

### INTRODUÇÃO

As Doenças Lisossômicas de Depósito (DLDs) compreendem um grupo heterogêneo de cerca de 70 desordens genéticas que resultam no acúmulo de substratos macromoleculares dentro do compartimento lisossomal celular. O acúmulo progressivo destas moléculas leva a uma disfunção celular que afeta tanto órgãos periféricos quanto o sistema nervoso central. A disponibilidade de tratamentos adequados para alguns destes distúrbios resulta num aumento dos esforços para desenvolver métodos novos, confiáveis e robustos com o intuito de realizar o rastreio em recém-nascidos e detectar estes distúrbios antes do início dos sintomas clínicos, permitindo o início precoce da intervenção terapêutica.

### OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi o desenvolvimento de técnica de Espectroscopia de Massas em Tandem (LC/MS/MS) para detecção de 6 DLDs (Doença de Fabry, Niemann-Pick A/B, Pompe, Gaucher, Krabbe e Mucopolissacaridose tipo I) através da medida da atividade enzimática em sangue de pacientes afetados e controles saudáveis.

### METODOLOGIA



- Medida da atividade das enzimas  $\alpha$ -galactosidase (GLA), esfingomielinase ácida (ASM),  $\alpha$ -glicosidase (GAA),  $\beta$ -glicocerebrosidase (ABG), galactocerebrosidase (GALC) e  $\alpha$ -Liduronidase (IDUA) em sangue em cartão por LC/MS/MS.
- Análise da precisão intra e inter-ensaio, linearidade e acurácia do método através de curvas de calibração e de controles de qualidade (sangue em cartão do CDC – “Control Disease Center”/EUA). Comitê de ética HCPA n°2017-0445.

### RESULTADOS

Os dados demonstraram boa linearidade, com os coeficientes de correlação  $R^2$  variando de 0,975 a 0,9991.

**Tabela 1:** Resultados de calibração e parâmetros de linearidade.

	GAA	GLA	ABG	ASM	IDUA	GALC
Ratio P/IS	Observed ratio					
0.00	0.03	0.003	0.019	0.022	0.03	0.02
0.10	0.11	0.12	0.094	0.11	0.12	0.11
0.50	0.57	0.54	0.45	0.47	0.47	0.49
1.00	1.09	0.99	0.90	1.11	0.96	0.99
2.00	1.93	2.11	2.07	1.96	1.91	1.96
5.00	3.54	5.06	4.17	4.6	4.63	4.8
$R^2$	0.975	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99
Slope	0.70	0.99	0.84	0.92	0.92	0.97

Conforme demonstrado na tabela 2, a média das atividades enzimáticas medidas em 7 ensaios consecutivos foi comparável à relatada pelo CDC.

**Tabela 2:** Comparação entre as medidas de atividade enzimática ( $\mu\text{mol/h/L}$ ) em amostras de DBS de controle de qualidade determinadas em SGM/HCPA e pelo CDC. Reference values determined in QC DBS samples by the CDC.

	ASM	GALC	ABG	GAA	GLA	IDUA
<b>Base Pool</b>	(0.0-0.33)	(0.03-0.12)	(0.0-0.45)	(0.0-0.60)	(0.0-0.90)	(0.0-0.41)
<b>Low</b>	(0.10-0.40)	(0.26-0.43)	(0.19-0.90)	(0.47-1.02)	(0.19-1.23)	(0.0-0.99)
<b>Medium</b>	(1.25-1.96)	(2.36-3.48)	(3.93-6.29)	(5.42-7.83)	(4.60-6.88)	(3.54-5.46)
<b>High</b>	(2.33-3.70)	(4.95-6.83)	(7.03-12.35)	(10.14-15.63)	(8.01-14.09)	(7.04-12.42)

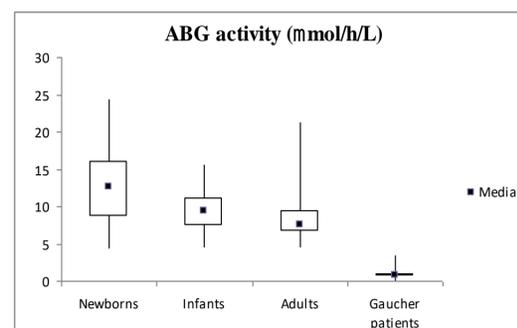
Enzyme activities obtained from 7 consecutive assays in SGM/HCPA. Results were expressed as mean  $\pm$  SD.

<b>Base Pool</b>	0.18 $\pm$ 0.07	0.07 $\pm$ 0.02	0.28 $\pm$ 0.14	0.48 $\pm$ 0.21	0.79 $\pm$ 0.45	0.44 $\pm$ 0.12
<b>Low</b>	0.39 $\pm$ 0.17	0.33 $\pm$ 0.08	0.75 $\pm$ 0.24	0.98 $\pm$ 0.16	1.16 $\pm$ 0.33	0.82 $\pm$ 0.27
<b>Medium</b>	2.20 $\pm$ 0.30	2.82 $\pm$ 0.51	5.61 $\pm$ 0.47	5.30 $\pm$ 0.30	6.16 $\pm$ 1.85	5.53 $\pm$ 0.95
<b>High</b>	4.48 $\pm$ 0.63	5.54 $\pm$ 1.10	11.30 $\pm$ 0.60	10.37 $\pm$ 1.16	12.62 $\pm$ 3.94	11.59 $\pm$ 1.51

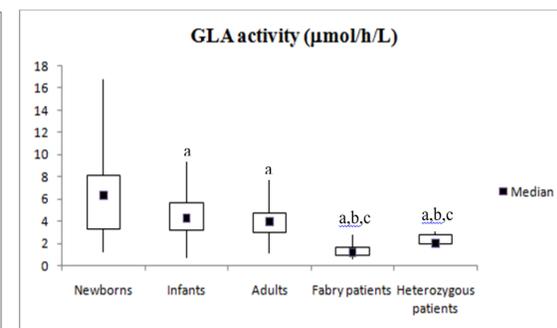
A precisão intra e inter-ensaio variou de 1,17-11,60% e 5,39-31,24%, respectivamente.

Com exceção da GALC e IDUA, as atividades enzimáticas foram significativamente maiores em neonatos comparadas a crianças e controles adultos. Os pacientes afetados apresentaram atividade enzimática significativamente menor do que os indivíduos controle (figura 1a à 1f).

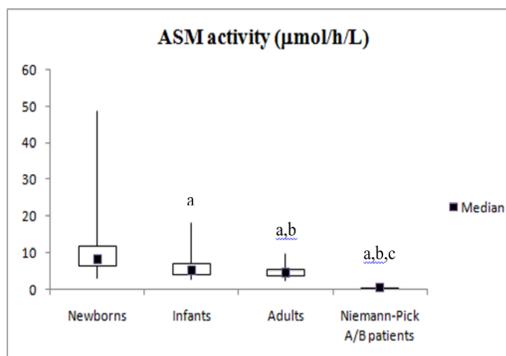
(Figura 1 a: enzima ABG)



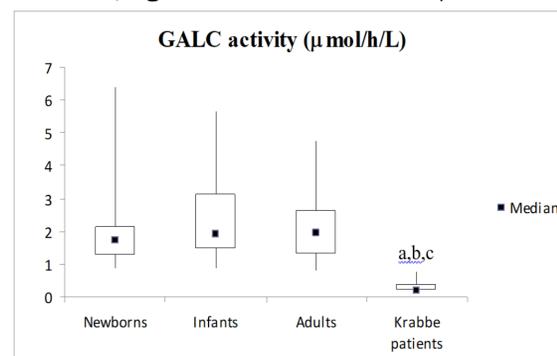
(Figura 1b. enzima GLA)



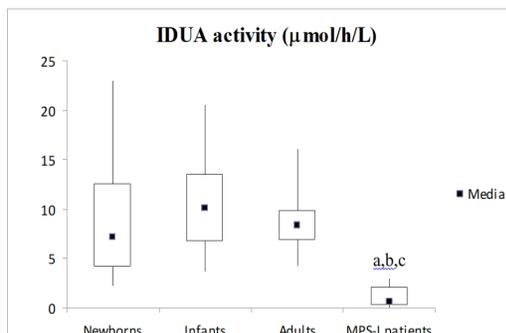
(Figura 1c. enzima ASM)



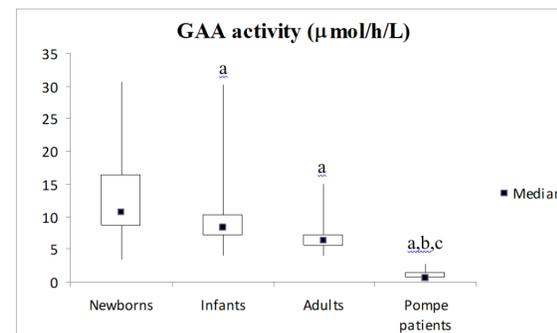
(Figura 1d. enzima GALC)



(Figura 1e. enzima IDUA)



(Figura 1f. enzima GAA)



**Figuras 1 a-f:** atividade das enzimas ABG (1 a), GLA (1b), ASM (1c), GALC (1d), IDUA (1e) e GAA (1f) em amostras de DBS de controles agrupados de acordo com a idade e em pacientes com doença de 1a – Fabry; 1b – Gaucher; 1c – Niemann-Pick A/B; 1d – Krabbe; 1f – MPS-1; 1F - Pompe. As barras de erro mostram a faixa de atividade enzimática, a caixa representa esses resultados dentro do percentil 95 e o símbolo '■' representa a mediana (teste U de Mann-Whitney,  $p < 0,05$ ); a: diferença de recém-nascidos, b: diferença de crianças, c: diferença dos controles adultos.

### CONCLUSÃO

Os resultados provenientes deste estudo demonstraram que a técnica de Espectrometria de Massas em Tandem é um método promissor para screening neonatal de DLDs e, se implementado, permitirá um diagnóstico e tratamento precoce de bebês assintomáticos, reduzindo a morbidade, aumentando a sobrevivência e melhorando a qualidade de vida dos pacientes.

**Agradecimentos:** UFRGS, CNPq, CAPES, FIPE/HCPA e FAPERGS