoplasmático (RE)

Figura 5 - Representação de alguns tratamentos promissores de CDG

Figura 6 - Marco conceitual do presente estudo.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CDG – Doenças Congênitas da Glicosilação

IEF – Isoeletrofocalização

TF – Transferrina

IEFTF – Isoeletrofocalização da Transferrina

RE – Retículo endoplasmático

RDNPM – Retardo do Desenvolvimento Neuropsicomotor

EIM – Erros Inatos do Metabolismo

LEIM – Laboratório de erros inatos do metabolismo

SGM – Serviço de Genética Médica

HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

GPI – Glicosilfosfatidilinositol

GDP-manose – Guanosina difosfomanose

ESI-MS – Ionização por eletrospray por espectrometria de massas

MALDI-TOF Ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) / por tempo de voo, sigla TOF

APOCIII – apolipoproteína CIII

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 SINTOMAS E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DAS DOENÇAS CONGÊNITAS DE GLICOSILAÇÃO	15
2.2 TIPOS DE DOENÇAS CONGÊNITAS DE GLICOSILAÇÃO	15
2.2.1 Defeitos na N-glicosilação das Proteínas	16
2.3.2 Defeitos da O-glicosilação das Proteínas	19
2.3.3 Defeitos de glicosilação múltipla e outras rotas	19
2.3 DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS CONGÊNITAS DE GLICOSILAÇÃO	22
2.4 TRATAMENTO PARA DOENÇAS CONGÊNITAS DE GLICOSILAÇÃO	25
3. JUSTIFICATIVA	29
4. OBJETIVOS	30
4.1 OBJETIVO GERAL	30
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
6. ARTIGO	34
7. CONCLUSÕES	49
8. PERSPECTIVAS	50
ANEXO I – CARTA DE APROVAÇÃO DE PROJETO	51
ANEXO II – FORMULÁRIO DE DADOS DOS PACIENTES	52

1. INTRODUÇÃO

As doenças congênitas da glicosilação (CDGs) são doenças genéticas do metabolismo das glicoproteínas, glicanos e glicolipídios e que, em sua maioria, apresentam herança autossômica recessiva. As CDGs são caracterizadas pela deficiência total ou parcial de diversas enzimas envolvidas na glicosilação de proteínas, podendo também ser causadas por mutações em genes que codificam glicosiltransferases, glicosidases remodeladoras e transportadores de nucleotídeos de açúcar, os quais são conhecidos por terem um papel direto na glicosilação. Além disso, novas formas de CDG foram recentemente identificadas com defeitos no tráfego vesicular e defeitos de homeostases (Al Teneiji *et al.*, 2017; Péanne *et al.*, 2018) □□

Há dois tipos principais de glicosilação de proteínas: N-glicosilação e O-glicosilação. A N-glicosilação (ligação de N-glicanos ao grupo amino de asparaginas da proteínas) compreende uma etapa de montagem e uma etapa de processamento que se estende através de três compartimentos distintos: citoplasma, retículo endoplasmático (RE) e complexo de Golgi. A O-glicosilação (ligação de O-glicanos a grupos hidroxila de treoninas ou serinas de proteínas) não apresenta etapa de processamento, consistindo apenas na etapa de montagem, a qual ocorre somente no complexo de Golgi (Figura 1) (Jaeken, 2010).

Desde a sua primeira descrição clínica em 1980, mais de 100 tipos de CDG já foram identificadas e esse número continua aumentando. As CDGs representam um grande grupo que expressa uma ampla variedade de sintomas, com manifestações multissistêmicas frequentemente associados a um grave déficit psicomotor. □ Várias abordagens foram desenvolvidas para o diagnóstico eficiente desses diversos tipos de CDG, tais como isoeletrofocalização da transferrina (IEFTF) como um método de triagem, e exames mais específicos como análises de mutações e painel de genes específicos para CDGs. (Péanne *et al.*, 2018; Zühlendorf *et al.*, 2015) □□.

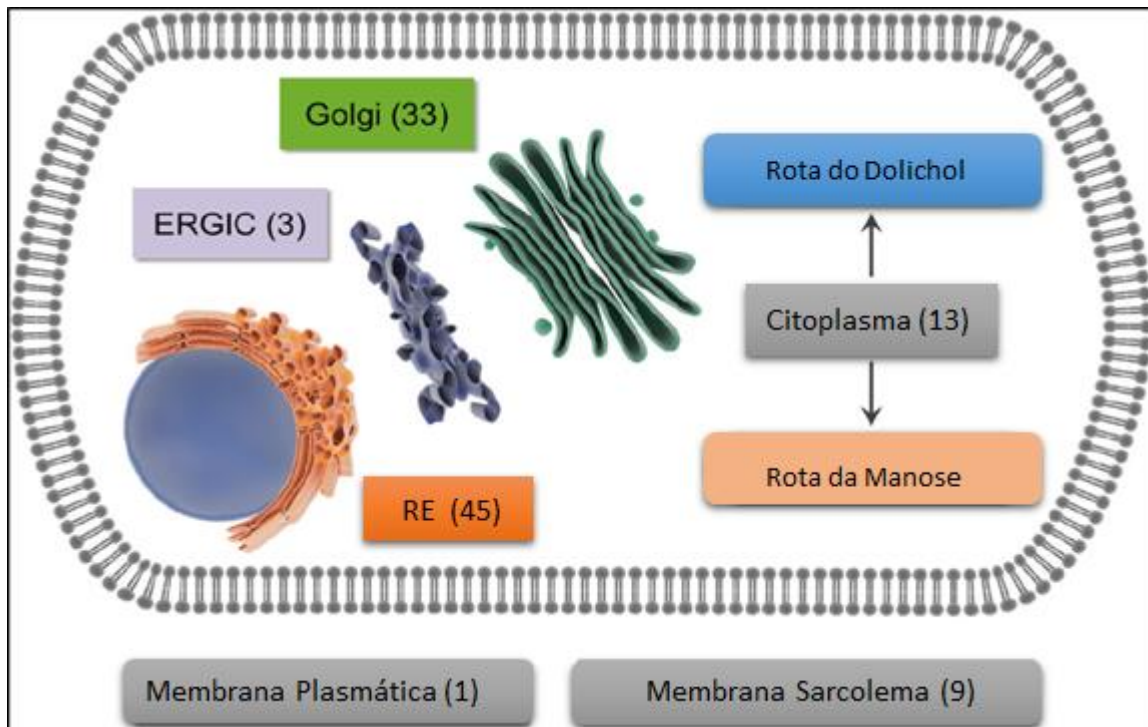


Figura 1. Localização das doenças congênitas da glicosilação (CDG) nos componentes celulares. O número de CDG para cada local é indicado entre parênteses. ERGIC= compartimento intermediário do Retículo endoplasmático-Golgi. Adaptado de Jaeken e Péanne, 2017.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Esta revisão foi focada no conhecimento dos tipos de CDG, bem como seus sintomas, diagnóstico e tratamento. Como estratégia de busca utilizamos a base de dados do PubMed, banco de teses e periódicos da CAPES, no período de 1980 a 2018. Foram realizadas buscas através dos termos “congenital disorders of glycosylation”, “CDG types”, “CDG classification”, “isoelectrofocalization of transferrin to cdg”, “diagnosis for CDG” e suas combinações apresentadas na Figura 2.

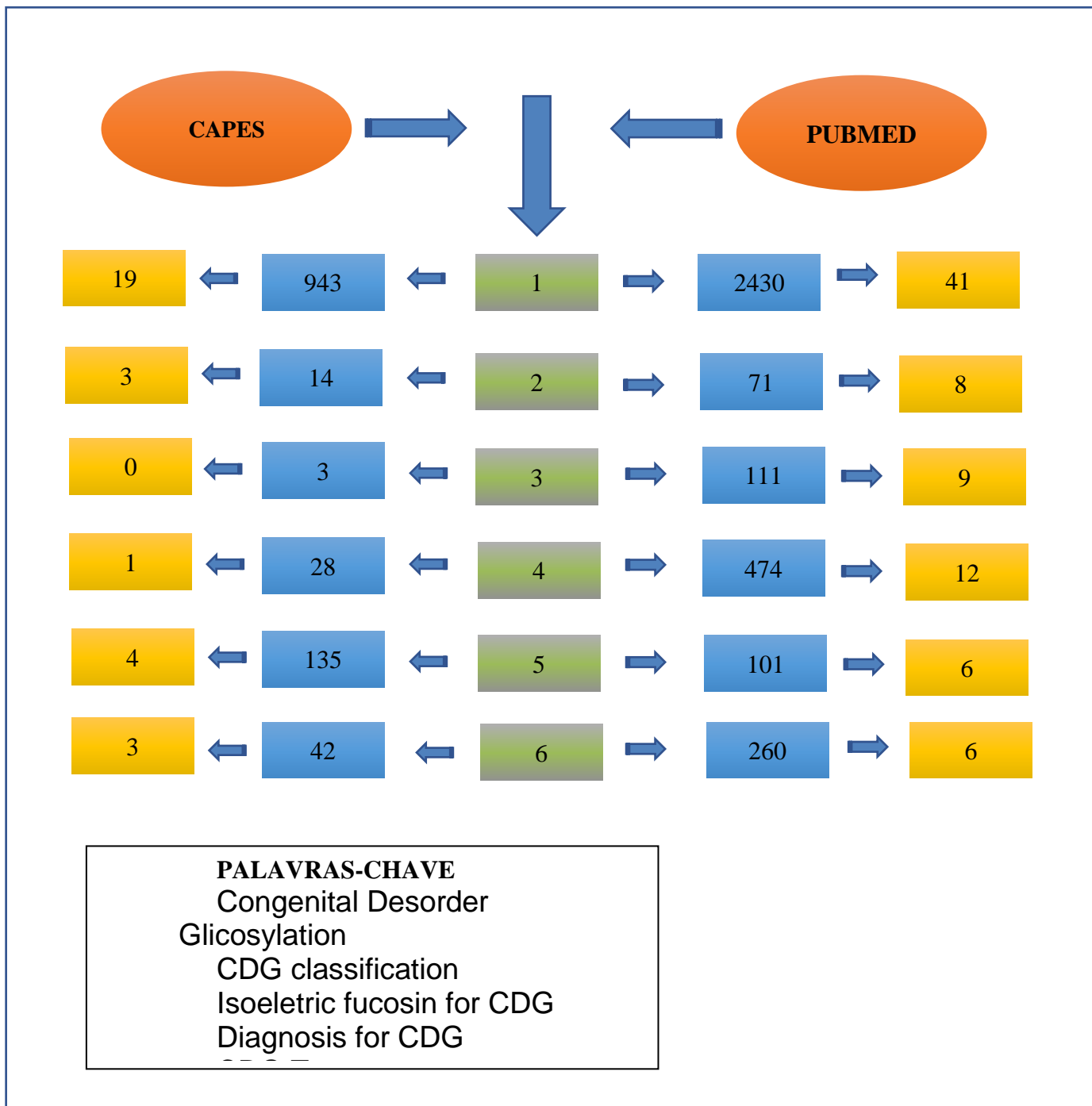


Figura 2. Estratégia de busca de referências bibliográficas sobre as bases que fundamentam os objetivos deste estudo. Este é o resultado da busca da combinação das palavras-chave.

2.1 SINTOMAS E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DAS DOENÇAS CONGÊNITAS DE GLICOSILAÇÃO

O espectro clínico associado às CDGs é amplo e multissistêmico. No período gestacional, podem ocorrer sintomas como a hidropisia fetal não-imune, microcefalia, problemas morfológicos e dismorfias faciais. Já em neonatos e na infância, observam-se problemas neurológicos, hipoplasia cerebral com perda de massa cinzenta e branca, mamilos invertidos, estrabismo e movimentos oculares anormais, retardo de desenvolvimento neuropsicomotor (RDNPM), hipotonia, ataxia e hiporreflexia, convulsões, problemas de alimentação, como anorexia, vômitos e diarreia, defeitos do sistema imunológico, hipogonadismo e outras características como dismorfias variáveis (orelhas grandes), anormalidades subcutâneas (lipomas), hepatomegalia, anormalidades esqueléticas (como cifose e escoliose).

Algumas crianças ainda podem apresentar cardiomiopatia. A mortalidade infantil associada a esses distúrbios é alta, principalmente devido a infecções graves ou falência de órgãos. Após a infância, observam-se sintomas como retinite pigmentosa, acidente vascular cerebral por problemas de coágulos sanguíneos e epilepsia. Além disso, as CDGs também estão associadas a um fenótipo mais leve sem dismorfias e com leve RDNPM. Desta forma, recomenda-se, portanto, que a hipótese de CDG seja considerada em qualquer caso de síndrome inexplicada (Marklová e Albahri, 2007). □

2.2 TIPOS DE DOENÇAS CONGÊNITAS DE GLICOSILAÇÃO

Os tipos de CDG foram classificados em: defeitos na N-glicosilação, defeitos na O-glicosilação, defeitos no glicoesfingolípídeo e na glicosilação de âncora de glicosilfosfatidilinositol GPI, defeitos múltiplos envolvendo as duas glicosilações e outras rotas (Jaeken, 2009). A nomenclatura atual recomendada para as CDG inclui o nome do gene envolvido, seguido do termo CDG. A nomenclatura antiga, por sua vez, descrevia o subtipo de CDG com letras minúsculas em ordem alfabética, indicando a sequência em que foram identificados. Abaixo segue a descrição dos tipos de CDG mais frequentes, conforme a via de glicosilação afetada. A tabela 1 do artigo apresenta mais de 100 tipos de CDG já identificados.

2.2.1 Defeitos na N-glicosilação das Proteínas

2.2.1.1 PMM2-CDG

A deficiência da enzima fosfomanomutase (PMM-2) é o mais prevalente dos defeitos da N-glicosilação, sendo a CDG com o maior número de casos diagnosticados. Decorrem de problemas de glicosilação no RE, e o defeito ocorre na segunda etapa da manose, na transformação de manose-6-fosfato em manose-1-fosfato e posterior síntese de Guanosina Difosfomanose (GDP-manose), causando a deficiência de GDP-manose. Essa deficiência causa hipoglicosilação de várias glicoproteínas, incluindo proteínas séricas, enzimas lisossômicas e membranas glicoproteicas (Jaeken, 2010).

O espectro clínico é muito amplo, sendo que o sistema nervoso está afetado em todos os pacientes e os órgãos estão envolvidos de forma variável. Os pacientes apresentam estrabismo e outros movimentos oculares anormais, hipotonia axial, retardo psicomotor, ataxia e hiporreflexia. Após a infância, os sintomas incluem retinite pigmentosa, e em alguns casos, episódios de acidente vascular cerebral. Durante os primeiros anos de vida, ocorrem problemas de alimentação, tais como anorexia em decorrência de vômitos, e diarreia. Dismorfias também são observadas, como orelhas grandes hipoplásicas, distribuição anormal de tecido adiposo, anormalidades esqueléticas, hepatomegalia e hipogonadismo. (Jaeken, 2010)

2.2.1.2 MPI-CDG

Nesta CDG, o defeito da fosfoisomerase (MPI) ocorre no primeiro passo da biossíntese da glicose em GDP-manose no retículo endoplasmático. Esta CDG possui achados bioquímicos igualmente aos encontrados em PMM2-CDG. É o único defeito da N-glicosilação no qual o comprometimento neurológico é menor ou inexistente. Os sintomas começam entre 1 e 11 meses de idade e consistem em várias combinações de vômitos recorrentes, dor abdominal, enteropatia perdedora de proteínas, trombozes recorrentes, sangramento gastrointestinal, doença hepática e sintomas de hipoglicemia. O índice de óbito é alto pelas complicações da doença, porém este é o único CDG conhecido que possui tratamento eficiente (Jaeken, 2010).

2.2.1.3 ALG6-CDG

ALG6 codifica a glucosiltransferase I. A sua deficiência provoca um defeito na ligação da primeira glicose (de três) para dolichol-ligado $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ no RE intermediário.. Como no PMM2-CDG, os pacientes mostram hipotonia, estrabismo e convulsões, mas o RDNPM é menor, apresentam menos dismorfias e geralmente nenhuma retinite pigmentosa ou hipoplasia cerebelar. Notavelmente, algumas glicoproteínas têm níveis sanguíneos baixos (particularmente de fator XI, e inibidores da coagulação antitrombina e Proteína C). Análise dos oligossacárideos ligados a dolichol em fibroblastos mostra um acúmulo de glicano intermediário de $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (Jaeken, 2010).

2.2.1.4 ALG3-CDG

Este tipo de CDG é causada pela deficiência da manosiltransferase VI. Até o momento, apenas seis pacientes foram diagnosticados. Os sintomas incluem RDNPM grave, espasmos, microcefalia pós-natal, atrofia óptica, coloboma de íris, hipoglicemia, hiperinsulinemia com hiperplasia de células de ilhotas e cérebro com atrofia de corpo caloso. A característica bioquímica desta CDG é um acúmulo em fibroblastos de dolichol pirofosfato- $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (Jaeken, 2010).

2.2.1.5 ALG12-CDG

Nos seis pacientes relatados com a deficiência da manosiltransferase VIII, os fenótipos mostraram várias combinações de dismorfia facial, RDNPM, hipotonia, mamilos invertidos, acúmulo de gordura subcutânea, displasia esquelética e diminuição de níveis séricos de IgG. O padrão bioquímico característico deste transtorno é um acúmulo de dolichol pirofosfato- $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ (Jaeken, 2010).

2.2.1.6 ALG8-CDG

Esta CDG é devido à deficiência de glucosiltransferase II. Foram notificados cinco pacientes de quatro famílias. Três apresentaram doença grave com dismorfia e falha de múltiplos órgãos resultando em morte precoce desses pacientes. O quarto paciente apresentava um fenótipo mais ameno com hepatomegalia e enteropatia perdedora de proteínas. No quinto paciente, havia proeminente envolvimento do

sistema nervoso central além do hepático e doença renal. Foi observado o acúmulo de pirofosfato de dolichol-Glc₁Man₉GlcNAc₂ nos fibroblastos. (Jaeken, 2010)

2.2.1.7 ALG1-CDG

Os quatro pacientes relatados com a deficiência de manosiltransferase mostraram epilepsia, RDNPM grave e características variáveis tais como: dismorfia, disfunção hepática, cardiomiopatia, síndrome nefrótica, hipogonadismo e depleção de células beta. Análise de oligossacarídeos ligados a lipídeos mostrou um acúmulo de GlcNAc₂-PP-dolichol nos fibroblastos. (Jaeken, 2010)

2.2.1.8 RFT1-CDG

Este é um defeito na flipase que transfere Man₅GlcNAc₂-PP-Dol do citoplasma para o lado luminoso da RE. Os seis pacientes relatados mostraram RDNPM grave, hipotonia, epilepsia, resistência a drogas e surdez neurosensorial. Esta é a primeira CDG com surdez nos neurosensores como uma característica consistente. A análise de oligossacarídeos mostrou um acúmulo de Man₅GlcNAc₂-PP-Dol nos fibroblastos. (Jaeken, 2010)

2.2.1.9 TUSC3-CDG

Este é um defeito em uma das subunidades do complexo oligosacariltransferase. Foi observado em duas famílias (herança autossômica recessiva) as quais apresentavam quadro não sindrômico de atraso mental, o que sugere que papel deste complexo está envolvido no funcionamento cognitivo (Jaeken, 2010).

2.2.1.10 MGAT2-CDG

Quatro pacientes foram relatados com deficiência de N-acetylglucosaminyltransferase II. Além do envolvimento neurológico (RDNPM, epilepsia e distúrbios comportamentais), esses pacientes apresentam dismorfia craniofacial, anormalidades esqueléticas distúrbios gastrointestinais e retardo de crescimento. Como em outros pacientes do grupo CDG-II, a transaminase oxaloacética glutâmica sérica é aumentada, mas a transaminase pirúvica glutâmica

é normal. A análise estrutural dos oligossacarídeos de transferrina indica uma estrutura anormal de glicano (uma glicano monoantênario do tipo N-acetilindosamina) como visto em algumas outras doenças de CDG-II. (Jaeken, 2010)

2.3.2 Defeitos da O-glicosilação das Proteínas

Os defeitos foram identificados na síntese de O-xilosilglicanos (EXT1 / EXT2-CDG e B4GALT7-CDG), de O-N-acetilgalactosaminilglicanos (GALNT3-CDG), de O-xilosil / Nacetilgalactosaminilglicanos (SLC35D1-CDG), de O-manosilglicanos (POMT1 / POMT2-CDG e POMGNT1-CDG) e de O-fucosilglicanos (B3GALTL-CDG).(Jaeken, 2010)

2.3.2.1 EXT1 / EXT2-CDG

Este é o defeito de várias exostoses cartilaginosas e a única CDG conhecida com herança autossômica dominante. É caracterizada por osteocondromas das extremidades dos ossos longos e é, portanto, uma CDG monossistêmica. Estes tumores estão frequentemente presentes no nascimento, e seu crescimento diminui durante a adolescência e para na idade adulta. Uma pequena porcentagem dessas lesões mostram degeneração maligna. Complicações podem surgir da compressão de nervos periféricos e vasos sanguíneos. O EXT1 / EXT2 está localizado no Complexo de Golgi e tem tanto a atividade de glucuroniltransferase e N-acetil-d-hexosaminiltransferase envolvidas na polimerização de heparan sulfato. A hipótese é de que mutações nestas glicosiltransferases prejudicam a síntese de um glicosaminoglicano que tem função de um supressor de tumor. Isso explicaria o maior risco de pacientes para desenvolver condrossarcomas e osteossarcomas.

Mutações em *EXT1* e em *EXT2* são responsáveis por mais de 70% dos casos de exostoses múltiplas hereditárias. (Jaeken, 2010)

2.3.3 Defeitos de glicosilação múltipla e outras rotas

Este grupo compreende defeitos combinados em N- e O-glicosilação.

2.3.3.1 DPM1-CDG

Foram relatados seis pacientes com este defeito na subunidade catalisadora da sintase Dol-P-Man. Eles demonstraram um comprometimento neurológico e também uma acumulação de Man₅GlcNAc₂-PP-dolichol em fibroblastos (Jaeken, 2010).

2.3.3.2 MPDU1-CDG

A proteína deficiente é considerada uma chaperona envolvida no uso de Dol-P-Man e Dol-P-Glic. Os quatro pacientes relatados apresentaram encefalopatia, e três deles apresentaram problemas epidérmicos como o eritema escamoso, um paciente tinha nanismo, apresentando deficiência de hormônio do crescimento. Nos fibroblastos apresentavam Man₅GlcNAc₂-PP-dolichol, bem como Man₉GlcNAc₂-PP-dolichol acumulados (Jaeken, 2010).

2.3.3.3 SLC35A2-CDG

O *SLC35A2* é um gene ligado ao X, que codifica a UDP-galactose primária, e os indivíduos mais afetados são do sexo feminino. Pertence à família *SLC35A* de transportadores de açúcar de nucleotídeos, que inclui também os transportadores caracterizados, *SLC35A1* (CMP-ácido siálico) e *SLC35A3* (UDP-N-acetilglicosamina), bem como dois supostos transportadores de açúcar nucleotídico *SLC35A4* e *SLC35A5* com especificidade de substrato desconhecida. (Ng, B. *et al.*, 2019)

Até o momento, informações moleculares e clínicas de 32 indivíduos com variantes de novo em *SLC35A2* foram relatados com a maioria dos sintomas neurológicos, especialmente epilepsia, atraso no desenvolvimento e incapacidade intelectual. (Ng, B. *et al.*, 2019)

Para muitos tipos de CDG que afetam a N-glicosilação, a isoeletrofocalização da transferrina sérica é uma ferramenta confiável para a triagem inicial da CDG. Porém nos casos de *SLC35A2*-CDG, podem ocorrer resultados alterados, resultados normais, e também pode ocorrer a normalização de um resultado anteriormente alterado, tornando o diagnóstico dessa alteração ainda mais complexo. (Bruneel *et al.*, 2018)

2.3.3.3 SLC35C1-CDG

Alguns pacientes foram relatados com a chamada síndrome de deficiência de adesão leucocitária tipo II (LAD II). Esta síndrome compreende dismorfia craniofacial, atraso de crescimento e RDNPM, bem como infecções bacterianas recorrentes com leucocitose alta. Devido à hipofucosilação, os neutrófilos destes pacientes não possuem sialil-lewis X, um ligamento de fucose contendo carboidratos ligantes da selectina, família de moléculas de adesão celular. Este ligamento é necessário para o recrutamento de neutrófilos para sítios de infecção. Um tratamento parcial está disponível para alguns pacientes, dependendo da mutação (Jaeken, 2010).

2.3.3.4 COG-CDG

O complexo oligomérico de Golgi (COG) é conservado em uma membrana de Golgi periférica de oito subunidades (COG1-8), complexo de proteínas hetero-oligoméricas. Este complexo é pensado para desempenhar um papel crítico no processos de ligação envolvendo Golgi retrógrado e no transporte de proteínas responsáveis pela biossíntese de glicanos. Foram relatados defeitos em COG1 (COG1-CDG, CDG-IIg), COG7 (COG7-CDG; CDG-IIe), COG8 (COG8-CDG; CDG-IIh), COG4 (COG4-CDG; CDG-IIj), COG5 (COG5-CDG) e COG6 (COG6-CDG) (Jaeken, 2010). Ocorre também o aumento das atividades de enzimas lisossômicas no soro nos casos de COG7-CDG anteriormente chamado CDG-IIe (Ferreira *et al.*, 2017).

2.3.3.5 ATP6V0A2-CDG

É um subgrupo de pacientes com herança autossômica recessiva para a síndrome de Cutis laxa, e apresentam na IEFTF padrão de tipo 2. Esses pacientes apresentam geralmente a pele enrugada ao nascimento que torna-se menos evidente com a idade. Eles também apresentam um aumento da elasticidade das articulações, anormalidades oftalmológicas (principalmente estrabismo, miopia ou ambliopia, e às vezes distrofia corneana), microcefalia, e RDNPM que melhora com a idade.

2.3 DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS CONGÊNITAS DE GLICOSILAÇÃO

Atualmente, a triagem para CDG por defeitos de N-glicosilação da transferrina pode ser realizada pela isoeletrofocalização da transferrina (IEFTF), primeiramente introduzida por Jaeken e colaboradores em 1984, ou por eletroforese capilar (EC). Essas técnicas permitem a separação das isoformas de transferrina (TF) baseado na diferença de carga entre as moléculas, o qual é resultado do número de resíduos de ácido siálico terminais (Van Scherpenzeel *et al.*, 2015). Além disso, a triagem pode ser realizada por outros dois métodos: ionização por eletrospray por espectrometria de massa (ESI-MS) e ionização por dessorção a laser assistida por matriz seguido pela detecção em um analisador do tipo tempo de voo (MALDI-TOF).

A IEFTF é um método eletroforético no qual há a separação das isoformas da transferrina de acordo com seus pontos isoelétricos, seguida de imunofixação com anti-soro específico, o qual permite identificar as bandas previamente separadas (Marklová, 2007). A IEFTF detecta 21 tipos de CDGs causadas por defeitos na via de N-glicosilação, e 23 tipos de CDGs causadas por defeitos em múltiplas ou outras vias de glicosilação, sendo considerado o teste de triagem padrão para distúrbios da glicosilação com deficiência de ácido siálico (Jaeken & Péanne, 2017; Péanne *et al.*, 2018).

A TF sérica é composta principalmente por tetrasialotransferrina e pequenas quantidades de mono-, di-, tri-, tetra- e penta-hexasialotransferrinas. A deficiência parcial de ácido siálico em CDG provoca um deslocamento catódico que gera um padrão de bandas característico das CDGs (Lefeber, Morava e Jaeken, 2011).

Existe a possibilidade de resultados positivos na IEFTF que não são CDG (falso-positivos para CDG), e em casos de padrão alterado no exame, devem ser descartadas e excluídas as hipóteses de galactosemia, intolerância hereditária à frutose e hepatopatias, pois são possíveis variantes da glicoproteína da TF. A TF também é um biomarcador para o uso crônico e abusivo de álcool e infecções com microrganismos produtores de neuraminidase. (Zühlsdorf *et al.*, 2015; Jaeken e Péanne, 2017) □. Em crianças híginas com cerca de 6 semanas de vida, as bandas de transferrina sérica são ligeiramente mais intensas do que mais tarde (parecendo um padrão alterado mais fraco) (Péanne *et al.*, 2018) □

É importante salientar que casos com resultados normais não devem ser desconsiderados, pois podem ser casos falso-negativos, uma vez que a IEFTF detecta apenas defeitos de N-glicosilação e de múltiplas ou outras vias, cerca de 50% das CDGs descritas atualmente. (Francisco *et al.*, 2018)

□A triagem das CDGs também pode ser realizada pelo método de ionização por eletrospray por espectrometria de massas (ESI-MS), método preferido, devido a sensibilidade e a velocidade analítica (10 minutos por amostra) e operação relativamente simples. A análise é totalmente automatizada e fornece informações estruturais, permitindo assim a discriminação entre os defeitos de CDG. Apesar dessas vantagens, o aparelho para realização do exame e seus insumos são caros (Marklová, 2007).

A ionização por dessorção a laser assistida por matriz seguido pela detecção em um analisador do tipo tempo de voo (MALDI-TOF), é um método altamente automatizado e altamente específico que pode ser usado para detecção dos diferentes tipos de CDG baseado em TF. Em contraste com a IEFTF, no entanto, não é capaz de detectar pequenas diferenças de massa que podem contribuir para a falsa positividade devido a polimorfismos de proteínas. A falsa negatividade dos métodos de triagem apresenta problema, pois alguns pacientes com defeitos genéticos e enzimáticos comprovados desenvolveram um padrão TF quase normal. Nestes casos, um quadro clínico suspeito pode ser a única indicação para garantir investigação adicional (Marklová, 2007).

Para as CDGs das vias de O-glicosilação, a triagem é realizada através da análise de apolipoproteína CIII (APO-CIII), que pode ser realizada por espectrometria de massas ou por IEFTF específica para APO-CIII (Marklová, 2007; Nicolardi *et al.*, 2012; Francisco *et al.*, 2018). As CDGs das vias de O-glicosilação já somam 25 genes descritos, e o diagnóstico é feito por testes moleculares. (Francisco *et al.*, 2018).

Os protocolos para o diagnóstico disponíveis, após a triagem de CDG por IEFTF, são: a dosagem da enzima fosfomanutase para descartar PMM2-CDG, que é a CDG mais comum e frequente, e também é recomendada a dosagem de fosfomanose isomerase para MPI-CDG em leucócitos ou fibroblastos. (Jaeken,

2010)□. Porém, a análise da mutação direta dos genes *MPI* e *PMM2*, respectivamente já está sendo um melhor caminho no protocolo de investigação dessas doenças, pois já existem evidências de que ocorrem casos falso-negativos de *PMM2* em fibroblastos (Péanne *et al.*, 2018). A abordagem adicional deve ser guiada pela apresentação clínica. No caso de uma síndrome de cútis-laxa, deve ser realizada análise mutacional do gene *ATP6V0A2* (Jaeken, 2010)

O sequenciamento de um painel de genes envolvidos em CDG é indicado para o diagnóstico confirmatório. Caso as mutações comuns não sejam identificadas no painel, é sugerido o sequenciamento de todo o exoma e, se necessário, o sequenciamento de todo o genoma para todos os tipos conhecidos de CDG (Jaeken & Péanne, 2017)

Assim, o protocolo ideal para investigação das CDGs após a triagem por IEFTF seria sequenciar o gene *PMM2* primeiro, no caso de padrão de tipo I, por ser a CDG mais comum e nos demais casos, há uma tendência de primeiro realizar uma análise de painel específico para CDG e, quando negativo, sequenciamento de genoma / exoma completo. Abaixo na Figura 2 segue um fluxograma resumindo a abordagem para obtenção de diagnóstico molecular em CDG. (Péanne *et al.*, 2018)

Por tanto, a abordagem combinada de dados clínicos do paciente que mostram um padrão reconhecível de dismorfismo, usando triagem por IEFTF associada a uma investigação genômica, nos permite chegar ao diagnóstico das CDG.

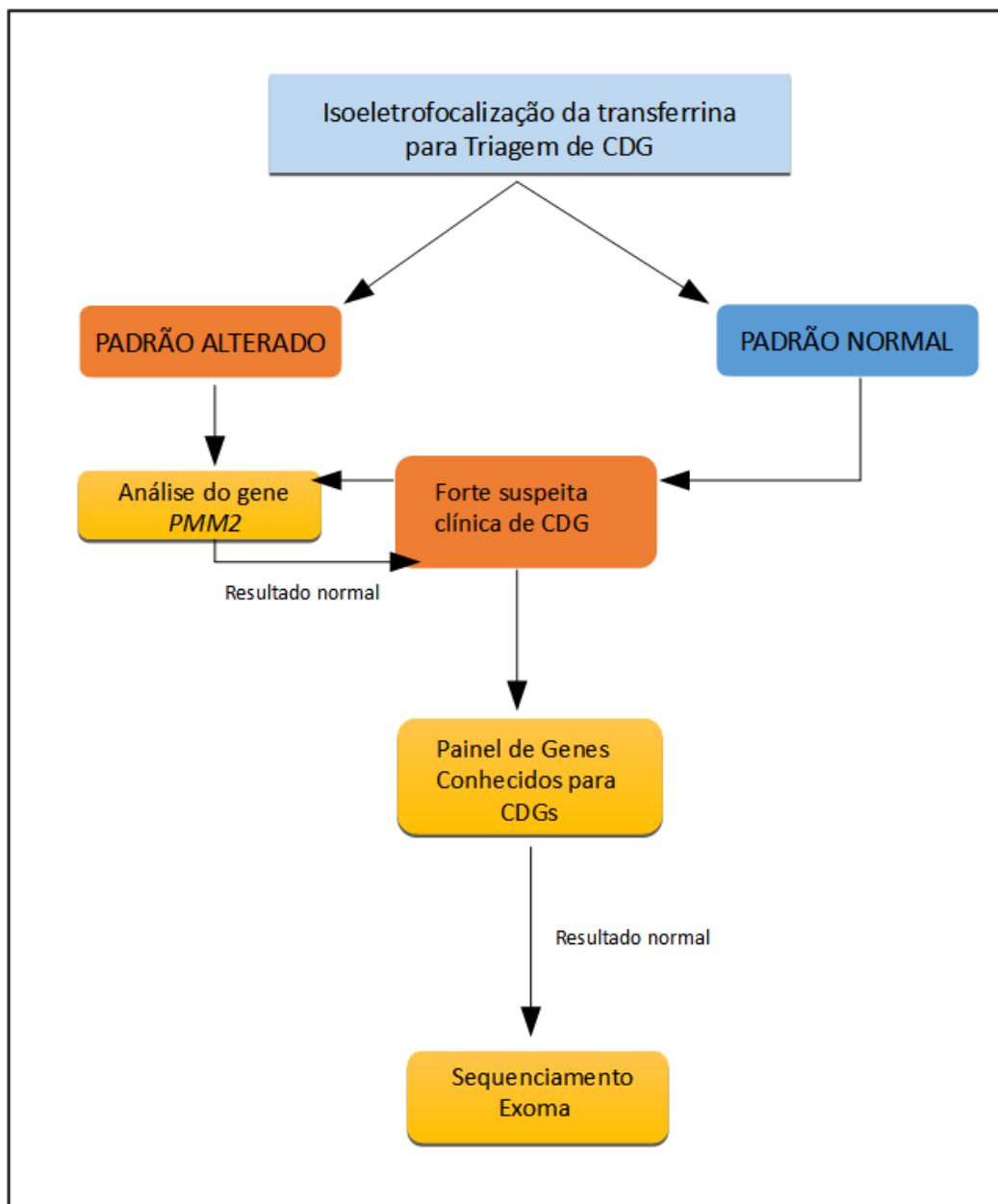


Figura 4. Fluxograma de representação do protocolo ideal de investigação de doenças congênitas da glicosilação (CDG). Recomenda-se a realização da Isoeletrofocalização duas vezes em amostras independentes. CDG= doenças congênitas da glicosilação. Adaptado de Péanne et al., 2018

2.4 TRATAMENTO PARA DOENÇAS CONGÊNITAS DE GLICOSILAÇÃO

Tratamento dietético é uma importante intervenção em pacientes com CDG. Entretanto, apenas alguns subtipos de CDG podem ser adequadamente tratados com suplementação, por exemplo, manose, galactose, entre outros (Witters *et al*, 2017).

O MPI-CDG foi o primeiro CDG com um tratamento razoavelmente eficaz. Os estudos mostraram uma melhora clínica significativa na intervenção dietética com manose oral (1 g / kg por dia dividida em 3-4 doses), melhorando o padrão da isoforma da transferrina sérica, as anomalias da coagulação, o hiperinsulinismo e a perda de proteína na enteropatia. A terapia com manose age pela sua transformação em manose-6-fosfato, restaurando assim a via defeituosa. Alguns pacientes necessitam de doses mais altas e alguns pacientes não toleram manose devido à hemólise recorrente. Embora a manose reduza os níveis das transaminases séricas, ela não cura a doença do fígado no MPI-CDG. Vários pacientes com MPI-CDG são conhecidos com cirrose hepática progressiva e insuficiência hepática na terapia com manose. O transplante de fígado demonstrou ser benéfico em alguns pacientes com recuperação clínica completa (Janssen *et al.*, 2014).

PGM1-CDG envolve várias vias metabólicas, incluindo glicogenólise, glicólise e glicosilação. A terapia com galactose foi introduzida com base no padrão de hipogalactosilação dos glicanos protéicos nessa patologia, melhorando o tipo misto de defeito de N-glicosilação. Enquanto o padrão IEFTF tipo 2 se normaliza rapidamente, uma restauração completa é raramente observada. Dependendo do paciente, a galactose dietética em uma dose de 0,5 a 1,5 g / kg por dia diminuiu os níveis de transaminase sérica e aumentou os fatores de coagulação, especialmente a antitrombina. Alguns pacientes apresentaram um melhor controle endócrino e diminuição da frequência de hipoglicemia e rabdomiólise. Fraqueza muscular e cardiomiopatia parecem não ser afetadas pela intervenção da galactose na deficiência de PGM1. Em alguns pacientes, a uridina foi adicionada, mas o efeito disso ainda não está claro (Tegtmeyer *et al.*, 2014; Morava, 2014; Wong *et al.*, 2017).

CAD-CDG é um distúrbio na biossíntese de pirimidina, importante para a glicosilação através do seu papel na biossíntese de nucleotídeos. Tanto as convulsões severas quanto a anemia microcítica são tratáveis por suplementos orais de uridina (Koch *et al.*, 2017). A uridina é um tratamento eficiente porque é um produto da via defeituosa. A suplementação de monossacarídeos é um tratamento parcial para pacientes individuais em vários outros distúrbios de N-glicosilação. A suplementação de galactose oral melhorou as convulsões e alguns parâmetros

sanguíneos, incluindo a IEF TF em um subconjunto de pacientes com SLC35A2-CDG (Dörre et al., 2015), em TMEM165-CDG melhorou a ocorrência de hemorragias, função endócrina e IEF TF. (Morelle et al., 2017). Tanto a galactose como o manganês melhoraram as isoformas da transferrina e o distúrbio convulsivo no SLC39A8-CDG (Park et al., 2015). O tratamento com manose, galactose, manganês e um possível tratamento com chaperonas para PMM2-CDG é ilustrado na Figura 5 (Péanne et al., 2018).

Além de para MPI-CDG, o transplante de fígado também foi realizado com sucesso parcial em CCDC115-CDG (Jansen et al., 2016a, 2016b). O transplante cardíaco foi bem sucedido em 2 crianças com DOLK-CDG (Kapusta et al., 2013) e o transplante de medula óssea levou à melhora da doença imune em PGM3-CDG (Stray-Pedersen et al., 2014). Outras possíveis abordagens terapêuticas visam sintomas específicos, como hipoglicemia, hipotireoidismo, pericardite.

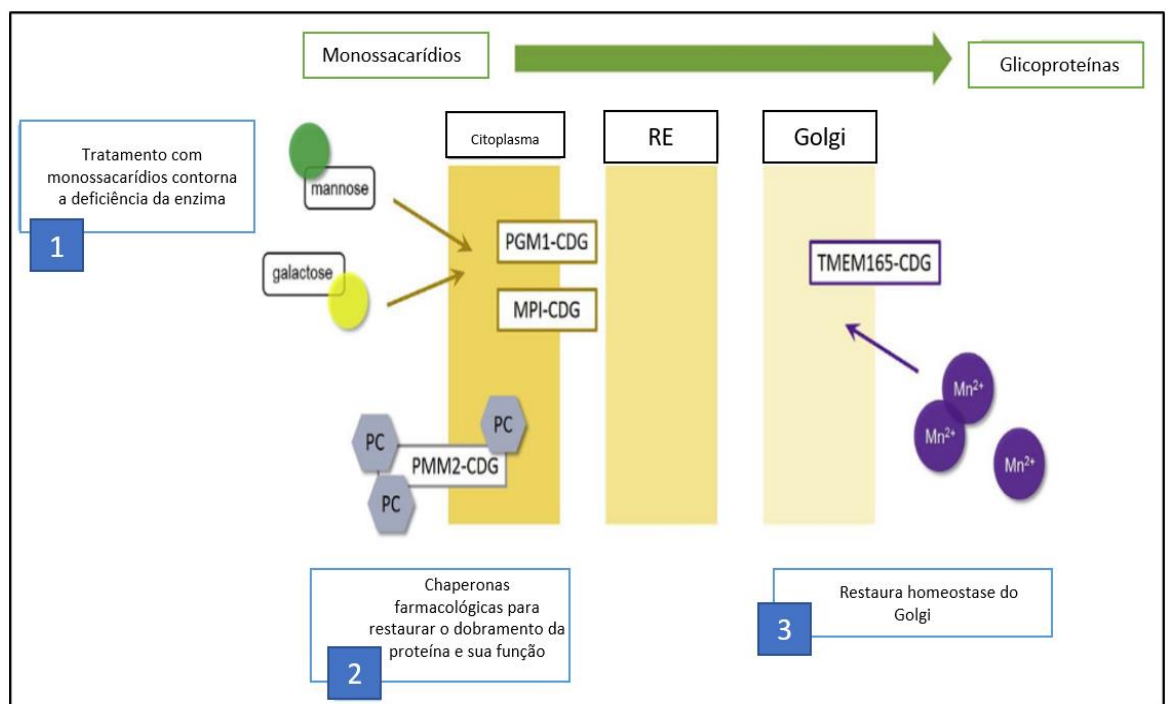


Figura 5. Representação de alguns tratamentos promissores de CDG. Adaptado de Péanne et al., 2018

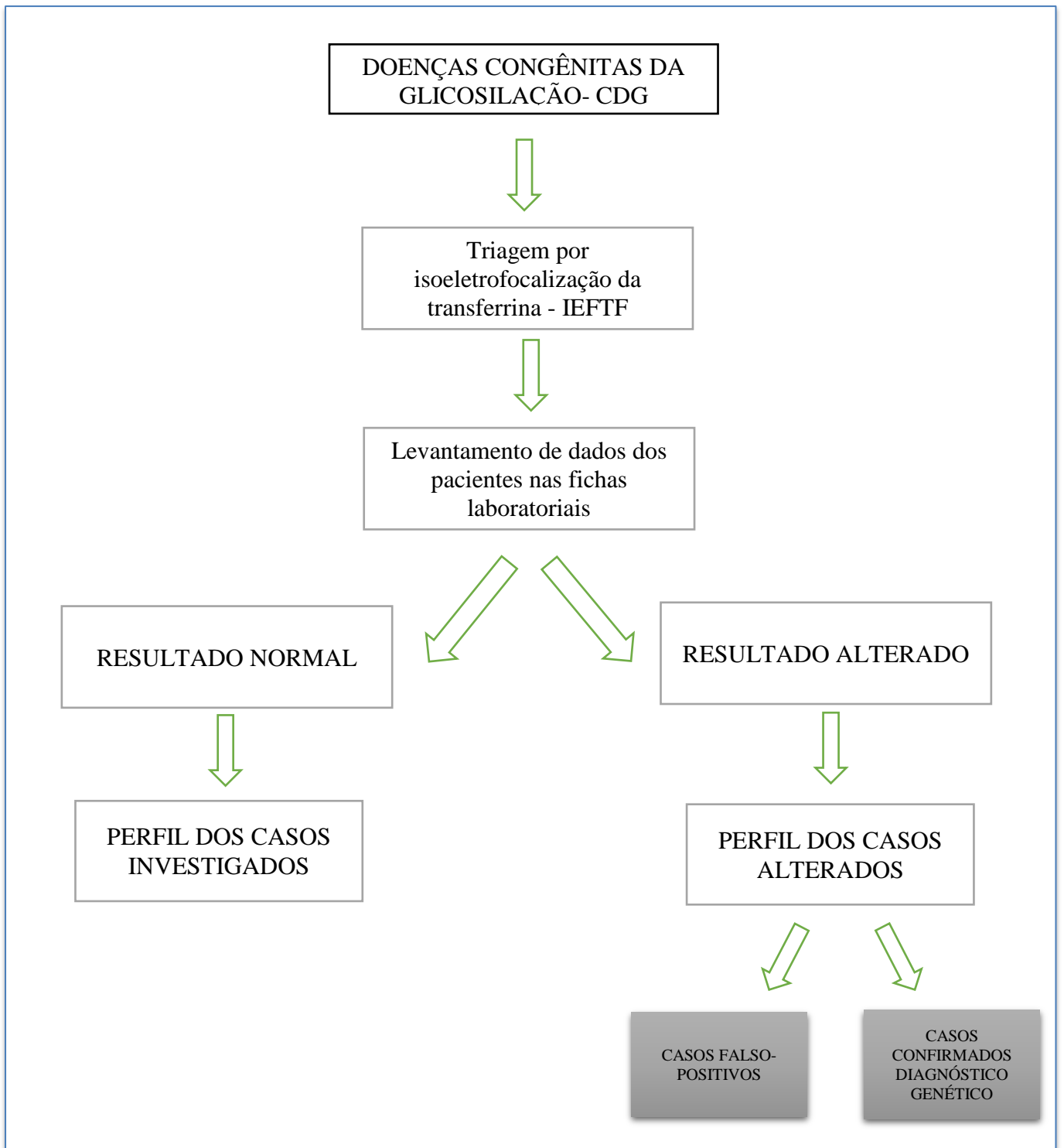


Figura 6. Marco conceitual do presente estudo.

3. JUSTIFICATIVA

As CDGs são um grupo de doenças altamente heterogêneo, e complexo também do ponto de vista de investigação. Esses fatores podem dificultar a suspeição diagnóstica.

No Brasil, o acesso à IEFTF e à análise genética, via SUS, é bastante restrito, sendo o LEIM-HCPA um dos únicos centros SUS que disponibiliza a IEFTF. Por se tratar apenas de um exame de triagem, a verificação do seguimento do protocolo de investigação e a confirmação do diagnóstico do subtipo se fazem altamente necessárias, uma vez que o aconselhamento genético e algumas das opções de tratamento variam de acordo com o subtipo.

Dessa forma, é fundamental o conhecimento do perfil de pacientes investigados via IEFTF no LEIM-HCPA, a fim de que sejam criados subsídios para a tomada de decisão acerca da necessidade de maior educação médica sobre CDG e/ou de implantação de novas técnicas diagnósticas.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar os casos com suspeita de CDGs investigados através do exame de IEFTF no LEIM-SGM no período de 2008 a 2017.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1 Identificar os principais sinais e sintomas que levaram à suspeita de CDG;

4.2.2 Identificar a faixa etária na qual a suspeita de CDG é mais elevada;

4.2.3 Estimar o número mínimo de casos que finalizaram a investigação e que tiveram o diagnóstico de CDG confirmado ou excluído por investigações adicionais;

4.2.4 Identificar a principal causa de resultados alterados que não CDG.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al Teneiji, A.; Bruun, T.U.; Sidky, S et al. Phenotypic and genotypic spectrum of congenital disorders of glycosylation type I and type II. **Molecular Genetics and Metabolism**. v.120(3), p.235–242, 2017.

Ng, B. G., Sosicka, P. , et al. SLC35A2- CDG: Functional Characterization, Expanded Molecular, Clinical, and Biochemical Phenotypes of 30 Unreported Individuals. **Human Mutation**. (2019) Accepted Author Manuscript. doi:[10.1002/humu.23731](https://doi.org/10.1002/humu.23731)

Bouteldja N, Timson DJ. The biochemical basis of hereditary fructose intolerance. **J Inherit Metab Dis**. 2010;33(2):105–12.

Bruneel, A.; Cholet, S.; Drouin-Garraud, V. et al. Complementarity of electrophoretic, mass spectrometric, and gene sequencing techniques for the diagnosis and characterization of congenital disorders of glycosylation. **Electrophoresis**. p.1–10, 2018.

Dörre K, Olczak M, Wada Y, Sosicka P, Grüneberg M, Reunert J, et al. A new case of UDP-galactose transporter deficiency (SLC35A2-CDG): molecular basis, clinical phenotype, and therapeutic approach. **J Inherit Metab Dis**. 2015;38(5):931–40.

Ferreira, C.R.; Devaney, J.M.; Hofherr, S.E.; Pollard, L.M.; Cusmano-Ozog, K. Hereditary fructose intolerance mimicking a biochemical phenotype of mucopolisidosis: A review of the literature of secondary causes of lysosomal enzyme activity elevation in serum. **American Journal of Medical Genetics, Part A**. v. 173(2), p.501–509, 2017.

Francisco, R.; Pascoal, C.; Marques-da-Silva, D. et al. Keeping an eye on congenital disorders of O-glycosylation: a systematic literature review. **Journal of Inherited Metabolic Disease**. p.1–16, 2018.

Hackler, R.; Arndt, T.; Kleine, T.O.; Gressner, A.M. Effect of Separation Conditions on Automated Isoelectric Focusing of Carbohydrate-Deficiency Transferrin and Other Human Iso-transferrins Using the PhastSystem. **Anal Biochem**. v. 230(2), p. 281-289, 1995.

Jaeken, J. Congenital disorders of glycosylation. **Ann N Y Acad Sci.** v. 1214, p. 190-198, 2010.

Jaeken, J.; Péanne, R. What is new in CDG? **J Inherit Metab Dis.** v. 40(4), p. 621-625, 2017.

Janssen MCH, de Kleine RH, Van den Berg AP, Heijdra Y, van Scherpenzeel M, Lefeber DJ, et al. Successful Liver Transplantation and Long-Term Follow-up in a Patient With MPI-CDG. **Pediatrics** [Internet]. 2014;134(1):e279–83. Available from: <http://pediatrics.aappublications.org/cgi/doi/10.1542/peds.2013-2732>

Koch J, Mayr JA, Alhaddad B, Rauscher C, Bierau J, Kovacs-Nagy R, et al. CAD mutations and uridine-responsive epileptic encephalopathy. **Brain.** 2017;140(2):279–86.

Lefeber, D. J.; Morava, E.; Jaeken, J. How to find and diagnose a CDG due to defective N-glycosylation. **J Inherit Mtab Dis.** v. 34(4), p. 849-852, 2011.

Marklová, E.; Albahri, Z. Screening and diagnosis of congenital disorders of glycosylation. **Clin Chim Acta.** v. 385(1-2), p. 6-20, 2007.

Morelle, W.; Potelle, Witters, P. ; Sunnie; Wong, et al. Galactose Supplementation in Patients With TMEM165-CDG Rescues the Glycosylation Defects, **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, Volume 102, Issue 4, 1 April 2017, Pages 1375–1386, <https://doi.org/10.1210/jc.2016-3443>

Park JH, Hoglebe M, Grüneberg M, Duchesne I, Von Der Heiden AL, Reunert J, et al. SLC39A8 Deficiency: A Disorder of Manganese Transport and Glycosylation. **Am J Hum Genet.** 2015;97(6):894–903

Péanne, R.; de Lonlay, P.; Foulquier, F. et al. Congenital disorders of glycosylation (CDG): Quo vadis? **Eur J Med Genet.** v. 61(11), p. 643-663, 2018.

Tegtmeyer LC, Rust S, van Scherpenzeel M, Ng BG, Losfeld M-E, Timal S, et al. Multiple Phenotypes in Phosphoglucomutase 1 Deficiency. **N Engl J Med** [Internet]. 2014;370(6):533–42. Available from:<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1206605>

Van Scherpenzeel, M.; Steenbergen, G.; Morava, E.; Wevers, R.A.; Lefeber, D.J. High-resolution mass spectrometry glycoprofiling of intact transferrin for diagnosis

and subtype identification in the congenital disorders of glycosylation. **Transl Res.** v. 166(6), p. 639-649, 2015.

Van Scherpenzeel, M.; Willems, E.; Lefeber, D.J. Clinical diagnostics and therapy monitoring in the congenital disorders of glycosylation. **Glycoconj J.** v. 33(3), p. 345-358, 2016.

Witters P, Cassiman D, Morava E. Nutritional therapies in congenital disorders of glycosylation (CDG). **Nutrients.** 2017;9(11):1–10.

Wong SY, Gadomski T, Scherpenzeel M Van, Honzik T, Hansikova H, Holmefjord KSB, et al. **HHS Public Access.** 2017;19(11):1226–35.

Wopereis, S.; Grünewald, S.; Huijben, K.M.L.C. et al. Transferrin and apolipoprotein C-III isofocusing are complementary in the diagnosis of N- and O-glycan biosynthesis defects. **Clin Chem.** v.53(2), p. 180-187, 2007.

Zühlsdorf, A.; Park, J. H.; Wada, Y. et al. Transferrin variants: Pitfalls in the diagnostics of Congenital disorders of glycosylation. **Clin Biochem.** v. 48(1-2), p. 11-13, 2015.

6. ARTIGO

ISOELETROFOCALIZAÇÃO DA TRANSFERRINA PARA INVESTIGAÇÃO DAS DOENÇAS CONGÊNITAS DA GLICOSILAÇÃO: ANÁLISE DE DEZ ANOS DE EXPERIÊNCIA DE UM CENTRO BRASILEIRO

Ana Paula Pereira Scholz de Magalhães^{a,b}, Maira Graeff Burin^b, Carolina Fischinger Moura de Souza^b, Fernanda Hendges de Bitencourt^b, Fernanda Medeiros Sebastião^b, Thiago Oliveira Silva^b, Ida Vanessa Doederlein Schwartz^{a,b,c}

a – Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil

b – Serviço de Genética Médica – Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brasil

c – Departamento de Genética - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

Corresponding author:

Ida Vanessa Doederlein Schwartz

E-mail: ischwartz@hcpa.edu.br

Serviço de Genética Médica

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350

CEP 90035-303 – Porto Alegre – RS – Brasil

Fone: 55 51 33598011

O presente artigo será submetido ao Jornal de Pediatria

RESUMO

Introdução: As doenças congênitas da glicosilação (CDG) são doenças genéticas da síntese e processamento dos glicanos das glicoproteínas e glicolipídios. Para a triagem das CDG que envolvem N-glicosilação, é utilizada a isoeletrofocalização da transferrina sérica (IEFTF). *Objetivos:* Caracterizar os casos com suspeita de CDG investigados através do exame de IEFTF no período de 2008 a 2017. *Metodologia:* Estudo observacional, transversal, retrospectivo. Foram revisadas fichas laboratoriais de 1546 pacientes (mediana de idade= 36 meses, IQ 25-75= 10-108; sexo masculino = 810) que realizaram o exame de IEFTF no período. *Resultados:* Cinquenta e um pacientes (3%) apresentaram padrão alterado na IEFTF ($5 \pm 2,8$ casos/ano; mediana de idade = 24 meses, IQ 25-75= 11-57; sexo masculino = 27). Para 14 deles, estavam disponíveis dados sobre a conclusão do diagnóstico (galactosemia clássica= 4; intolerância hereditária à frutose= 4; doenças peroxissomais= 2; PMM2-CDG= 2; MPDU1-CDG= 1; SLC35A2-CDG= 1). Comparando os casos com padrão normal e alterado na IEFTF, houve maior prevalência de casos alterados na faixa etária de 11 meses a 3 anos. A ocorrência de mamilos invertidos, hepatopatia, hipoglicemia alterações oftalmológicas e recorrência familiar aumentaram em 11x, 4,6x, 2,9x, 2,8x e 2,5x a probabilidade de alteração na IEFTF, respectivamente. *Conclusões:* Os nossos dados sugerem que a investigação de um caso com suspeita de CDG é complexa, sendo agravada pela existência de outros EIM associados a padrão alterado na IEFTF e pela falta de acesso a exames confirmatórios. A presença de mamilos invertidos e de hepatopatia deve sugerir a necessidade de investigação por IEFTF.

Palavras chave: Isoeletrofocalização; Transferrina; Doenças Congênitas da Glicosilação; triagem

CONTAGEM DE PALAVRAS - RESUMO: 263

INTRODUÇÃO

As doenças congênitas da glicosilação (CDG) são doenças genéticas da síntese e processamentos dos glicanos das glicoproteínas e glicolipídios, de herança autossômica recessiva em sua maioria, caracterizadas pela deficiência total ou parcial de proteínas envolvidas na glicosilação de proteínas ou lipídios. [1]

Há dois tipos principais de glicosilação de proteínas: N-glicosilação e O-glicosilação. A N-glicosilação (ligação de N-glicanos ao grupo amino de asparaginas) compreende uma etapa de montagem e uma etapa de processamento que se estende através de três compartimentos distintos: citoplasma, retículo endoplasmático e complexo de Golgi. A O-glicosilação (ligação de O-glicanos a grupos hidroxila de treoninas ou serinas) não apresenta etapa de processamento, e consiste apenas na etapa de montagem. [2] Dessa forma, existem CDG que envolvem N-glicosilação somente, O-glicosilação somente ou ambas. Estima-se que 94% dos pacientes com CDG apresentem defeitos de N-glicosilação, sendo os mais frequentes a PMM2-CDG (antiga CDG Ia) e a ALG6- CDG (antiga CDG Ic). [3]

Desde a primeira descrição clínica em 1980, mais de 100 tipos de CDG foram identificados (tabela 1) [3]. As manifestações clínicas podem aparecer ainda na gestação, como a hidropisia fetal não-imune, microcefalia, malformações congênitas e dismorfias faciais; em neonatos e na infância, podem ser encontrados hipoplasia cerebelar, mamilos invertidos, estrabismo, movimentos oculares anormais, retardo de desenvolvimento neuropsicomotor (RDNPM), hipotonia, ataxia, hiporreflexia, convulsões, anorexia, vômitos, diarreia, defeitos do sistema imunológico, hipogonadismo, lipodistrofia, hepatomegalia, cifose, escoliose e cardiomiopatia. Podem também ocorrer fenótipos mais leves, sem dismorfias e com RNDPM leve. Recomenda-se, portanto, que a hipótese de CDG seja considerada em qualquer caso de síndrome inexplicada [4].

Em relação ao diagnóstico, a isoeletrofocalização de transferrina (IEFTF) é um teste de triagem para CDGs que envolvem N-glicosilação, pois a transferrina é N-glicosilada. A IEFTF, nesses casos, mostra um deslocamento catódico como consequência da deficiência parcial de ácido siálico. [5]. A técnica detecta dois padrões de alteração, padrão de alteração do tipo 1, associado principalmente a defeitos relacionados ao retículo endoplasmático (antigamente denominados CDG

do tipo I), e o padrão do tipo 2, associado, por sua vez, a defeitos relacionados ao sistema Golgi (antigamente denominados CDG do tipo II) [2]. No Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul (RS), Brasil (LEIM-HCPA), a IEFTF é o único exame realizado para investigação de CDG. O método utilizado foi adaptado daquele descrito em 1995 por Hackler, Rolf & Kleine.. Os casos alterados da IEFTF, ou com suspeita de defeitos de O-glicosilação, devem seguir a investigação para fins de confirmação diagnóstica, seja por ensaios enzimáticos, análises de espectrometria de massa (ESI/MS, MALDI-TOF) ou análise genética. Frisa-se que várias condições além de CDG estão associadas a resultados alterados na IEFTF como galactosemia, intolerância hereditária à frutose, hepatopatias, uso crônico e abusivo de álcool, infecções por microrganismos produtores de neuraminidase e polimorfismos da transferrina. [5;9;12;18;19;20]

O objetivo deste estudo foi caracterizar os casos triados pela IEFTF, no período de 2008 a 2017, no LEIM-HCPA.

METODOLOGIA

Trata-se de um estudo observacional transversal retrospectivo de pacientes investigados por IEFTF no LEIM-HCPA, no período de 2008 a 2017. Foram coletadas e analisadas informações de fichas laboratoriais dos mesmos. O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética do HCPA com o número 18-0324.

Coleta de dados

A coleta de dados ocorreu por meio de revisão das fichas do LEIM-HCPA. Os seguintes dados foram considerados: data da realização da IEFTF, idade do paciente no momento da mesma, sexo, local de origem, resultado obtido na IEFTF, sinais e sintomas, e informações de histórico familiar. Além disso, para os casos de IEFTF alterados, se houve confirmação do diagnóstico de CDG ou de outra doença mediante realização de exames complementares. Para os pacientes provenientes do HCPA, também foi realizada uma revisão de prontuário eletrônico dos pacientes com resultados alterados. Foram consideradas como não existentes as informações pertinentes a esse estudo que não constavam na ficha laboratorial ou no prontuário eletrônico dos pacientes.

Análise estatística

Os bancos de dados foram construídos em Microsoft Office Excel 2010 e para a análise estatística foi utilizado o programa SPSS 18.0. Os aspectos descritivos foram apresentados nas formas de frequências, médias, desvios-padrão, medianas e quartis.

As variáveis foram analisadas de acordo com o resultado obtido na IEFTF: padrão normal ou alterado. Para esta análise, utilizaram-se teste exato de Qui-Quadrado, análises residuais, razão de prevalência bruta e razão de prevalência ajustada (regressão de Poisson robusta múltipla). Para a análise da idade dos pacientes foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Os grupos com resultado normal e alterado de IEFTF foram comparados em relação às variáveis analisadas.

Foram consideradas estatisticamente significantes, todas as análises com valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

No período de 2008 a 2017, 1546 pacientes realizaram a IEFTF, sendo 566 (37%), pacientes provenientes do RS e 980 (63%) de outros estados do Brasil (Santa Catarina/Paraná: 4%; região Sudeste 48%, Nordeste 5%, Centro-Oeste 4%, Norte 2%). A média anual dos casos investigados foi de 156 ± 49 /casos por ano e desses, $5 \pm 2,8$ casos/ano com IEFTF alterada. O maior número de casos investigados foi em 2012 (246) e em 2017 o maior número de casos alterados (11). (Figura 1). Cinquenta e um pacientes (3%; RS= 23) apresentaram alteração no exame IEFTF. Destes, 14 (28%) tiveram a investigação concluída (RS= 11), sendo que quatro pacientes (RS= 3) chegaram ao diagnóstico confirmatório de CDG por análise genética (MPDU1-CDG= 1, SLC35A2-CDG= 1, PMM2-CDG= 2). Para os casos restantes, exames complementares permitiram a exclusão de CDG e o diagnóstico confirmatório de outras doenças: galactosemia clássica (n= 4, todos confirmados por meio da medida da atividade da Gal1PUT), intolerância hereditária à frutose (n= 4, todos confirmados por análise genética) e dois casos de doença peroxissomal (ambos confirmados por medida de ácidos graxos de cadeia muito longa). Para os 37 casos restantes, não foi possível a obtenção de informações

adicionais acerca da conclusão diagnóstica. Considerando apenas os casos do RS, dos 566 casos investigados por IEFTF, 23 apresentaram padrão alterado (4%) e 11/23 (48%) tiveram o diagnóstico de alguma doença confirmado (CDG= 3/11 ou 27%). A tabela 2 apresenta o perfil completo dos pacientes incluídos no estudo.

A faixa etária de 11 a 36 meses foi a que apresentou a maior prevalência de resultados alterados - 48% dos pacientes que apresentaram resultado alterado encontram-se nessa faixa de idade.

A manifestação clínica mais comum nos casos investigados foi RDNPM, seguido de convulsões, hipotonia, deficiência intelectual e dismorfias. Porém, os sintomas mais associados a alterações na IEFTF foram: hipotonia, hepatopatia, hepatomegalia, alterações oftalmológicas, recorrência familiar, mamilos invertidos e hipoglicemia (Tabela 2). De acordo com a regressão de Poisson robusta múltipla, o sinal mais associado a uma alteração na IEFTF é o de mamilos invertidos (razão de prevalência ajustada=11), seguido de hepatopatia, hipoglicemia, alterações oftalmológicas e recorrência familiar. (Tabela 2).

DISCUSSÃO

CDGs têm sido descritas como um grande desafio diagnóstico, uma vez que, nesse conjunto de doenças, quase todos os órgãos são acometidos e uma grande variedade de sintomas já foi descrita. Sendo assim, a recomendação é considerar CDG em qualquer caso de doença não explicada, principalmente quando há presença de sintomas neurológicos [7]. No Brasil, um outro fator que contribui para a dificuldade diagnóstica é a dificuldade de acesso a exames confirmatórios. Dentro deste contexto, os dados sugerem que existe subdiagnóstico de CDG no Brasil, e que esforços devem ser realizados para a implementação dos testes diagnósticos.

O protocolo de investigação para CDG estabelecido no HCPA não contempla uma investigação completa para a doença, uma vez que somente a IEFTF é oferecida. O protocolo ideal sugerido por Péanne e colaboradores (2018) prevê o sequenciamento do gene *PMM2* para os casos alterados com padrão de CDG tipo I, uma vez que esses são os casos mais frequentes de CDG. Se o sequenciamento não evidenciar anormalidade, uma análise de painel com genes específicos para

CDG e, em caso de resultado negativo, o sequenciamento completo do exoma é indicado. [3]

Apesar das CDG serem doenças genéticas raras, existe uma demanda significativa de pacientes com suspeita da doença, como pode ser visto pela média anual de casos investigados por IEFTF no LEIM-HCPA. Entretanto, o número de casos confirmados foi pequeno (apenas 4 pacientes em dez anos), o que sugere a ocorrência de um subdiagnóstico dessas doenças em nosso país, ainda mais considerando que frequência estimada para PMM2-CDG que vem ser a CDG mais comum, é de cerca de 1 / 20.000 RN [8].

Nosso estudo mostrou, também, que galactosemia clássica e intolerância hereditária à frutose são causas frequentes de alterações na IEFTF. Galactosemia tem sido referida como um segundo tipo de defeito de glicosilação [5,9]. A literatura aponta que há anormalidades na glicosilação de N-glicanos na transferrina sérica em neonatos com galactosemia não-tratados. Essas anormalidades, em sua grande parte, são resolvidas com o tratamento dietético com restrição de galactose [9,10,11]. Outra doença que pode acarretar em hipoglicosilação das isoformas de transferrina é a intolerância hereditária à frutose. É causada por uma deficiência na atividade da enzima aldolase B, conseqüentemente, a frutose-1P é acumulada em células hepáticas, acarretando na inibição da atividade da fosfomanose isomerase, enzima presente nas primeiras etapas da glicosilação de proteínas. [12] [13]

Por outro lado, tendo-se em consideração que o fígado é um dos principais locais de glicosilação no corpo, e também responsável pela produção da maioria das proteínas séricas glicosiladas, defeitos de glicosilação estão associados a sintomas clínicos hepáticos, os quais estão presentes em torno de 20% dos casos de CDG. [14]. Nosso estudo corrobora esses achados, visto que as hepatopatias apresentam forte associação com alterações no padrão da IEFTF (pacientes com hepatopatia possuem 4,6x mais chances de apresentarem uma alteração na IEFTF do que pacientes sem esse sintoma). Hepatopatias estão associadas a resultados alterados na IEFTF, porém essa alteração pode não estar diretamente associada às CDG, e, sim, a outros EIM que afetam o fígado, como as doenças peroxissomais, onde em nosso estudo podemos identificar dois casos com alteração da IEFTF.

Nossos dados mostram que a presença de mamilos invertidos apresentou o maior índice de associação com a alteração da IEFTF. Mamilos invertidos estão geralmente presentes em pacientes com CDG ao nascimento, podendo voltar à posição normal em poucos dias ou semanas de vida. Entretanto, a persistência do achado na vida adulta pode ocorrer. É importante salientar, no entanto, que a lista de síndromes associadas a mamilos invertidos é extensa, incluindo, como por exemplo, síndrome de Turner, de Smith-Lemli-Optiz e de Robinow, entre outras, porém, também pode ser observado em indivíduos normais. No caso das CDG, os mamilos invertidos são encontrados com maior frequência em pacientes com defeitos de N-glicosilação. [15]

Com relação às limitações do estudo, é importante mencionar que o mesmo está baseado em informações clínicas presentes nos prontuários dos pacientes com suspeita de CDG. Outra limitação importante, com relação aos pacientes provenientes de outras regiões do país, é que após a liberação do laudo aos serviços de origem do paciente, não temos informações do seguimento que esses pacientes tiveram após o resultado do exame, ou seja, se o paciente concluiu a investigação ou não.

CONCLUSÃO

Com este estudo, constata-se a necessidade da implementação de novas técnicas para diagnóstico de CDG, e o estabelecimento de um protocolo mais completo para a investigação das CDG no LEIM-HCPA. Os achados mostram que, apesar de alterações na IEFTF terem sido reportadas em 51 casos, apenas quatro pacientes tiveram diagnóstico confirmado para CDG.

Os dados obtidos também mostram que os principais sintomas que levaram à suspeita de CDG foram: RDNPM, seguido de convulsões, hipotonia, deficiência intelectual e dismorfias. No entanto, os pacientes que apresentarem mamilos invertidos, hepatopatia, hipoglicemia, alterações oftalmológicas e a presença de outros casos na família, foram os que tiveram maior probabilidade de ter IEFTF alterada; dessa forma, a triagem para CDG deve ser especialmente considerada quando houver a presença dessas manifestações clínicas.

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer aos colegas Zeniara Lompa, Régis Guidobono, Karen Lucas e Tânia Braga, funcionários do Serviço de Genética Médica do HCPA, pelo apoio no estudo. Somos gratos também ao apoio financeiro fornecido pelo FIPE-HCPA.

CONTAGEM DE PALAVRAS - ARTIGO: 2.013 palavras

REFERÊNCIAS

- [1] Al Teneiji A, Bruun TUJ, Sidky S, Cordeiro D, Cohn RD, Mendoza-Londono R, et al. Phenotypic and genotypic spectrum of congenital disorders of glycosylation type I and type II. **Mol Genet Metab.** 2017;120(3):235–42.
- [2] Jaeken J. Congenital disorders of glycosylation. **Ann N Y Acad Sci.** 2010;1214(1):190–
- [3] Péanne R, de Lonlay P, Foulquier F, Kornak U, Lefeber DJ, Morava E, et al. Congenital disorders of glycosylation (CDG): Quo vadis? **Eur J Med Genet.** 2018;61(11):643–63.
- [4] Marklová E, Albahri Z. Screening and diagnosis of congenital disorders of glycosylation. **Clin Chim Acta.** 2007;385(1–2):6–20.
- [5] Jaeken J; Carchon H. The carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes: an overview. **J Inherit Metab Dis.** 1993, 16:813–820.
- [6] Hackler, R, Kleine TO. Effect of Separation Conditions on Automated Isoelectric Focusing of Carbohydrate-Deficiency Transferrin and Other Human Iso-transferrins Using the PhastSystem. **Anal Biochem.** 1995; 281–9.
- [7] Jaeken J. Congenital disorders of glycosylation (CDG): it's (nearly) all in it!. **J Inherit Metab Dis.** 2011; 34:853–858.
- [8] Morava E. Reports Book [Internet]. **J Inherit Metab Dis** Vol. 28. 2012. 53-59 p. Available from: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-3-662-43751-3.pdf>
- [9] Quintana E, Sturiale L, Montero R, Andrade F, Fernandez M, Couce ML, Barone R, Aldamiz-Echevarria L, Ribes A, Artuch R, Briones P. Secondary disorders of glycosylation in inborn errors of fructose metabolism. **J Inherit Metab Dis.** 2009; 32(4):S273–8.

- [10] Charlwood J, Clayton P, Keir G, Mian N, Winchester B. Defective galactosylation of serum transferrin in galactosemia. **Glycobiology**. 1998; 8, 351–357.
- [11] Sturiale L, Barone R, Fiumara A, Perez M, Zaffanello M, Sorge G, et al. Hypoglycosylation with increased fucosylation and branching of serum transferrin N-glycans in untreated galactosemia. **Glycobiology**. 2005; 15(12):1268–76.
- [12] Adamowicz M, Płoski R, Rokicki D, Morava E, Gizewska M, Mierzewska H, et al. Transferrin hypoglycosylation in hereditary fructose intolerance: using the clues and avoiding the pitfalls. **J Inherit Metab Dis**. 2007; 30(3):407.
- [13] Bouteldja N, Timson DJ. The biochemical basis of hereditary fructose intolerance. **J Inherit Metab Dis**. 2010;33(2):105–12.
- [14] Marques-da-Silva D, dos Reis Ferreira V, Monticelli M, Janeiro P, Videira PA, Witters P, et al. Liver involvement in congenital disorders of glycosylation (CDG). A systematic review of the literature. **J Inherit Metab Dis**. 2017; 40(2):195–207.
- [15] Rymen D, Jaeken J. Skin manifestations in CDG. **J Inherit Metab Dis**. 2014;37(5):699–708.
- [16] Francisco R, Marques-da-Silva D, Brasil S, Pascoal C, dos Reis Ferreira V, Morava E, et al. The challenge of CDG diagnosis. **Mol Genet Metab**. 2018; Nov 9:S1096-7192.
- [17] Francisco R, Pascoal C, Marques-da-Silva D, Morava E, Gole GA, Coman D, et al. Keeping an eye on congenital disorders of O-glycosylation: a systematic literature review. **J Inherit Metab Dis**.; 2018;1–16.
- [18] Zühlendorf, A.; Park, J. H.; Wada, Y. et al. Transferrin variants: Pitfalls in the diagnostics of Congenital disorders of glycosylation. **Clin Biochem**. v. 48(1-2), p. 11-13, 2015.
- [19] Jaeken, J.; Péanne, R. What is new in CDG? **J Inherit Metab Dis**. v. 40(4), p. 621-625, 2017.

[20] Ferreira, C.R.; Devaney, J.M.; Hofherr, S.E.; Pollard, L.M.; Cusmano-Ozog, K. Hereditary fructose intolerance mimicking a biochemical phenotype of mucopolipidosis: A review of the literature of secondary causes of lysosomal enzyme activity elevation in serum. **American Journal of Medical Genetics, Part A.** v. 173(2), p.501–509, 2017.

TABELA 1: Exemplos de doenças congênitas da glicosilação (CDG) descritas de acordo com sua localização celular e as diferentes vias de glicosilação.

LOCALIZAÇÃO CELULAR	VIAS DE GLICOSILAÇÃO							
	N-Glicosilação		O-Glicosilação	Lipídica/Glicosilfosfatidilinositol		Múltiplas/Outras Vias	O-Manosilglicano	
CITOPLASMA	GMPPA-CDG GMPPB-CDG MPI-CDG PMM2-CDG		EOGT-CDG			DHDDS-CDG CAD-CDG GFPT1-CDG GNE-CDG	NANS-CDG PGM1-CDG PGM3-CDG CPS2-CDG	---
RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO	ALG1-CDG ALG2-CDG ALG3-CDG ALG6-CDG ALG8-CDG ALG9-CDG ALG11-CDG ALG12-CDG ALG13-CDG ALG14-CDG DDOST-CDG	DPAGT1-CDG MOGS-CDG GANAB-CDG PRKCSH-CDG PRKCSH-CDG RFT1-CDG STT3A-CDG STT3B-CDG SSR3-CDG SSR4-CDG TUSC3-CDG	SLC35D1-CDG POGLUT1-CDG	PIGA-CDG PIGC-CDG PIGG-CDG PIGL-CDG PIGM-CDG PIGN-CDG PIGO-CDG	PIGQ-CDG PIGT-CDG PIGV-CDG PIGW-CDG PIGY-CDG PGAP1-CDG	DOLK-CDG NUS1-CDG SRD5A3-CDG DPM1-CDG DPM2-CDG DPM3-CDG MPDU1-CDG ATP6AP1-CDG TRAPPC11-CDG	---	
GOLGI	MAN1B1-CDG MGAT2-CDG		B4GALT7-CDG B3GALT6-CDG B3GAT3-CDG CHSY1-CDG EXT1-CDG EXT2-CDG B3GALT1-CDG	XYLT1-CDG XYLT2-CDG GALNT3-CDG LFNG-CDG POFUT1-CDG	B4GALNT1-CDG ST3GAL5-CDG PGAP2-CDG PGAP3-CDG	B4GALT1-CDG ST3GAL3-CDG SLC35A1-CDG SLC35A2-CDG SLC35A3-CDG SLC35C1-CDG COG1-CDG COG2-CDG	COG4-CDG COG5-CDG COG6-CDG COG7-CDG COG8-CDG ATP6VOA2-CDG TIMEM165-CDG VPS138-CDG	---
ERGIC*	---	---	---	---	---	SEC23B-CDG CCDC115-CDG TMEM199-CDG	---	
MEMBRANA PLASMÁTICA	---	---	---	---	---	SLC39A8-CDG	---	
MAMBRANA DO SARCOLEMA	---	---	---	---	---	---	B3GALNT2-CDG FKTN-CDG FKRP-CDG ISPD-CDG LARGE-CDG POMGNT1-CDG POMT1-CDG POMT2-CDG TMEM5-CDG POMK-CDG	

A nomenclatura das CDGs segue com o nome do gene onde ocorre a mutação hifenizado com CDG.

*ERGIC=Compartimento intermediário do Retículo Endoplasmático-Golgi; Fonte dos dados: Jaeken & Péanne, 2017; Francisco et al., 2018

Tabela 2: Resumo dos casos avaliados por isoeletrofocalização da transferrina em soro no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (2008-2017)

Manifestações Clínicas	TOTAL DE CASOS INVESTIGADOS (n=1.546)	IEFTF Padrão normal (n=1.495)	IEFTF Padrão alterado (n=51)	p*	Razão de Prevalência Bruta (intervalo de confiança)	Razão de Prevalência Ajustada (intervalo de confiança)
Mediana de Idade (meses) (IQ 25 – 75)	36 (10 – 108)	36 (10 - 108)	24 (11 - 57)	0,151	-	-
Sexo maculino (n=1536**)	810 (53%)	783 (52%)	27 (54%)	0,954	0,9 (0,5 ; 1,6)	-
RDNPM	625 (40%)	598 (40%)	27 (53%)	0,12	1,6 (0,9 ; 2,7)	-
Convulsões	412 (27%)	403 (27%)	9 (18%)	0,12	0,5 (0,25 ; 1,1)	-
Hipotonia	326 (21%)	307 (20%)	19 (37%)	0,01	2,3 (1,3 ; 4,0)	-
Deficiência Intelectual	317 (20%)	302 (20%)	15 (30%)	0,13	1,7 (0,9 – 3,0)	-
Dismorfias	302 (20%)	293 (20%)	9 (18%)	0,65	0,8 (0,4 ; 1,6)	-
Dificuldades alimentares	214 (14%)	206 (14%)	8 (16%)	0,81	1,2 (0,6 ; 2,5)	-
Hepatomegalia	153 (10%)	139 (9%)	14 (27%)	<0,001	3,5 (1,9 ; 6,5)	-
Hepatopatia	131 (8%)	113 (7,5%)	18 (35%)	<0,001	6,1 (3,5 ; 10)	4,6 (2,5 ; 8,7)
Recorrência Familiar	115 (7%)	104 (6,9%)	11 (22%)	0,001	3,5 (1,8 ; 6,7)	2,5 (1,3 ; 5,1)
Ataxia	107 (7%)	100 (6,7%)	7 (14%)	0,08	2,2 (1,0 ; 4,7)	-
Consanguinidade dos Pais	97 (6%)	94 (6,3%)	3 (6%)	1	0,9 (0,3 ; 3,0)	-
Alterações Oftalmológicas	93 (6%)	81 (5,4%)	12 (24%)	<0,001	4,9 (2,7 ; 9,1)	2,8 (1,3 ; 6)
Microcefalia	66 (4%)	65 (4,3%)	1 (2%)	0,72	0,4 (0,06 ; 3,3)	-
Hipoglicemia	60 (4%)	53 (3,5%)	7 (14%)	0,003	4,0 (1,9 ; 8,6)	2,9 (1,3 ; 6,9)
Atrofia/Hipoplasia cerebelar	43 (3%)	38 (2,5%)	5 (10%)	0,01	3,9 (1,6 ; 9,3)	-
Cardiomiopatia	42 (3%)	41 (2,7%)	1 (2%)	1	0,7 (0,1 ; 5,2)	-
Hidropsia Fetal Não-Imune	22 (1,4%)	21 (1,4%)	1 (2%)	0,52	1,4 (0,2 ; 9,8)	-
Mamilos Invertidos	17 (1%)	9 (0,6%)	8 (16%)	<0,001	17 (9,5 ; 31)	11 (4,2 ; 29)
Alterações esqueléticas	9 (0,6%)	8 (0,5%)	1 (2%)	0,26	3,5 (0,5 - 22)	-

*comparação realizada entre os casos com padrão normal e padrão alterado na IEFTF ** 10 casos que não tiveram o sexo do paciente informado, IEFTF= isoeletrofocalização da Transferrina; M= sexo masculino; RDNPM = Retardo do Desenvolvimento Neuropsicomotor.

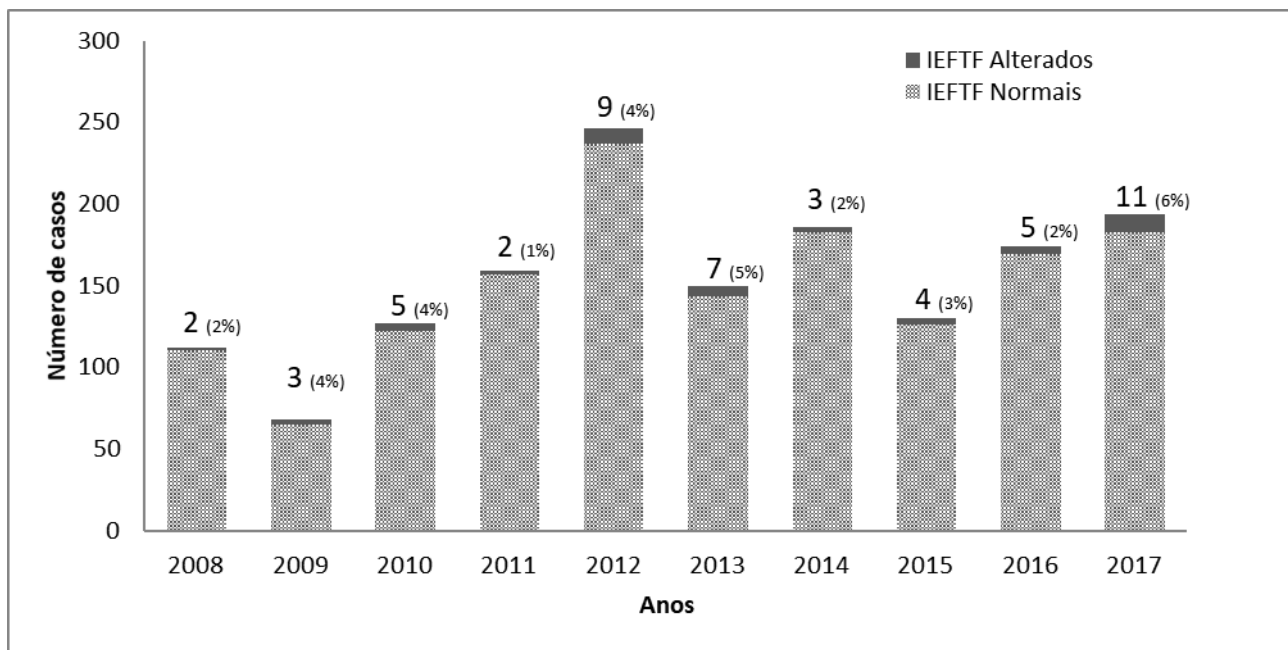


Figura 1. Gráfico representando o número de casos que realizaram isoletrofocalização da transferrina (IEFTF) por ano no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Em destaque o número de casos alterados por ano e sua porcentagem.

7. CONCLUSÕES

As conclusões serão apresentadas em relação aos **objetivos específicos**:

a) Identificar os principais sinais e sintomas que levaram à suspeita de CDG

Os principais sintomas que levaram à suspeita de CDG foram: RDNPM, convulsões, hipotonia, deficiência intelectual e dismorfias. A presença de mamilos invertidos, hepatopatias, hipoglicemia, alterações oftalmológicas e recorrência familiar estão associados à ocorrência de padrão alterado na IEFTF.

b) Identificar a faixa etária na qual a suspeita de CDG é mais elevada;

A média de idade dos pacientes na investigação foi de 78 meses. A faixa etária de 11 a 36 meses é a que mostrou maior prevalência de alteração de IEFTF.

c) Estimar o número mínimo de casos que finalizaram a investigação e que tiveram o diagnóstico de CDG confirmado ou excluído por investigações adicionais;

Os achados mostram que, apesar de alterações na IEFTF terem sido reportadas em 51 casos, apenas quatro pacientes tiveram diagnóstico confirmado para CDG. Considerando os casos oriundos do RS=566, (23 ou 4%) apresentaram IEFTF alterada, sendo que 3/23 (13%) eram casos de CDG e 11/23 (48%) de outras doenças.

d) Identificar a principal causa de resultados alterados que não CDG.

Verificou-se que galactosemia e intolerância hereditária à frutose são doenças que entram no diagnóstico diferencial de CDG, principalmente devido à similaridade de sintomas com CDG e às alterações no padrão de glicosilação acarretada por ambas.

8. PERSPECTIVAS

Espera-se que os dados desse estudo possam abrir a possibilidade de implementação de novas técnicas para o diagnóstico definitivo do tipo de CDG no LEIM-HCPA, estabelecendo um protocolo de investigação mais completo, e direcionando os pacientes para um tratamento mais adequado.

Planeja-se, também, realizar um segundo projeto de pesquisa onde será feito contato com as equipes médicas dos pacientes provenientes de fora do HCPA, a fim de serem obtidas informações sobre a conclusão da investigação.

ANEXO I – CARTA DE APROVAÇÃO DE PROJETO



HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

Grupo de Pesquisa e Pós Graduação

Carta de Aprovação

Projeto

2018/0324

Pesquisadores:

IDA VANESSA DOEDERLEIN SCHWARTZ

FERNANDA HENDGES DE BITENCOUR FERNANDA MEDEIROS SEBASTIÃO CAROLINA FISCHINGER MOURA D...

ANA PAULA PEREIRA SCHOLZ DE... MAIRA GRAEFF BURIN

Número de Participantes: 1600

Título: ISOELETROFOCALIZAÇÃO DA TRANSFERRINA EM SORO PARA INVESTIGAÇÃO DAS DOENÇAS CONGÊNITAS DA GLICOSILAÇÃO: PERFIL DOS CASOS INVESTIGADOS PELO LABORATÓRIO DE ERROS INATOS DO METABOLISMO DO SERVIÇO DE GENÉTICA MÉDICA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.

- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG).

ANEXO II – FORMULÁRIO DE DADOS DOS PACIENTES

FORMULÁRIO DE DADOS

Projeto: **CARACTERIZAÇÃO DOS CASOS ALTERADOS DA ISOELETROFOCALIZAÇÃO DA TRANSFERRINA EM SORO DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS PELO LABORATÓRIO DE ERROS INATOS DO METABOLISMO DO SERVIÇO DE GENÉTICA MÉDICA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE**
Local de realização: Serviço de Genética Médica do HCPA

Número SGM: _____

Formulário preenchido por: _____ Data: ____/____/____

Dados da Ficha do Paciente

Data de nascimento: ____/____/____ Idade : _____ Sexo: **1-F 2-M**

Origem do paciente: Cidade/Estado: _____

Contato Médico/Serviço de origem

Nome: _____

Cidade/Estado: _____ Telefone: () _____

E-mail: _____

ISOELETROFOCALIZAÇÃO DA TRANSFERRINA NO SORO

- DATA DA SOLICITAÇÃO ____/____/____

- RESULTADO: **1 - PADRÃO NORMAL 2 - PADRÃO ALTERADO**

SINAIS E SINTOMAS DO PACIENTE

HEPATOPATIAS	1- Sim	2- Não
CARDIOMIOPATIAS	1- Sim	2- Não
HEPATOMEGALIA	1- Sim	2- Não
HIPOGLICEMIA	1- Sim	2- Não
DISMORFIAS	1- Sim	2- Não
MAMILOS INVERTIDOS	1- Sim	2- Não
ALTERAÇÕES ESQUELETICAS	1- Sim	2- Não
RDNPM	1- Sim	2- Não
DEFICIENCIA INTELECTUAL	1- Sim	2- Não
MICROCEFALIA	1- Sim	2- Não
DIFICULDADES ALIMENTARES	1- Sim	2- Não
HIPOTONIA	1- Sim	2- Não
ATAXIA	1- Sim	2- Não
CONVULSÕES	1- Sim	2- Não
ATROFIA CEREBELAR	1- Sim	2- Não
ALTERAÇÕES OFTALMOLOGICAS	1- Sim	2- Não

HISTÓRIA DO PACIENTE:

- Filho de casal consanguíneo? 1- Sim 2- Não

- Outros casos na família? Quais? 1- Sim 2- Não

- Diagnóstico confirmado de CDG? **2- Não 1- Sim**

Qual? _____ Método: _____

- Possui outros exames do SGM com alterações: **2- Não 1- Sim**

Tem diagnóstico confirmado de outra doença que não CDG? **2 - Não 1- Sim.** Qual? _____

STROBE Statement—Checklist of items that should be included in reports of *cross-sectional studies*

	Item No	Recommendation	Page No
Title and abstract	1	(a) Indicate the study's design with a commonly used term in the title or the abstract	1-6
		(b) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found	5-6
Introduction			
Background/rationale	2	Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported	13-30
Objectives	3	State specific objectives, including any prespecified hypotheses	30
Methods			
Study design	4	Present key elements of study design early in the paper	37
Setting	5	Describe the setting, locations, and relevant dates, including periods of recruitment, exposure, follow-up, and data collection	38
Participants	6	(a) Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants	38
Variables	7	Clearly define all outcomes, exposures, predictors, potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable	38
Data sources/ measurement	8*	For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe comparability of assessment methods if there is more than one group	38
Bias	9	Describe any efforts to address potential sources of bias	38
Study size	10	Explain how the study size was arrived at	38
Quantitative variables	11	Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen and why	38
Statistical methods	12	(a) Describe all statistical methods, including those used to control for confounding	38
		(b) Describe any methods used to examine subgroups and interactions	38
		(c) Explain how missing data were addressed	38
		(d) If applicable, describe analytical methods taking account of sampling strategy	38
		(e) Describe any sensitivity analyses	38
Results			
Participants	13*	(a) Report numbers of individuals at each stage of study—eg numbers potentially eligible, examined for eligibility, confirmed eligible, included in the study, completing follow-up, and analysed	39
		(b) Give reasons for non-participation at each stage	39
		(c) Consider use of a flow diagram	39
Descriptive data	14*	(a) Give characteristics of study participants (eg demographic, clinical, social) and information on exposures and potential confounders	39
		(b) Indicate number of participants with missing data for each variable of interest	39
Outcome data	15*	Report numbers of outcome events or summary measures	39
Main results	16	(a) Give unadjusted estimates and, if applicable, confounder-adjusted estimates and their precision (eg, 95% confidence interval). Make clear which confounders were adjusted for and why they were included	39
		(b) Report category boundaries when continuous variables were categorized	39

		(c) If relevant, consider translating estimates of relative risk into absolute risk for a meaningful time period	39
Other analyses	17	Report other analyses done—eg analyses of subgroups and interactions, and sensitivity analyses	39
Discussion			
Key results	18	Summarise key results with reference to study objectives	37
Limitations	19	Discuss limitations of the study, taking into account sources of potential bias or imprecision. Discuss both direction and magnitude of any potential bias	38
Interpretation	20	Give a cautious overall interpretation of results considering objectives, limitations, multiplicity of analyses, results from similar studies, and other relevant evidence	37-40
Generalisability	21	Discuss the generalisability (external validity) of the study results	37-40
Other information			
Funding	22	Give the source of funding and the role of the funders for the present study and, if applicable, for the original study on which the present article is based	40

*Give information separately for exposed and unexposed groups.

Note: An Explanation and Elaboration article discusses each checklist item and gives methodological background and published examples of transparent reporting. The STROBE checklist is best used in conjunction with this article (freely available on the Web sites of PLoS Medicine at <http://www.plosmedicine.org/>, Annals of Internal Medicine at <http://www.annals.org/>, and Epidemiology at <http://www.epidem.com/>). Information on the STROBE Initiative is available at www.strobe-statement.org.