

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

**TRIAGEM NEONATAL PARA MUCOPOLISSACARIDOSE
TIPO VI (SÍNDROME DE MAROTTEUX-LAMY) EM UMA
REGIÃO COM ALTA INCIDÊNCIA DA DOENÇA**

FERNANDA BENDER

Orientador: Prof. Dra. Sandra Leistner-Segal

Dissertação de Mestrado

2011

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

**TRIAGEM NEONATAL PARA MUCOPOLISSACARIDOSE
TIPO VI (SÍNDROME MAROTEUX-LAMY) EM UMA REGIÃO
COM ALTA INCIDÊNCIA DA DOENÇA**

FERNANDA BENDER

Orientador: Prof. Dra. Sandra Leistner-Segal

A apresentação desta dissertação é requisito do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para a obtenção do título de mestre.

Dissertação de Mestrado

2011

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

Responsável: Biblioteca Faculdade de Medicina da UFRGS

C287d

Bender, Fernanda

Triagem Neonatal para Mucopolissacaridose tipo VI (Síndrome Maroteux-Lamy) em uma região com alta incidência da doença/ Fernanda Bender – Porto Alegre, 2011.

88 f. : il.

Orientador: Sandra Leistner-Segal

Dissertação (Mestrado em Medicina) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, 2011.

1. Mucopolissacaridose. 2. Síndrome Maroteux-Lamy I. Leistner-Segal, Sandra. II. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas. IV. Título.

CDU: 61

AGRADECIMENTOS

Devo agradecimentos para muitos que participaram no desenvolvimento desse projeto direta e indiretamente e em especial:

A Sandra, por ter me aceito como aluna, pela confiança, pelo apoio e pelos aprendizados necessários que obtive deste projeto e por acreditar na minha capacidade, incentivando-me a alcançar meus objetivos.

À Maira Burin, pelo apoio, incentivo, nos auxílios e aprendizagem nas diversas técnicas enzimáticas, me proporcionou as experiências laboratoriais para a realização deste trabalho.

Ao Roberto, que possibilitou o meu primeiro estágio no Serviço de Genética Médica, sempre me apoiou e revisou os trabalhos no desenvolvimento desse projeto.

Aos meus colegas e amigos do laboratório dos erros inatos do metabolismo, Kristiane, Juarez, Régis, Marli, Jurema, Giórgia, Fernanda, Andressa, Letícia, pela amizade que fiz e pela colaboração que todos tiveram durante esse período.

Ao Gabriel Civallero, pela ajuda na padronização da Arilsulfatase B em microplaca.

A todos os colegas do laboratório de genética molecular, Ágata, Aline, que me auxiliaram na realização das análises, em especial à Fabiana, Ana Carolina e Laila, pelos auxílios científicos que foram fundamentais e pela grande amizade que fizemos dando ótimos momentos de convívio com muitas boas lembranças.

A Marilda, sempre muito bem humorada e cheia de alegria me apoiando, pelos cuidados e responsabilidade com a limpeza do material utilizado nos experimentos.

Aos colegas da Pesquisa Clínica, por ser um grupo com um coleguismo muito forte, em especial a Silvani com quem tenho convívio mais direto por ser uma pessoa muito dedicada e simpática.

À equipe da secretaria do Serviço de Genética Médica do HCPA, em especial à Cléa e Zeniara Lompa, pelo auxílio nos momentos de uso da máquina de xérox. Ao Célio, que me auxiliou a resolver assuntos burocráticos e sempre estava disposto para isso.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela oportunidade em obter este título.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Medicina:
Ciências Médicas.

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

A APAE de Salvador /BA, que enviou as amostras para a realização das análises.

A BioMarin, que proporcionou alguns auxílios financeiros na realização desse projeto.

A todos meus amigos, pelo incentivo, por entenderem a minha ausência nos encontros.

Aos amigos Amanda e André, pelo auxílio no designer do Folder de Divulgação do Projeto.

Ao Eraldo e família, que ofereceu a sua residência hospedagem durante minhas idas para Salvador envolvendo assuntos do projeto, pela atenção e carinho.

Aos meus pais, me apoiaram sempre principalmente nesse período entendendo as minhas poucas visitas.

A minha irmã e cunhado Fernando, que sempre me apoiaram e incentivaram.

Ao meu afiliado Pedro, pela minha ausência em alguns momentos no meu papel de dinda.

A Magda, que é mais que uma sogra, minha segunda mãe, pelo carinho e incentivo com a minha pesquisa.

A Vó Maria e Vô Alceu, que tenho um carinho muito especial por serem muito atenciosos.

Ao Diego, por estar ao meu lado e ter-me incentivado, pelo seu carinho e compreensão, principalmente nas horas mais difíceis, por ter me auxiliado em algumas etapas desse projeto e por ser esse namorado e amigo muito especial.

“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.” (Fernando Pessoa)

RESUMO

A mucopolissacaridose tipo VI (MPS VI) ou Síndrome de Maroteaux-Lamy, é uma doença autossômica recessiva causada pela deficiência da enzima lisossomal N-acetilgalactosamina-4-sulfatase (ARSB), a qual resulta no armazenamento lisossômico de dermatan sulfato em vários tecidos e órgãos, dando origem a uma condição clínica de espectro variável, desde formas mais graves até formas mais atenuadas. O acúmulo de substrato não degradado causa um importante comprometimento ósseo, problemas respiratórios, baixa estatura e outros problemas, afetando os olhos, o coração e outros órgãos. Embora a síndrome de Maroteaux-Lamy não tenha uma incidência definida no Brasil, é reconhecido que, no nosso meio, é muito mais freqüente do que em outros países e regiões. Ela é particularmente freqüente no município de Monte Santo (Bahia), de aproximadamente 50.000 habitantes e onde já foram registrados 13 casos da doença. O diagnóstico é importante porque existe hoje um tratamento específico para a doença, a terapia de reposição enzimática (TRE), que vem mostrando bons resultados, especialmente quando iniciada em idade precoce. Descrevemos neste trabalho uma adaptação para microplacas da medida fluorimétrica da atividade de ARSB, e uma nova metodologia de análise molecular, ambas padronizados para sangue total impregnado em papel-filtro (STIPF). Essas técnicas foram desenvolvidas para incluir um teste de triagem neonatal para MPS VI, realizado nas amostras coletadas para o “teste do pezinho” nos neonatos do município de Monte Santo. Esses métodos permitem a detecção de pacientes com MPS VI e dos portadores da mutação específica que parece ser responsável pela alta incidência de MPS VI nessa localidade, uma vez que todos os pacientes lá diagnosticados apresentavam a mesma mutação (p.H178L) em homozigose. O trabalho foi desenvolvido em três etapas: na primeira foi realizada a padronização das técnicas em 100 amostras de STIPF; na segunda foi feito um teste-piloto com amostras de neonatos de Monte Santo, para avaliação das técnicas padronizadas e para o estudo de termoestabilidade em controles hígidos; na terceira foram analisadas amostras de STIPF de neonatos provenientes de Monte Santo pelos dois métodos (bioquímico e molecular). A padronização para realização da medida fluorimétrica da atividade enzimática de ARSB em microplacas indicou que o método é sensível,

permitiu diferenciar os valores da população normal dos valores dos pacientes afetados e possibilitou a identificação segura de pacientes com MPS VI. Nas padronizações da análise molecular da mutação p.H178L em STIPF foi possível diferenciar os indivíduos normais, heterozigotos e homozigotos. Os resultados preliminares disponíveis indicam que o protocolo de triagem neonatal para MPS VI desenvolvido no presente trabalho poderá ser facilmente incorporado por laboratórios de referência, contribuindo para a detecção e tratamento precoce dos pacientes afetados por MPS VI.

Palavras-Chave: Mucopolissacaridose VI, Síndrome de Maroteux-Lamy, Doença Lisossômica, Glicosaminoglicanos, Sangue Total Impregnado em Papel-Filtro, Triagem Neonatal

ABSTRACT

Mucopolysaccharidosis type VI (MPS VI) or Maroteux-Lamy syndrome, is an autosomal recessive disorder caused by deficiency of the lysosomal enzyme N-acetylgalactosamine-4-sulfatase (ARSB), which results in lysosomal storage of dermatan sulfate in various tissues and organs and leads to a variable clinical spectrum, including more severe and attenuated forms. The accumulation of undegraded substrate causes bone involvement, respiratory problems and short stature, among other signs and symptoms, affecting the eyes, heart and other organs. Although the Maroteux-Lamy syndrome does not have a defined incidence in Brazil, it is recognized that in our environment it is much more frequent than in other countries and regions. It is particularly frequent in the municipality of Monte Santo (Bahia) approximately 50,000 inhabitants and where there have already been 13 cases of the disease. The diagnosis is important because today there is a specific treatment for the disease, enzyme replacement therapy (ERT) which has shown good results, especially when started at an early age. We describe herein the standardization of the microplate fluorometric method for the ARSB test and a new methodology of molecular analysis, both adapted for dried blood spots (DBS) samples. These techniques were developed for inclusion of MPS VI in the newborn screening program that already tests the neonates of the city of Monte Santo, Bahia, Brasil for metabolic diseases. The methods were developed to detect patients with MPS VI and also for carriers, once the disease seems to have a high incidence (around 1:5.000) at this location. Also, all patients that have already been diagnosed in this city presented the same mutation (p.H178L) in homozygosis. The study was conducted in three stages: in the first was performed in 100 DBS samples an standardization of the techniques; in the second was done a pilot test with samples of newborns of Monte Santo, for the evaluation of standardized techniques and for the thermostability study in healthy controls; in the third were analyzed newborns samples from Monte Santo for both biochemical and molecular methods. Standardization on microplate for fluorimetric enzyme activity of the ARSB showed the assay sensitivity, differentiating values between normal and affected and allowing a reliable detection of patients with MPS VI. On the standardization for molecular analysis in DBS it was possible to differentiate the results for normal individuals,

heterozygous and affected for the mutation p.H178L. The preliminary results available indicate that the protocol of neonatal screening for MPS VI developed in this work can be easily incorporated by reference laboratories, contributing to the detection and premature treatment of MPS VI affected patients.

Key Words: Mucopolysaccharidosis VI, Maroteux-Lamy Syndrome, Lysosomal Storage Diseases, Glycosaminoglycans, Dried Blood Spots, Newborn Screening.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Forma de Herança Autossômica Recessiva.....	23
Figura 2 – Rota Metabólica do Dermatan Sulfato.....	28

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Classificação das mucopolissacaridoses.....	22
Tabela 1 - Incidência Mundial da Mucopolissacaridose tipo VI	32
Tabela 2 – Níveis de prevenção das doenças, conhecido com níveis de Leavell (Autor Hugh Leavell).....	33
Tabela 3 - Critérios de Inclusão de doenças para Triagem Neonatal	36

LISTA DE ABREVIATURAS

AR - Autossômica recessiva
APAE – Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais
ARSB – Arilsulfatase B
BA – Bahia
BSA - Albumina de Soro Bovino
CS - Condroitin Sulfato
CEP- Comitê de Ética em Pesquisa
CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CTN – Centro de Triagem Neonatal
 β - GAL - β - galactosidase
DL - Doença Lisossômica
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
DS - Dermatan Sulfato
DMB – Dimetilblue
DMSO – Dimethyl Sulfoxide
DPN - Diagnóstico pré-natal
EIM - Erros Inatos do Metabolismo
FAPESB - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia
FIOCRUZ – Fundação Osvaldo Cruz
FTA – Cartão de Coleta de Material Biológico para Extração de DNA
GAGs - Glicosaminoglicanos
HCPA - Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HS – Heparan Sulfato
IDS – Iduronato Sulfatase
IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IOC-RJ – Instituto Osvaldo Cruz – Rio de Janeiro
INAGEMP- Instituto Nacional de Genética Médica Populacional
LEBT – *Lysosomal Enzyme purified from Bovine Testis*
LGM – Laboratório de Genética Molecular
LREIM - Laboratório Regional de Erros Inatos do Metabolismo
MPS – Mucopolissacaridose

MPS VI- Mucopolissacaridose tipo VI
PCR - Polymerase Chain Reaction
PPSUS - Programa de Pesquisa para o Sistema Único de Saúde
QS - Queratan Sulfato
RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*
RLX - Recessiva Ligada ao Cromossomo X
RN - Recém-Nascido
SPSS - Statistical Package for the Social Sciences
SGM – Serviço de Genética Médica
STIPF - Sangue Total Impregnado em Papel-Filtro
SUS – Sistema Único de Saúde
TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TD - Termo de Dissentimento
TG - Terapia Gênica
TN – Triagem Neonatal
TMO - Transplante de Medula Óssea
TRE - Terapia de reposição enzimática
UFBA – Universidade Federal da Bahia
UFEB – Universidade do Estado da Bahia
UFRB - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro
UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UIPF – Urina Impregnada em Papel-Filtro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO	19
2.2 DOENÇAS LISSÔMICAS	20
2.3 MUCOPLOSSACARIDOSES.....	20
2.4 MUCOPLOSSACARIDOSE TIPO VI	27
2.4.1 Diagnóstico para MPS VI	29
2.4.2 Tratamento para MPS VI.....	30
2.4.3 Incidência	31
2.5 MUNICÍPIO DE MONTE SANTO	32
2.6 TRIAGEM NEONATAL	33
2.6.1 Triagem Neonatal para MPS VI.....	35
3 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	36
4 OBJETIVOS.....	37
4.1 OBJETIVO GERAL.....	37
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
5 METODOLOGIA	38
5.1 POPULAÇÃO EM ESTUDO	38
5.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	39
5.3 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	39
5.4 DESCRIÇÃO DAS TÉCNICAS UTILIZADAS	40
5.4.1 Coleta e preparo das amostras em Papel-Filtro (STIPF).....	40
5.4.1.1 Técnica da coleta do "teste do pezinho".....	40
5.4.2 Ensaio enzimático da Arisulfatase B em STIPF	41
5.4.3 Ensaio enzimático da β -galactosidase em STIPF (enzima de referência)	42
5.4.4 Ensaio enzimático da Iduronato-2-Sulfatase em STIPF (enzima para descartar deficiência múltipla de sulfatases).....;	42
5.4.5 Ensaio Moleculares em amostras de STIPF	43
5.4.5.1 Extração de DNA em STIPF.....	43
5.4.5.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	44
5.4.5.3 RFLP (para análise da mutação p. H178L).....	44

5.4.5.4 Reação da PCR sem extração de DNA	45
5.4.5.5 Termoestabilidade da enzima Arilsulfatase B.....	45
5.5 PÂRAMETROS AVALIADOS.....	46
5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
5.7 ASPECTOS ÉTICOS.....	46
6 DESENVOLVIMENTO	47
6.1 REALIZAÇÃO DA PESQUISA	47
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
8 ARTIGO EM PORTUGUÊS	55
9 ARTIGO EM INGLÊS.....	68
10 CONSIDERAÇÕES FINAIS	80
11 CONCLUSÕES.....	81
ANEXOS	82
ANEXO A - APROVAÇÃO DO PROJETO	82
ANEXO B - FOLDER DE DIVULGAÇÃO DO PROJETO	83
ANEXO C - TERMO DE DISSENTIMENTO.....	85
ANEXO D - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	86
ANEXO E - AUTORIZAÇÃO PARA USO DE IMAGEM.....	88

1 INTRODUÇÃO

A síndrome de Maroteaux-Lamy ou Mucopolissacaridose tipo VI (MPS VI) é uma doença autossômica recessiva, causada por um defeito intralisossomal que afeta a degradação do glicosaminoglicano (GAG) dermatan sulfato, sendo o diagnóstico usualmente confirmado pela deficiência na atividade da enzima N-acetilgalactosamina-4-sulfatase (arilsulfatase B – ARSB) em leucócitos. O acúmulo dos GAGs é responsável pelas características fenotípicas da doença (Neufeld e Muenzer, 2001; Schwartz *et al.*, 2001).

Pacientes com MPS VI clinicamente apresentam baixa estatura, dismorfismo facial, opacidade de córnea, otite média recorrente, pneumonia, doença obstrutiva das vias aéreas, valvulopatia cardíaca, esplenomegalia, hérnia umbilical e inguinal, rigidez e contraturas articulares e anormalidades esqueléticas. A inteligência normal é preservada neste tipo de MPS (Azevedo *et al.*, 2004).

O gene da ARSB está localizado no braço longo do cromossomo 5, na região 5q13.3 – 5q14.1 (Litjens *et al.*, 1989). A maioria dos alelos mutantes está presente em somente um ou poucos pacientes, indicando uma grande heterogeneidade alélica da MPS VI (Litjens & Hopwood, 2001).

No Município de Monte Santo, localizado no interior do estado da Bahia, têm sido diagnosticadas diversas doenças genéticas (autossômicas recessivas, dominantes, defeitos congênitos e distúrbios multifatoriais) que estão sendo amplamente estudadas em seus variados aspectos. A MPS VI apresenta uma alta incidência nessa região (ao redor 1:5000).

Por este motivo, foi desenvolvido o presente projeto com o objetivo de padronizar métodos bioquímicos e moleculares para triagem neonatal de MPS VI em amostras de sangue total impregnado em papel filtro (STIPF). A inclusão dessa triagem nos recém-nascidos da região possibilita um diagnóstico precoce e a detecção de portadores da doença através de técnicas de fácil coleta e transporte das amostras. Com o diagnóstico neonatal seria possível dar início ao tratamento precoce e assim possibilitar um melhor prognóstico e conseqüentemente uma melhor qualidade de vida para os pacientes.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO

Os erros inatos do metabolismo (EIM) são um grupo de doenças geneticamente determinadas, decorrentes de deficiência em alguma via metabólica que está envolvida na síntese, transporte ou na degradação de uma substância. As manifestações clínicas podem ser decorrentes do acúmulo do substrato de uma reação, da falta de produto dessa mesma reação e ainda do acúmulo de uma substância originada de via metabólica alternativa.

As doenças metabólicas quando consideradas isoladamente apresentam uma incidência pequena de cerca de 10% de todas as doenças genéticas, sendo que a maioria dessas doenças tem herança autossômica recessiva. Esse percentual corresponde a cerca de 500 distúrbios conhecidos (Sanchez *et al.*, 2006), ocorrendo aproximadamente em 1/5000 nascidos vivos (Souza *et al.*, 2002).

O termo EIM foi descrito em 1908 por Archibald Garrod, para se referir a algumas situações clínicas. A primeira doença estudada foi a alcaptonúria (aumento da excreção do ácido homogentísico), que leva a artrite, e a urina fica escura após algumas horas em contato com o ar. Posteriormente descreveu o albinismo, cistinúria e a pentosúria, que também deveriam ser EIM. Esses distúrbios foram atribuídos à atividade deficiente ou ausente de uma enzima responsável por um passo específico de uma rota metabólica, cujo bloqueio levava ao acúmulo do substrato e/ou falta do produto (Husny e Fernandes-Caldato, 2006).

Os EIM são classificados em três grupos (Husny e Fernandes-Caldato, 2006):
Grupo 1: defeito na síntese ou catabolismo de moléculas complexas. Exemplo Doenças Lisossômicas
Grupo 2: defeito no metabolismo intermediário. Exemplo aminoacidopatias.
Grupo 3: defeito na produção ou utilização de energia. Exemplo Defeitos Mitocondriais.

Em 1982, foi criado no Serviço de Genética Médica (SGM) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) o Laboratório Regional de Erros Inatos do

Metabolismo (LREIM). Atualmente o LREIM é um centro de referência nacional para o diagnóstico de EIM.

2.2 DOENÇAS LISSOSSÔMICAS

As doenças lisossômicas (DL) são um grupo dos EIM e resultam da deficiência de alguma enzima específica, ativador protéico ou proteína de transporte, conduzindo ao acúmulo dos substratos no lisossomo (organelas citoplasmáticas que compõem o aparelho digestivo das células) e provocando mudanças bioquímicas específicas e sintomas característicos (Targer *et al.*, 1984).

As DL são doenças progressivas, graves e incuráveis, apresentam um risco de 25% em cada gestação para os casos de herança autossômica recessiva. No caso de herança recessiva ligada ao cromossomo X, o risco é de 50% para os indivíduos do sexo masculino. Na maioria delas, o diagnóstico permite apenas medidas preventivas, tais como o aconselhamento genético, a detecção de heterozigotos e o diagnóstico pré-natal (DPN).

De acordo com o tipo de substrato que se acumula, as doenças lisossômicas podem ser classificadas em diferentes grupos, tais como as esfingolipidoses, as glicoproteínoses e as mucopolissacaridoses.

2.3 MUCOPOLISSACARIDOSES

As mucopolissacaridoses (MPS) são doenças graves que comprometem o desenvolvimento de forma importante. Clinicamente, as MPS apresentam muitos achados em comum, como o curso crônico e progressivo, o comprometimento multissistêmico, principalmente esquelético, cardiopulmonar, da córnea, do fígado, do baço, do cérebro e das meninges (Azevedo *et al.*, 2004), o que permite uma suspeita diagnóstica inicial (Dangel, 1998).

As manifestações clínicas são em geral variáveis, existindo formas atenuadas e formas graves. O acúmulo de heparan sulfato, que é um componente das células

do tecido nervoso, leva a sintomas predominantemente neurológicos, como o que ocorre nas síndromes de Hurler, Hunter e Sanfilippo. As valvulopatias e as cardiomiopatias são mais freqüentes e mais graves nas MPS em que há acúmulo de dermatan sulfato, como ocorre nas síndromes de Hurler, Hunter e Maroteaux-Lamy.

De uma maneira geral, a degradação dos glicosaminoglicanos (GAGs) nos lisossomos é iniciada por endoglicosidases, como a hialuronidase, que rompe as cadeias longas de polissacarídeos em unidades menores. Após esta degradação limitada, os fragmentos são novamente degradados por hidrólises seqüenciais das terminações ainda não reduzidas (Neufeld e Muenzer, 2001). Esta segunda etapa é realizada por hidrolases lisossomais, específicas para cada tipo de união. A ausência da enzima responsável neste processo leva a um acúmulo intralisossomal de moléculas de GAGs incompletamente degradados, interferindo no funcionamento normal dos lisossomos.

De acordo com o resíduo de açúcar, o tipo de ligação existente entre eles e o número e localização dos grupos sulfatos, podemos encontrar cinco diferentes grupos: condroitin sulfato (CS), dermatan sulfato (DS), heparan sulfato (HS), ácido hialurônico e queratan sulfato (QS) (Byers *et al.*, 1998).

A classificação atual das MPS engloba 11 tipos diferentes de defeitos enzimáticos, correspondendo a nove fenótipos clínicos: Hurler, Hurler-Scheie, Scheie, Hunter, Sanfilippo, Morquio, Maroteaux-Lamy, Sly e Natowicz. Cada defeito enzimático pode condicionar fenótipos diferentes ao mesmo tempo em que diferentes defeitos enzimáticos podem produzir um fenótipo similar (Neufeld e Muenzer, 2001), como pode ser visualizado no Quadro I.

QUADRO 1. Classificação das mucopolissacaridoses (adaptada de Neufeld & Muenzer, 2001)

Tipo de MPS	Epônimo	Herança	GAGs na urina	Enzima Deficiente	Localização do gene
I grave	Hurler	AR	DS + HS	α -L-Iduronidase	4p 16.3
I intermediária	Hurler-Scheie	AR	DS + HS	α -L-Iduronidase	4p 16.3
I atenuada	Scheie	AR	DS + HS	α -L-Iduronidase	4p 16.3
II	Hunter (grave)	RLX	DS + HS	Iduronato sulfatase	Xq28
II	Hunter (atenuada)	RLX	DS + HS	Iduronato sulfatase	Xq28
III A	Sanfilippo A	AR	HS	Heparan-N-sulfatase	17q25.3
III B	Sanfilippo B	AR	HS	α -N-Acetilglicosaminidase	17q21
III C	Sanfilippo C	AR	HS	Acetil-CoA: α -glicos. acetiltransferase	8p11.1
III D	Sanfilippo D	AR	HS	N-acetilglicosamina 6-sulfatase	12q14
IV A	Morquio A	AR	QS	Galactose-6-sulfatase	16q24.3
IV B	Morquio B	AR	QS	β -galactosidase	3p21.33
VI	Maroteaux-Lamy	AR	DS	Arilsulfatase B	5q13-q14
VII	Sly	AR	DS + HS	β -glicuronidase	7q21.11
IX	Natowicz	AR	Ácido hialurônico	Hialuronidase	3p21.1-p21.3

AR = Autossômica Recessiva; RLX = Recessiva ligada ao X; DS = Dermatan Sulfato; HS = Heparan Sulfato; QS = Queratan Sulfato.

As MPS são herdadas de forma autossômica recessiva (Fig. 1) com exceção da MPS tipo II que é ligada ao cromossomo X (Neufeld et al, 2001).

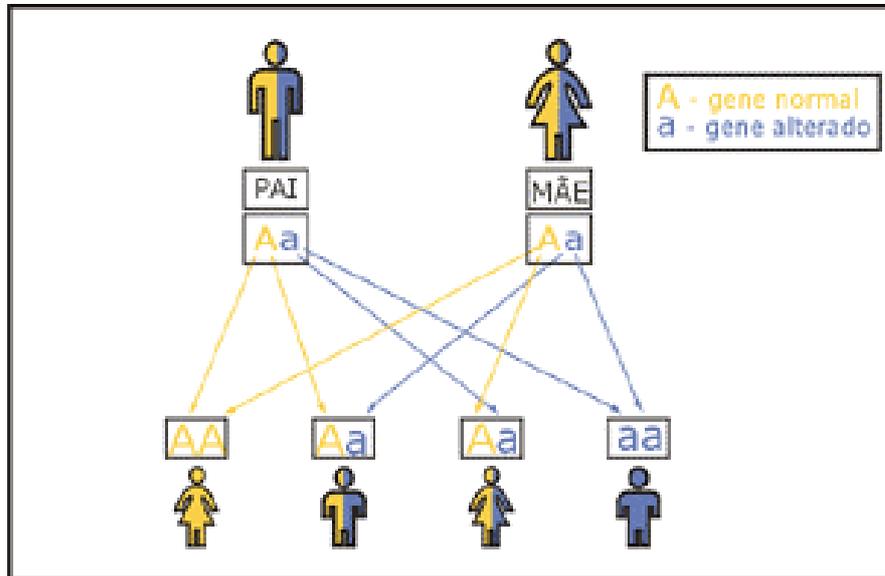


Figura 1. Forma de Herança Autossômica recessiva
(<http://www.unifesp.br/centros/creim/tiposheranca.html>)

O diagnóstico clínico da mucopolissacaridose é feito, normalmente, por um geneticista, após o encaminhamento por outro médico. Em caso de suspeita clínica de MPS os exames são realizados primeiro na urina, servindo de direcionamento para a investigação da doença (Schwartz *et al.*, 2001). Para investigar a presença de mucopolissacaridúria são utilizados exames quantitativos, como 1,9-dimetilmetileneblue (DMB). Testes qualitativos, cromatografia para GAGs (Humbel *et al.*, 1972; Lipiello e Mankin HJ, 1977), e a eletroforese uni ou bidimensional, (Pennock, 1976 e Cappelletti, 1979), são utilizados para identificar os tipos de GAGs excretados em excesso e direcionar a investigação para os ensaios enzimáticos específicos (Barth *et al.*, 1990; Chih-Kuang, 2002 e De Jong, 1989). A quantificação dos GAGs é utilizada também como biomarcador como resposta ao tratamento das MPS. O diagnóstico definitivo das mucopolissacaridoses se obtém através da medida da atividade enzimática específica, em leucócitos e/ou fibroblastos cultivados. Chamoles *et al.*, 2001 e Civallero *et al.*, 2006 desenvolveram novas técnicas para medir a atividade enzimática de algumas enzimas lisossomais, em amostras de sangue total impregnado em papel-filtro (STIPF). Esta metodologia, até o momento é utilizada apenas como triagem. Em 2002 Whitley e colaboradores desenvolveram a

técnica para a quantificação dos GAGs em amostras de urina impregnada em papel-filtro (UIPF) para investigação das MPS, esse método também facilita o transporte e o armazenamento da amostra. O uso do STIPF e da UIPF possibilita o envio de amostras de locais mais distantes para pacientes que dificilmente teriam acesso ao diagnóstico.

O diagnóstico bioquímico e clínico das MPS pode ser complementado pela análise molecular, permitindo a correlação entre genótipo e fenótipo e a identificação de portadores nas famílias, importante para o aconselhamento genético.

A identificação precoce de novos casos nas famílias permite, para os tipos de MPS em que há tratamento, que a terapia se inicie numa fase inicial da doença, quando é possível se obter resultados mais eficazes e significativos.

O diagnóstico pré-natal (DPN) permite a detecção, ainda no útero, de doenças que de outra forma só seriam diagnosticadas após o nascimento. No grupo dos EIM, no qual a maioria das doenças são autossômicas recessivas, a possibilidade de ter um novo filho afetado é quase sempre de 25%, nas situações ligadas ao X a possibilidade é de 50% de chances de ter filhos homens afetados (Sanseverino *et al.*, 2001), levando-se em consideração a condição de portadora da mãe. No momento em que é feito o diagnóstico de uma criança doente, o recomendado é realizar o aconselhamento genético, informar à família sobre os riscos de recorrência, o prognóstico, a gravidade da doença em foco e a possibilidade de realização do DPN.

O DPN para os EIM é altamente específico e só pode ser oferecido para aquelas famílias nas quais o diagnóstico de uma doença metabólica foi bem estabelecido no caso-índice através do estudo bioquímico e/ou molecular, na identificação prévia de um casal de heterozigotos ou de heterozigota de doença ligada ao X (Ashton-Prolla *et al.*, 2008).

No caso das MPS, os casais em risco de ter um filho afetado, o DPN pode ser uma opção (mesmo que a interrupção da gestação não seja prevista na legislação brasileira), pois ajuda a reduzir a ansiedade associada à gestação, principalmente nas situações onde o prognóstico é grave e não há a possibilidade de um tratamento eficaz.

O DPN é possível para todos os tipos de MPS e pode ser realizado em diferentes tipos de amostras, tais como: vilosidades coriônicas, coletadas usualmente entre a 10^a e 11^a semana de gestação, e que permitem a análise direta

do material num período mais precoce da gestação; líquido amniótico, que é geralmente coletado entre a 14^a e 16^a semana de gestação, e cuja análise requer o cultivo prévio das células, o qual leva em torno de 2 semanas e sangue fetal, que é coletado do cordão umbilical a partir da 20^a semana de gestação.

O DPN é realizado pelo ensaio enzimático relacionado com a MPS específica e pode ser associado à pesquisa molecular da mutação, quando esta já é conhecida na família.

A identificação de portadores pode ser importante para confirmar uma suspeita diagnóstica, sendo essencial para permitir um aconselhamento genético em famílias que apresentam um caso de MPS (Ashton-Prolla *et al.*, 2001). O método ideal de detecção é aquele que consegue revelar diretamente o gene ou produto gênico mutante. Se uma doença é comum em certa população pode ser em razão de um efeito fundador, o esperado é que a maioria das pessoas afetadas tenham exatamente a mesma mutação ancestral (Read & Donnai, 2008).

A incidência conjunta das MPS é estimada em aproximadamente 1:10.000 a 1:25.000 recém-nascidos vivos (Nelson, 1997; Applegarth *et al.*, 2000). As estatísticas mundiais mostram que a MPS I e III são as mais freqüentes e a MPS VI é a mais rara (Meike *et al.*, 1999; Poorthuis *et al.*, 1999). Entre os pacientes diagnosticados pelo LREIM de Porto Alegre, os que tiveram maior freqüência foram os tipos I e VI (Coelho *et al.*, 1997). No levantamento dos diagnósticos disponibilizados pela Rede MPS Brasil, do Serviço de Genética Médica do HCPA, em junho de 2011, as MPS com maior freqüência são as dos tipos I, II e VI. As procedências dessas amostras são de todo o Brasil e de outros países como: Arábia Saudita, Argélia, Argentina, Bolívia, Chile, Colômbia, Cuba, Dubai, Emirados Árabes Unidos, Equador, Guatemala, Irã, Japão, México, Omã, Panamá, Paraguai, Peru, Portugal, Qatar e Uruguai.

Até o momento não existe a cura para as MPS e o tratamento dos sintomas, que possuem uma variabilidade enorme no que se refere à gravidade, início e progressão, deve ser considerado em um primeiro momento. O tratamento dos sintomas deve ser monitorado caso a caso e envolve principalmente medidas que corrijam ou minimizem o envolvimento esquelético, neurológico, respiratório e cardíaco, necessitando uma equipe multidisciplinar para o manejo das complicações associadas. (Kircher *et al.*, 2007).

O paciente deve ser avaliado periodicamente, e o acompanhamento médico tem como objetivo fornecer a melhor qualidade de vida possível ao paciente e à sua família (Haddad *et al*, 1997 e Wraith *et al*, 1996).

Atualmente, além da terapia de reposição enzimática para os tipos I, II e VI, o tratamento a ser oferecido é essencialmente paliativo e sintomático.

Alguns aspectos devem ser considerados no manejo dos pacientes:

- **Fisioterapia motora:** Esse tipo de tratamento pode auxiliar na manutenção da função articular (Haddad *et al*, 1997; Neufeld e Muenzer, 2001).

- **Complicações respiratórias:** História de apnéia do sono deve sempre ser investigada, podendo ser necessária oxigenioterapia (Wraith, 1996).

- **Descompressão / Fusão cervical:** Embora controversa, a maioria dos autores refere que ela deve ser realizada profilaticamente nos pacientes com MPS IV, grupo onde a frequência de mielopatia cervical é especialmente elevada (Stevens, 1991).

- **Riscos anestésicos:** As principais complicações associadas são: Dificuldade de entubação, necessidade de traqueostomia de urgência e parada cardíaca intra-operatória (Baines e Keneally, 1983).

- **Outras alternativas de tratamento:** O uso de plasmaferese e/ ou o transplante de fibroblastos não se mostraram eficientes no tratamento das MPS. Já o transplante de medula óssea (TMO), apesar dos riscos, pode ser uma opção em alguns casos (Krivit *et al.*, 1989).

A terapia de reposição enzimática (TRE) é o tratamento específico, hoje disponível para as MPS I, II e VI, através do qual se repõe a enzima através de infusões regulares. Esta abordagem tem demonstrado bons resultados no prognóstico dos pacientes que realizam tratamento. A TRE não é eficiente para tratar os sintomas neurológicos das MPS, uma vez que a enzima administrada endovenosamente não atravessa a barreira hematoencefálica. Outra dificuldade é tratar os danos esqueléticos, já que as lesões ósseas são precoces e aparentemente irreversíveis. Ainda não há TRE disponível para os tipos III, IV e VII, mas existem avanços nesse sentido e esse cenário poderá mudar nos próximos anos.

A terapia gênica (TG), um procedimento que se encontra no estágio experimental e representa uma importante perspectiva em termos de tratamento das MPS. O princípio básico desse tratamento é a transferência de material genético

(seqüências de DNA) de outros organismos, para dentro das células de um indivíduo, com o objetivo de conferir um benefício terapêutico, usualmente com o uso de vetores.

2.4 MUCOPISSACARIDOSE TIPO VI

A MPS VI é uma das doenças mais raras dentre as MPS. O nome original da doença, síndrome de Maroteaux-Lamy, deve-se a dois médicos franceses que a descreveram pela primeira vez em 1963. A MPS VI pode se apresentar com um espectro de gravidade clínica variando das formas atenuada a grave, sendo uma doença autossômica recessiva causada pela deficiência da enzima N-acetilgalactosamina-4-sulfatase ou arilsulfatase B (ARSB). É caracterizada pelo armazenamento intralisossomal e excreção urinária de elevados níveis do GAG dermatan sulfato (DS). A deficiência da enzima arilsulfatase B faz com que o DS (fig.2) se acumule nos lisossomos, provocando amplas manifestações clínicas, que em geral surgem na primeira infância, mas também podem aparecer em fases posteriores da vida (Neufeld e Muenzer, 2001).

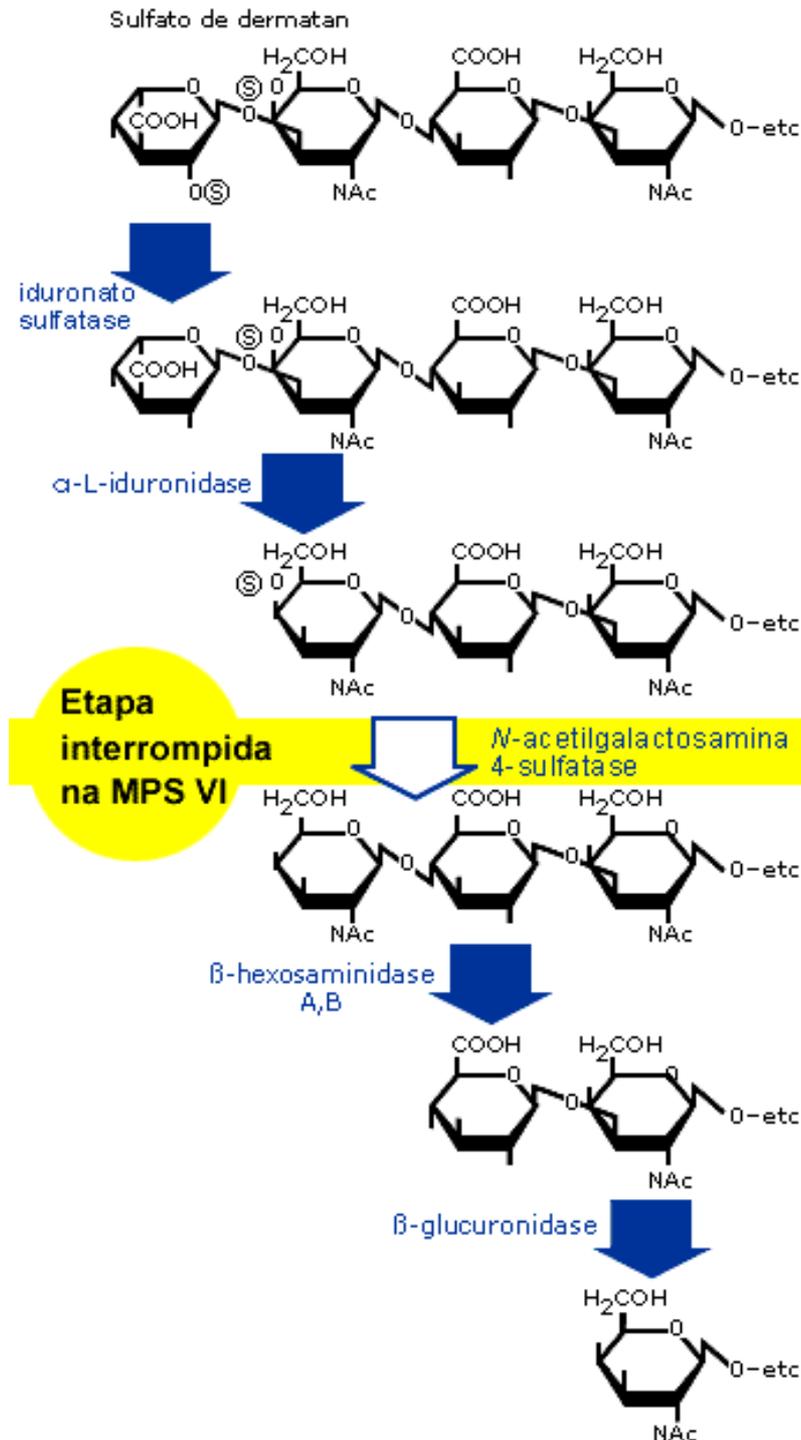


Figura 2. Rota metabólica do dermatan sulfato

(<http://www.maroteaux-lamy.com/Portuguese/HCP/BiochemBasis.aspx>)

A MPS VI é clinicamente representada pelas seguintes características: baixa estatura, dismorfismo facial progressivo, inteligência normal, opacidade de córnea, otite média recorrente, pneumonia, doença obstrutiva das vias aéreas, valvulopatia cardíaca, esplenomegalia, hérnia umbilical e inguinal, rigidez e contraturas

articulares e anormalidades esqueléticas (<http://www.maroteauxlamy.com/Portuguese/HCP/Signs.aspx>). Outra diferença, considerando as demais MPS, é a sobrevida, que é maior nos pacientes com MPS VI (Ishida *et al.*, 2009). Considerados normais ao nascimento, os indivíduos com MPS VI podem apresentar dolicocefalia, fronte ampla e alterações na coluna. A maioria dos pacientes apresenta os primeiros sinais da doença na infância (hepatoesplenomegalia, face infiltrada e retardo de crescimento), mais comumente entre 1 e 3 anos de idade (De Paula *et al.*, 2006). Por se tratar de uma doença crônica, os achados clínicos agravam-se com o passar dos anos. Os pacientes passam a apresentar alterações em vários órgãos e tecidos, que podem incluir desde alterações osteoarticulares a alterações cardiorrespiratórias, cujas complicações são progressivas e podem levar ao óbito (Mizuno *et al.*, 2010).

O gene da ARSB está localizado no braço longo do cromossomo 5, na região 5q13.3 – 5q14.1 (Litjens *et al.*, 1989). O isolamento e sequenciamento do cDNA da ARSB humana, realizado em um estudo por Peters *et al.* (1991), possibilitou a caracterização da proteína ARSB, a qual é composta por 533 resíduos de aminoácidos. A partir da descrição da primeira mutação por Wicker *et al.* (1991), uma série de outras mutações foram sendo identificadas somando aproximadamente 130 alterações presentes neste gene (HGMD; Litjens & Hopwood, 2001; Karageorgos *et al.*, 2004, Petry *et al.*, 2003, Petry *et al.*, 2005, Karageorgos *et al.*, 2007).

2.4.1 Diagnóstico para MPS VI

Na fase inicial da investigação se quantifica e identifica os GAGs na urina. Com o aumento na concentração dos GAGs no teste quantitativo, e a presença de dermatan sulfato na eletroforese, a investigação laboratorial é direcionada para a MPS tipo VI através do ensaio enzimático da ARSB em leucócitos (padrão-ouro). Após a confirmação do diagnóstico bioquímico pode-se realizar a análise molecular do gene ARSB para identificação da mutação causadora da doença. Devido a grande heterogeneidade alélica e a presença de inúmeros polimorfismos, o

diagnóstico molecular, na maioria das investigações, é lento necessitando de um seqüenciamento completo do gene incluindo as regiões de junção exon/intron

2.4.2 Tratamento para a MPS VI

Os bebês afetados com MPS VI parecem normais ao nascimento, mas a doença apresenta uma progressão avançada depois de alguns anos ou ao longo de muitas décadas, dependendo da extensão da deficiência enzimática. Tal como acontece com todos os transtornos da MPS, a MPS VI é uma doença clinicamente heterogênea em termos da extensão e taxa de progressão da insuficiência de órgãos em indivíduos afetados (Harmatz P., 2010). A existência de uma terapia específica para o tratamento aumenta a necessidade de um diagnóstico o mais precoce possível para o tratamento ser iniciado antes da progressão da doença irreversível (Muenzer J., 2004). Até pouco tempo o tratamento se resumia às medidas de suporte, destinadas a prover uma melhor qualidade de vida aos pacientes. O tratamento dos sintomas deve ser monitorado caso a caso e envolve principalmente medidas que corrijam ou minimizem o envolvimento esquelético, neurológico, respiratório e cardíaco dessas doenças, necessitando uma equipe multidisciplinar (Kircher *et al.*, 2007).

O transplante de medula óssea pode ser empregado na MPS VI, mas sua utilização foi relegada a um segundo plano depois do surgimento da terapia de reposição enzimática (TRE), em função dos altos riscos relacionados ao transplante.

A TRE é o tratamento específico para a MPS VI, através do qual se repõe a enzima através de infusões regulares (Harmatz *et al.*, 2006). Vários estudos têm demonstrado a segurança e eficácia da TRE, embora não represente ainda a cura da doença. Já existe vasta experiência internacional (inclusive da equipe do HCPA) de TRE em crianças pequenas, havendo também relatos publicados na literatura, sendo o perfil de segurança similar ao observado em pacientes maiores. A comercialização e uso da galsulfase foi aprovada nos Estados Unidos em 2005, na Comunidade Européia em janeiro 2006, e em fevereiro de 2009 no Brasil, quando recebeu o registro da ANVISA (Giugliani *et al.*, 2010).

A terapia gênica representa uma importante perspectiva em termos de tratamento das MPS, mas as pesquisas sobre esse tema ainda estão nos estágios iniciais. O princípio básico desse tratamento é a transferência de material genético para dentro das células de um indivíduo com o objetivo de conferir um benefício terapêutico.

Um panorama abrangente sobre o tratamento foi apresentado por Giugliani *et al.* (2008) demonstrando os benefícios e uma melhor qualidade de vida para os pacientes.

2.4.3 Incidência

Várias publicações fornecem estimativas de incidência para MPS VI (tabela 1), com base nesses levantamentos, estima-se que existam cerca de 1100 pacientes em todo o mundo com MPS VI (Department of Health, 2008). No Brasil não se tem um retrato exato da MPS VI em relação a sua frequência. Alguns estudos encontraram incidências altas, sugerindo que a mesma seja maior no nosso país, mas o motivo ainda é desconhecido (Azevedo A.C.M.M., 2007). No município de Monte Santo, localizado no interior do estado da Bahia, tem sido diagnosticadas diversas doenças genéticas autossômicas recessivas. Esta observação sugere uma estrutura reprodutiva endogâmica da população. Dentre estas doenças encontram-se vários casos de MPS VI, registrados com uma frequência de aproximadamente 1:5.000, superior a de muitas doenças usualmente testadas em programas de triagem neonatal no Brasil.

Tabela 1. Incidência mundial da MPS VI

Região geográfica	Incidência calculada de MPS VI (nascidos vivos)	Referência
Monte Santo/Bahia	1:5.000	Costa-Motta <i>et al.</i> , 2011
Brasil	sem frequência exata	Coelho <i>et al.</i> , 1997
Norte de Portugal	1:238.000	Pinto <i>et al.</i> , 2004
Austrália	1:248.000	Meikle <i>et al.</i> , 1999
Holanda	1:657.000	Poorthuis <i>et al.</i> , 1999
Irlanda do Norte	1:840.000	Nelson J., 1997
Colúmbia Britânica, Canadá	1:1.298.000	Lowry <i>et al.</i> , 1990

2.5 MUNICÍPIO DE MONTE SANTO

O município de Monte Santo apresenta uma área territorial de 3.186, 87 Km². Está a uma distância de 352Km de Salvador, capital do estado, com vias pavimentadas. O município tem 52.338 habitantes com uma taxa de natalidade anual em média de 1.200 nascidos vivos registrados em 2010. A grande maioria da população 43.493 habitantes reside na zona rural. A taxa de analfabetismo da população com 15 anos ou mais anos de idade é 44,24% e a incidência de pobreza do município é de 47,85% (IBGE-2009).

Monte Santo possui 17 estabelecimentos de saúde vinculados ao Sistema Único de Saúde (SUS), um hospital com 52 leitos e um estabelecimento de saúde com apoio de diagnóstico e terapia privado (IBGE-2010). Nesse município têm sido diagnosticadas diversas doenças genéticas (autossômicas recessivas, dominantes, defeitos congênitos e distúrbios multifatoriais) que estão sendo amplamente estudadas em seus variados aspectos no projeto “Genética no Sertão” coordenado pela Dra. Angelina Xavier Acosta.

Este projeto, que foi aprovado pelo CEP da FIOCRUZ de Salvador/BA, engloba vários outros subprojetos de pesquisas em doenças genéticas e raras que estão sendo estudadas no Município de Monte Santo. Também conta com o apoio de

outras instituições e órgãos como: UFBA, UNEB, UFRB, FIOCRUZ-BA, IOC-RJ, APAE-SALVADOR, UFRGS, UFRJ, PPSUS, FAPESB, CNPq/MS e INAGEMP.

O projeto surgiu a partir dos “rumores” de alguns moradores da comunidade local, que perceberam que havia muitas crianças com algum problema de saúde. A partir desse momento a equipe médica da genética de Salvador foi até Monte Santo para investigação das doenças genéticas. O diagnóstico destas doenças sugere uma estrutura reprodutiva endogâmica da população que pode se relacionar com outras patologias crônicas, incluindo doenças raras monogênicas, assim como doenças comuns poligênicas, susceptíveis de prevenção primária, secundária e terciária (tabela 2).

Tabela 2. Níveis de prevenção das doenças, conhecido como níveis de Leavell (Autor: Hugh Leavell)

Estágio da Doença	Nível de prevenção	Tipo de Resposta
Pré-doença	Prevenção primária	Proteção da Saúde e Proteção específica
Doença latente	Prevenção secundária	Diagnóstico pré-sintomático e tratamento
Doença sintomática	Prevenção terciária	Limitação da incapacidade para doença sintomática precoce

Fonte: <http://www.inf.furb.br/sias/saude/Textos/Prevencao.htm>

2.6 TRIAGEM NEONATAL

A triagem neonatal (TN) é uma ação preventiva que permite fazer o diagnóstico de diversas doenças congênitas ou infecciosas, assintomáticas no período neonatal, a tempo de se interferir no curso da doença, permitindo, desta forma, a instituição do tratamento precoce específico e a diminuição ou eliminação das seqüelas associadas à cada doença (Portal do Ministério da Saúde). A TN é um dos vários programas de triagem populacional existentes. Atualmente, é empregada para o

diagnóstico precoce (no período neonatal, ou seja, entre 0 a 28 dias de vida) de doenças genéticas, geralmente erros inatos do metabolismo (Souza *et al.*, 2002).

A TN visa a detecção em fase pré-clínica, de distúrbios com uma evolução significativamente alterada pela introdução precoce do tratamento (Peckham e Dezateux, 1998). A TN é uma estratégia de prevenção que tem ação sobre o fenótipo e não sobre o genótipo (Knoury, 1997). As doenças a serem triadas na TN devem ser regionalizadas e baseadas nas estatísticas de saúde da população local (Ashton-Prolla *et al.*, 2001). A ansiedade gerada por um resultado alterado (podendo ser falsamente alterado) é uma complicação que deve ser levada em consideração quando da implantação e/ou análise de um programa de TN. Como qualquer método de rastreio a TN pode gerar resultados tanto falsos-positivos quanto falsos-negativos, para esses casos é necessário uma coleta de amostra de sangue do neonato (Souza *et al.*, 2002). Com a TN tornou-se possível o diagnóstico precoce de diversas doenças e a prevenção de seqüelas graves, por introduzir uma terapêutica adequada. Doenças que antes eram de mau prognóstico ou letais, com o “teste do pezinho” demonstraram uma modificação satisfatória. Praticamente não vemos crianças com hipotireodismo congênito e retardo mental grave conseqüentes da falta de tratamento em época adequada, não tendo mais o diagnóstico tardio (Braga e Fonseca, 2008). Para que estes exames serem realizados no período neonatal é necessário que sejam de execução simples e que possam ser feitos em larga escala com técnicas simples de coleta.

Nos anos 90 começou a se desenvolver a técnica de espectrometria de massa em tandem, capaz de diagnosticar de forma rápida e precisa vários erros inatos do metabolismo, permitindo a sua aplicação na TN. Esse método modificou de forma considerável a história natural de várias doenças que eram consideradas de alta morbidade e mortalidade (Braga e Fonseca, 2008).

O tratamento para as doenças diagnosticadas pela TN deve ser iniciado o mais precocemente possível para obtenção de resultados satisfatórios.

2.6.1 Triagem Neonatal para MPS VI

Uma vez que se tem o conhecimento da frequência elevada, do alto impacto social (morbidade/mortalidade), da possibilidade de diagnóstico e tratamento precoce e acessível em uma região específica, a pesquisa dessa doença pode ser incluída na TN. Anteriormente a esse projeto, um outro projeto foi desenvolvido pelo grupo de pesquisa do laboratório de genética molecular do HCPA. Nesse estudo foi realizada a análise de mutações no gene ARSB em um grupo de pacientes com MPS VI de Monte Santo/BA e seus familiares. Neste projeto a mutação p.H178L foi identificada em um paciente da região de Monte Santo e também analisada em outros pacientes com diagnóstico clínico da doença e em seus familiares. Já foram identificados 13 pacientes nesta região, em todos foi encontrada a mesma mutação e os familiares testados indicaram uma frequência de heterozigotos de 40% (Motta-Costa *et al.*, 2011). Com base nesses dados foi desenvolvido o presente projeto para detecção de portadores e afetados nos neonatos do município de Monte Santo.

Atualmente os pacientes diagnosticados com MPS VI recebem a TRE no município de Monte Santo. Foi construída uma unidade totalmente adaptada com toda infra-estrutura necessária para esses pacientes, aonde profissionais da saúde que realizam as TRE tiveram um treinamento exaustivo para realização das infusões. Os pacientes que forem diagnosticados como afetados na TN terão acesso ao tratamento o mais precocemente possível e ao aconselhamento genético sobre a forma de herança da doença. O acesso ao tratamento, baseando-se na experiência de Monte Santo, tem sido fácil e rápido, uma vez que a empresa BioMarin tem um programa de uso compassivo para crianças pequenas aprovado pela ANVISA. De acordo com os critérios estabelecidos para inclusão de doenças na triagem neonatal estabelecidos por Wilson & Junger 1968, a triagem neonatal para MPSVI é aplicável em Monte Santo (Tabela 3).

Tabela 3. Critérios de inclusão de doenças para triagem neonatal

Critérios de Inclusão para Triagem Neonatal	Aplicável para MPS VI
A doença deve ser grave	X
Ter conhecimento da história natural da doença	X
Existência de um teste para detecção precoce da doença	X
Tratamento disponível com benefícios para doença	X
Teste adequado para o diagnóstico	X
O teste deve ser aceitável pela comunidade local	X
O teste deve ser repetido em intervalos de tempos	X
Prestações de serviços adequados de saúde devem ser feitos para o trabalho extra clínico resultante da triagem	X
Os riscos, tanto físicos como psicológicos, devem ser menores do que os benefícios durante o tratamento	X
Os custos e os benefícios devem ser avaliados	NA

NA – não avaliado

3 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

O preenchimento de alguns pré-requisitos sugere que a MPS VI possa ser incluída, em programas de triagem neonatal, pelo menos em regiões selecionadas, a saber:

1) a MPS VI é uma doença que tem alta incidência relativa na região do município de Monte Santo, Bahia;

2) a possibilidade de utilizar um teste bioquímico para detectar MPS VI que pode ser modificado para aplicação em larga escala a um custo relativamente baixo, e que pode ser realizado na mesma amostra de STIPF já coletada para o “teste do pezinho”;

3) conhecimento prévio de uma mutação genética na região a ser estudada, podendo ser confirmada a suspeita de um novo caso a partir do teste bioquímico e teste molecular;

4) existência de um tratamento específico para a MPS VI, já aprovado no Brasil, que se mostra seguro e eficaz para muitas das manifestações da doença;

5) evidências preliminares de que o tratamento iniciado precocemente altera para melhor a história natural da doença.

Estas condições justificam a realização de um teste de triagem neonatal em regiões de alta incidência da doença que poderá servir de base para investigação de outras mucopolissacaridoses em áreas geográficas específicas. Ainda, a identificação de portadores nestas regiões permitirá a realização de aconselhamento genético, especialmente considerando o alto grau de endogamia nessas populações.

O Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SGM/HCPA) é centro de referência nacional e internacional para o diagnóstico das doenças lisossômicas de depósito, principalmente para as MPS. O SGM/HCPA é a sede da Rede MPS Brasil, uma parceria envolvendo diversos serviços que atendem pacientes com MPS, tendo como objetivos principais facilitar o acesso ao diagnóstico, tratamento e prevenção dessas doenças, bem como apoiar o desenvolvimento de pesquisa e ensino nesta área.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Os objetivos principais deste projeto foram:

a) Padronizar e validar o método fluorimétrico que mede a atividade enzimática da N-acetilgalactosamina-4-sulfatase em microplaca em amostras de sangue total impregnado em papel-filtro (STIPF).

b) Padronizar e adaptar as técnicas de extração de DNA e análise molecular para a mutação específica p.H178L em amostras de sangue total impregnado em papel-filtro (STIPF).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Avaliar a possibilidade de executar um programa de triagem neonatal para MPS VI em uma região com alta incidência da doença, comparando métodos bioquímicos e moleculares;

b) Identificar indivíduos afetados, heterozigotos e os eventuais casais em risco de terem filhos afetados, candidatos a um programa de tratamento, aconselhamento genético e diagnóstico pré-natal;

c) Verificar a estabilidade das amostras de STIPF para o ensaio enzimático e análise molecular, quando as mesmas são submetidas a variações de tempo e temperatura de armazenamento.

5 METODOLOGIA

5.1 POPULAÇÃO EM ESTUDO

Critérios de inclusão:

Para ser incluído no estudo, o participante deveria atender a todos os critérios abaixo relacionados:

- Ter nascido no município de Monte Santo e ser neonato.
- Ter realizado a coleta para o “teste do pezinho” nas unidades de saúde ou pelos agentes de saúde da comunidade local.
- O responsável pelo neonato ao ser informado sobre esse teste de TN para MPS VI, caso não aceite participar assinará o Termo de Dissentimento.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Para a realização do presente estudo, foram analisadas 262 amostras de STIPF de neonatos (idade de 0 a 28 dias), nascidos entre dezembro de 2010 e junho de 2011, encaminhadas para o “teste do pezinho” no município de Monte Santo. Para as padronizações das técnicas e determinação dos valores de referência foram utilizadas amostras de STIPF coletadas para a triagem neonatal de 100 neonatos, que não eram do Município de Monte Santo, gentilmente cedidas, sem identificação, pelo Centro de Triagem Neonatal (CTN) de Porto Alegre.

As amostras para os testes de estabilidade foram coletadas de controles hígidos (n= 3) adultos, e foram constituídas por doadores voluntários do Serviço de Genética Médica.

5.3 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras de sangue total coletadas em papel-filtro (STIPF) SS 903 (Scheleider & Schuell) para a triagem neonatal no município de Monte Santo-BA, após realizada a triagem para hemoglobinopatias, fenilcetonúria e hipotireoidismo, foram enviadas pela APAE/Salvador para o Serviço de Genética Médica e encaminhadas para os ensaios enzimáticos e para a análise molecular. As amostras foram enviadas semanalmente via sedex em temperatura ambiente. Após o recebimento ficaram armazenadas a temperatura de 4°C até o momento da realização dos ensaios.

5.4 DESCRIÇÃO DAS TÉCNICAS UTILIZADAS

5.4.1 Coleta e preparo das amostras de STIPF

As amostras foram obtidas por punção de calcâneo, impregnando-se o sangue total em papel-filtro SS 903. Os agentes de saúde e profissionais dos postos de saúde de Monte Santo responsáveis pela coleta foram orientados e treinados previamente para a realização das coletas e sobre a secagem e armazenamento adequado das amostras após a coleta.

5.4.1.1 Técnica da coleta do “teste do pezinho” (Ministério da Saúde, 2002)

Deve ser realizada a anti-sepsia do calcanhar com algodão ou gaze levemente umedecida com álcool 70%. Massagear bem o local, ativando a circulação até que o calcanhar esteja avermelhado e aguardar a secagem completa do álcool. A punção deve ser executada numa das laterais da região plantar do calcanhar, locais com pouca possibilidade de se atingir o osso. Em seguida deve ser segurado o pé e o tornozelo da criança, envolvendo com o dedo indicador e o polegar todo o calcanhar, de forma a imobilizar, mas não prender a circulação. Penetrar num único movimento rápido toda a ponta da lanceta (porção triangular) no local escolhido, fazendo em seguida um leve movimento da mão para a direita e esquerda, para garantir um corte suficiente para o sangramento necessário e aguardar a formação de uma grande gota de sangue. Após a formação da gota de sangue deve ser encostado o verso do papel filtro na região demarcada para a coleta (círculos) e fazer movimentos circulares com o papel, até o preenchimento de todo o círculo. O sangue deve fluir naturalmente e de maneira homogênea no papel, evitando concentração da amostra. Após o término da coleta as amostras devem secar à temperatura ambiente, após a secagem completa as amostras devem ser

colocadas em um saco plástico com um sachê de sílica e armazenadas a 4°C até o momento da realização dos exames.

Para todos os ensaios enzimáticos citados abaixo, as análises foram realizadas em duplicata e foi incluído um branco para cada amostra.

5.4.2 Ensaio enzimático da Arisulfatase B

Para o ensaio enzimático, utilizou-se disco de STIPF de 3,0mm de diâmetro, obtido com auxílio de um perfurador. Cada disco de 3,0mm contém aproximadamente 3,6 µL de sangue total (Chamoles *et al.*, 2001). Os ensaios para essa enzima foram realizados em microplaca com metade do volume de reagentes e substratos utilizados no ensaio tradicional, método descrito por Chamoles *et al.*, (2001) adaptado por Civalheiro (2006). Após o picote da amostra na microplaca foram adicionados 22,5 µL de água destilada para cada amostra, 15 µL de tampão acetato de chumbo 15 mM em sódio acetato 0,05 M pH 5,0, 37,5 µL de substrato 10 mM 4-metilumbeliferil-sulfato diluído em tampão sódio acetato 0,05 M pH 5,0. Antes da adição do substrato somente nos brancos de cada amostra foi adicionado 225 µL de tampão glicina-NAOH 0,085 M pH 10,5. Após a homogeneização, a microplaca foi fechada com uma tampa específica de microplaca para a não evaporação dos reagentes e incubada por 20 horas a 37°C, com agitação de 40 rpm em banho seco.

Após o período de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 225 µL de tampão glicina-NAOH 0,085 M somente nos testes. As amostras foram centrifugadas em uma centrífuga específica para microplaca a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C.

A fluorescência (excitação, 365nm; emissão, 450nm) foi medida no sobrenadante, no espectrofluorímetro com leitor de microplaca (Spectramax M2 - Molecular Devices). Utilizou-se uma curva de 4-metilumbeliferona e a atividade enzimática foi expressa em nmol /h/ mL.

5.4.3 Ensaio enzimático da β -galactosidase em STIPF (enzima de referência)

A medida da atividade da enzima β -galactosidase foi realizada para a avaliação da integridade das amostras em STIPF que tiveram resultados alterados. Para este ensaio foi utilizado o método descrito por Civallero *et al*, 2006. Foi utilizado um disco de 3,0 mm de diâmetro, contendo STIPF que equivale 3,6 μ L de sangue total, o ensaio foi realizado em tubo tipo eppendorf de 1,5 mL. Foram adicionados 80 μ L de tampão citrato-fosfato pH 4,4, 0,05 M, 40 μ L de substrato 4-metilumbeliferil- β -D-galactosídio, 0,8 M. Após homogeneização, as amostras foram incubadas a 37°C por 3 horas com agitação suave. Antes da adição do substrato, foram adicionados 600 μ L de tampão glicina-NAOH, 0,085 M, pH 10,5 aos tubos brancos das amostras.

Após o período de incubação a reação foi interrompida pela adição de 600 μ L de tampão glicina-NAOH 0,085 M somente aos testes. As amostras foram centrifugadas em uma centrífuga a 3000 rpm, por 10 minutos a 4°C.

A fluorescência (excitação, 365nm; emissão, 450nm) foi medida no sobrenadante, no espectrofluorímetro Spectramax M2 - Molecular Devices. Utilizou-se uma curva de 4-metilumbeliferona e a atividade enzimática foi expressa em nmol /h/ mL.

5.4.4 Ensaio enzimático da Iduronato-2-Sulfatase em STIPF (enzima para descartar deficiência múltipla de sulfatases)

A medida da atividade da enzima iduronato-2-sulfatase foi realizada para descartar a suspeita de deficiência múltipla de sulfatases nas amostras que apresentaram baixa atividade enzimática para a enzima arilsulfatase B. Neste ensaio foi utilizado o método descrito por Civallero *et al.*, (2006). Foram utilizados discos de amostras de 3.0 mm de diâmetro, contendo STIPF que equivale a 3,6 μ L de sangue total, em tubo de ensaio 10 x 75. Para a eluição das amostras foram adicionados 100 μ L de BSA 0,2%, homogeneizadas com o auxílio de um vortex e incubadas por 30 minutos a 37°C. Este material foi centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C. Incubação 1: Foram utilizados 10 μ L de amostra eluída e pipetadas em outro tubo de

ependorf, adicionados 20 μL de substrato 4-metilumbeliferil- α -2-sulfato 1,25 mM diluído em tampão acetato de sódio 0,1 M com acetato de chumbo 10 mM pH 5,0. Foram adicionados 200 μL tampão carbonato de sódio 0,5 M e bicarbonato de sódio 0,5 M com triton X100 0,025 % pH 10,7 nos tubos dos brancos das amostras. Após a homogeneização leve, o material foi incubado a 37°C por 24 horas. Incubação 2: Foram adicionados 40 μL de tampão citrato-fosfato (McIlvains duas vezes concentrado) pH 4,5 com azida de sódio 0,02 %, 10 μL da enzima LEPT. Após a homogeneização o material foi incubado novamente por mais 24 horas a 37°C. Após o período da incubação 2 a reação foi interrompida com 200 μL de tampão carbonato de sódio 0,5 M e bicarbonato de sódio 0,5 M com triton X100 0,025 % pH 10,7, somente nos tubos dos testes. As amostras foram centrifugadas novamente em uma centrífuga a 3000 rpm, por 10 minutos a 4°C.

A fluorescência (excitação, 365nm; emissão, 450nm) foi medida no sobrenadante (que foi pipetado em uma cubeta de quartzo) no espectrofluorímetro Spectramax M2 - Molecular Devices. Utilizou-se uma curva de 4-metilumbeliferona e a atividade enzimática foi expressa em nmol /h/ mL.

5.4.5 Ensaio Moleculares em amostras de Papel-Filtro

5.4.5.1 Extração de DNA em STIPF

Esse método foi adaptado de acordo com o protocolo dos fabricantes que fornecem os reagentes utilizados para extração de DNA coletado em FTA (Whatmann®). Para extração das amostras de STIPF utilizamos 10 discos de picotes de 1,5 mm de diâmetro em um tubo ependorf. Foram adicionados 200 μL de tampão FTA em seguida as amostras foram homogeneizadas com o auxílio de um vórtex e após o tampão aspirado com uma pipeta e descartado. Este processo foi repetido 3 vezes. Após, foi adicionado 200 μL de tampão FTA e a amostra incubada a 60°C por 60 minutos. Após a incubação o tampão FTA foi aspirado com uma pipeta e desprezado. Foram adicionados 200 μL de tampão TE, seguido de homogeneização com auxílio de um vórtex e logo após descarte do sobrenadante

(etapa realizada por duas vezes). Na seqüência, foram adicionados 200 µL de água de injeção aspirado e desprezado em seguida, por último foram novamente adicionados 200 µL tampão TE e aspirado com a pipeta e desprezado. Após as lavagens os tubos ficaram abertos e as amostras ficaram secando por 24 horas em temperatura ambiente para serem utilizadas na PCR.

5.4.5.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Esse método foi adaptado de acordo com os procedimentos padrões utilizados no SGM para amplificação de DNA extraído de sangue total.

Para a realização da reação foram utilizados 2,5 µL de tampão (10x), 2,5 µL de DNTP, 0,25 µL de primer reverso (éxon 3), 0,25 µL de primer forward do (éxon 3), 0,75 µL de MgCl₂, 2 µL de DMSO, 0,3 µL Taq polimerase (INVITROGEN®) e água para completar o volume final de 25uL. Após adicionamos 3 a 4 discos de amostras de STIPF e os tubos foram colocados no termociclador em programa específico para amplificação do éxon 3 do gene ARSB. Após o término do programa da PCR os resultados são obtidos através da eletroforese em gel de agarose 1,5 % contendo brometo de etídeo e visualização sob luz UV.

5.4.5.3 RFLP (para análise da mutação p. H178L)

Após a obtenção do fragmento do exon 3 amplificado pela PCR, foi realizada a digestão do mesmo com enzima de restrição *Hsp92II* ou isoesquizomero *NlaIII* que reconhecem a seqüência 5'...CATG...3'. A reação foi realizada em um volume final de 30ul contendo 3 µL de BSA, 3 µL de tampão NE Buffer 4, 0,5 µL da enzima *Hsp92 II* ou *NlaIII* e 15 µL do produto da PCR. As amostras foram incubadas em banho seco a 37°C por aproximadamente 24 horas. Após o produto da digestão foi verificado em gel de agarose 3% e visualizado sob luz UV.

5.4.5.4 Reação da PCR sem extração de DNA

Esse método foi testado inicialmente como uma alternativa para tentar melhorar a amplificação e intensidade das bandas de algumas amostras. Utilizamos os mesmos volumes e reagentes descritos acima para a amplificação porém, sem adição da enzima Taq Polimerase. Ao tubo de reação, foram adicionados 3 discos de STIPF de 1,5 mm sem tratamento anterior. As amostras foram colocadas no termociclador (PTC-100TM – MJ Research, Inc.) e submetidas a 30 ciclos de temperaturas de 94 e 46°C para a extração do DNA do papel-filtro. Após este passo foi adicionada a Taq Polimerase e os tubos submetidos novamente ao programa específico para amplificação do exon 3.

5.4.5.5 Termoestabilidade da enzima Arilsulfatase B

Para a avaliação da termoestabilidade da enzima ARSB usamos o mesmo teste descrito por Camelier *et al.*, (2011) no estudo da termoestabilidade da galactose-6-sulfatase.

Para estabilidade das amostras de STIPF para a triagem neonatal de MPS tipo VI, foram utilizadas amostras de papel filtro de 3 controles, coletadas no mesmo dia. Após a secagem das amostras, por um período de 24 horas, foi realizado o ensaio enzimático da ARSB, cujo resultado foi considerado como 100% de atividade enzimática (tempo zero). As amostras foram fracionadas e armazenadas em diferentes temperaturas de 4°C, 22°C e 37°C. Nós avaliamos a atividade enzimática após 30, 45 e 60 dias.

Para os testes moleculares usamos as mesmas amostras e condições de tempo e temperatura para avaliação da qualidade das amostras.

5.5 PÂRAMETROS AVALIADOS

No presente estudo foram avaliados:

- a) A capacidade de identificar pacientes com MPS VI, através dos métodos bioquímico e molecular utilizando amostras de STIPF.
- b) A estabilidade das amostras de STIPF, quando estas foram submetidas a diferentes tempos e temperaturas de armazenamento, para realização do ensaio da Arilsulfatase B e para a realização de extração de DNA e posterior a amplificação por PCR.

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste de Fisher foi utilizado para comparar as variáveis, análise bioquímica e molecular e as frequências de portadores. Todas as análises foram feitas com auxílio do programa estatístico SPSS versão 16.1 em um computador PC compatível e foi considerado significativo um $p < 0,05$.

5.7 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – Projeto 10-0282 (anexo A).

O projeto foi amplamente divulgado na comunidade de Monte Santo através de um folder explicativo (anexo B).

Os responsáveis pelos recém-nascidos ao fazer a coleta para o “teste do pezinho” foram informados sobre a triagem para MPS VI nessa amostra. Os responsáveis que não concordaram em participar da pesquisa assinaram o Termo de Dissentimento (anexo C).

Para os resultados de neonatos afetados identificados através da deficiência enzimática ou homozigose para a mutação p.H178L, os responsáveis serão

comunicados sobre a doença e será feito o aconselhamento genético. Neste momento será necessário realizar uma coleta de sangue heparinizado, sangue em EDTA e urina para repetição dos exames e em amostras de leucócitos e DNA. Caso os responsáveis aceitem continuar a investigação assinarão o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para a confirmação do diagnóstico (anexo D).

Para aqueles que concordarem participar nessa segunda etapa e se confirmado o diagnóstico de MPS VI, cada paciente terá acesso ao tratamento da TRE no momento da confirmação do diagnóstico.

6 DESENVOLVIMENTO

6.1 A REALIZAÇÃO DA PESQUISA

Esse estudo foi amplamente divulgado através da elaboração de folder (Anexo 1) explicativo e apresentado primeiramente numa reunião realizada em Monte Santo para a Secretaria de Saúde, agentes de saúde da família e demais técnicos da área. Após a aprovação dos profissionais da saúde, os folders foram distribuídos nos postos de saúde para a população ter conhecimento da realização do projeto de TN para MPS VI.

O desenvolvimento deste trabalho foi dividido em três etapas: na primeira foi realizada a padronização das técnicas usando STIPF em 100 amostras que foram coletadas para o “teste do pezinho” pelo laboratório CTN de Porto Alegre; na segunda foi feito um piloto de 35 amostras de STIPF de neonatos de Monte Santo para avaliação das técnicas padronizadas e para o estudo de termoestabilidade em 3 controles hígidos e na terceira, foram analisadas 262 amostras de STIPF de neonatos provenientes de Monte Santo para os dois métodos (bioquímico e molecular).

Após esta visita local, foram realizadas as análises bioquímica e molecular nas amostras dos neonatos nascidos de janeiro de 2011 até junho de 2011. Os ensaios foram realizados a medida que a APAE enviava as amostras para o nosso

serviço. Essa é uma primeira etapa da pesquisa com resultados preliminares devido ao número amostral estipulado no projeto ainda não ter sido atingido. Esse estudo terá continuidade até analisarmos amostras de um ano de nascimentos (aproximadamente 800 amostras).

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. APLEGARTH D.; TOONE, JR.; LOWRY, R.B. (2000). Incidence of inborn errors of metabolism in British Columbia, 1969-1996. **Pediatrics**, 2000,105(1):1-6.
2. ASHTON-PROLLA P.; SCHWARTZ, I.V.; BURIN, M.G.; GIUGLIANI R . 2001. Estratégias de Prevenção em erros inatos do metabolismo, pp. 211-214. In Carakushansky G.. **Doenças Genéticas em Pediatria**. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
3. AZEVEDO AC, SCHWARTZ IV, KALAKUN L, BRUSTOLIN S, BURIN MG, BEHEREGARAY AP, LEISTNER S, GIUGLIANI C, ROSA M, BARRIOS P, MARINHO D, ESTEVES P, VALADARES E, BOY R, HOROVITZ D, MABE P, DA SILVA LC, DE SOUZA IC, RIBEIRO M, MARTINS AM, PALHARES D, KIM CA, GIUGLIANI R. Clinical and biochemical study of 28 patients with mucopolysaccharidosis type VI. **Clin Genet**. 2004 Sep;66(3):208-13.
4. AZEVEDO, A. C. M. M. Mucopolissacaridose tipo VI: Um estudo Clínico e Radiológico Visando a Identificação de Fatores Associados à Gravidade da Doença. **Tese de Doutorado**. UFRGS. Porto Alegre, RS, 2007.
5. BAINES D.; KENEALLY, J. Anaesthetic implications of the mucopolysaccharidoses: A fifteen-year experience in a children`s hospital. **Anaesth Intens Care**, n.11, p.198-202, 1983.
6. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Coordenação- Geral de Atenção Especializada. Manual de Normas Técnicas e Rotinas Operacionais do Programa Nacional de Triagem Neonatal / Ministério da Saúde, Secretaria de Assistência à Saúde, Coordenação- Geral de Atenção Especializada. – Brasília: Ministério da Saúde, 2002.
7. BARTH, M. L.; GIUGLIANI R.; GONDENFUM S.; et al. Application of a flowchart for the detection of lysosomal storage diseases in 105 high-risk brazilian patients. **American Journal of Medical Genetics**, n.37, p.534-538, 1990
8. BYERS S.; ROZAKLIS T.; BRUMFIELD, L.K.; RANJERI E.; HOPWOOD J.J. (1998). Glycosaminoglycan accumulation and excretion in the mucopolysaccharidosis: characterization and basis of a diagnostic test for MPS. **Molecular Genetics Metabolis**, 1998, 65:282-290.

9. CAMELIER, M.V.; BURIN, M.G.; DE MARI, J.; VIEIRA, T.A.; MARASCA G; GIUGLIANI R. Practical and reliable enzyme test for the detection of Mucopolysaccharidosis IVA (Morquio Syndrome type A) in dried blood samples. **Clin Chim Acta**. 2011 Sep 18;412(19-20):1805-8. Epub 2011 Jun 12.
10. CAPPELLETTI R.; DEL ROSSO, M.; CHIARRUGI V. A new electrophoretic method for complete separation of all known animal glycosaminoglycans in a monodimension run. **Anal. Biochem**, n.99, p.311-315, 1979.
11. CHAMOLES, N.A.; BLANCO, M.B.; GAGGIOLI D.; CASENTINI C. (2001). Hurler-like phenotype: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. **Clin Chem. Dec**; 2001, 47(12):2098-102
12. CIVALLERO G, MICHELIN K, DE MARI J, VIAPIANA M, BURIN M, COELHO JC, GIUGLIANI R, (2006). Twelve different enzyme assays on dried-blood filter paper samples for detection of patients with selected inherited lysosomal storage diseases. **Clinica Chimica Acta** Vol. 372, Issus 1-2, October, 2006 pp 98 – 102.
13. CHIH-KUANG, C. MPS screening methods, the Berry spot and acid turbidity tests, cause a high incidence of false-negative results in Sanfilippo and Morquio Syndromes. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v.16, n.5, p.253-258, 2002.
14. COELHO J.C.M.; WAJNER M.; BURIN, M.G.; VARGAS C.; GIUGLIANI R. Selective screening of 10,000 high-risk Brazilian patients for the detection of inborn errors of metabolism. **Eur J Pediatr**. 1997 Aug;156(8):650-4.
15. COSTA-MOTTA FM, ACOSTA AX, ABÉ-SANDES K, BENDER F, SCHWARTZ IV, GIUGLIANI R, LEISTNER-SEGAL S. Genetic studies in a cluster of Mucopolysaccharidosis Type VI patients in Northeast Brazil. **Mol Genet Metab**. 2011 Sep 20.
16. DANGEL, J. H. Cardiovascular changes in children with mucopolysaccharide storage diseases and related disorders – clinical and echocardiographic findings in 64 patients. **European Journal of Pediatrics**, n.157, p.534-538, 1998
17. DE JONG, J. G.; Dimethylmethylene blue-based Spectrophotometry of glycosaminoglycan. In untreated urine: a rapid Screening procedure for mucopolysaccharidosis. **Clinical Chemistry**, v.35, n.7, p.1472, 1989.
18. DE PAULA AC, BERTOLA DR, ALBANO LMJ, et al. Achados radiológicos em pacientes com mucopolissacaridose tipo VI. **Rev Imagem** 2006;28(1):7-12.
19. Erlich HA, (1989). Polymerase chain reaction. **J Clin Immunol**. Nov; 1989, 9(6):437-47.
20. FONSECA, ARMANDO; BRAGA, CLÁUDIA. Manual de Rotinas em Triagem Neonatal. **Ed. Rubio**. 2008
21. GIUGLIANI R, HARMATZ P, WRAITH JE. Management Guidelines for Mucopolysaccharidosis VI. **Pediatrics** 2007;120:405-18.

22. GIUGLIANI R, ROJAS VM, MARTINS AM, VALADARES ER, CLARKE JT, GÓES JE, KAKKIS ED, WORDEN MA, SIDMAN M, COX GF, (2008). A dose-optimization trial of laronidase (Aldurazyme) in patients with mucopolysaccharidosis I. **Mol Genet Metab.** Jan;96(1):13-9. Epub 2008, Nov 26.
23. GIUGLIANI R, FEDERHEN A, ROJAS MV, VIEIRA T, ARTIGALÁS O, PINTO LL, AZEVEDO AC, ACOSTA A, BONFIM C, LOURENÇO CM, KIM CA, HOROVITZ D, BONFIM D, NORATO D, MARINHO D, PALHARES D, SANTOS ES, RIBEIRO E, VALADARES E, GUARANY F, DE LUCCA GR, PIMENTEL H, DE SOUZA IN, CORREA J NETO, FRAGA JC, GOES JE, CABRAL JM, SIMIONATO J, LLERENA J JR, JARDIM L, GIULIANI L, DA SILVA LC, SANTOS ML, MOREIRA MA, KERSTENETZKY M, RIBEIRO M, RUAS N, BARRIOS P, ARANDA P, HONJO R, BOY R, COSTA R, SOUZA C, ALCANTARA FF, AVILLA SG, FAGONDES S, MARTINS AM. Mucopolysaccharidosis I, II, and VI: Brief review and guidelines for treatment. **Genet Mol Biol.** 2010 Oct;33(4):589-604. Epub 2010 Dec 1.
24. Harmatz P. Enzyme replacement therapy with galsulfase for mucopolysaccharidosis VI: clinical facts and figures. **Turk J Pediatr.** 2010 Sep-Oct;52(5):443-9.
25. HARMATZ P.; GIUGLIANI R.; SCHWARTZ I.; GUFFON N.; TELES E.L.,; MIRANDA M.C. WRAITH J.E; BECK M.; ARASH L.; SCARPA M.; YU Z.F.; WITTES J.; BERGER K.I.; NEWMAN M.S.; LOWE A.M.; KAKKIS E.; SWIEDLER S.J. MPS VI Phase 3 Study Group. Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis VI: a phase 3, randomized, double-blind, placebo-controlled, multinational study of recombinant human N-acetylgalactosamine 4-sulfatase (recombinant human arylsulfatase B or rhASB) and follow-on, open-label extension study. **J Pediatr.** 2006 Apr;148(4):533-539.
26. HADDAD, F.; et al. Carpal tunnel syndrome in the Mucopolysaccharidoses and Mucopolidoses. **J Bone Joint Surg**, n.79, p.576-582, 1997.
27. HGMD—The Human Gene Mutation Database(<http://www.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/search>).
28. HUMBEL, R.; et al. Sequential thin-layer chromatography of urinary acid glycosaminoglicans. **Clin. Chim. Acta**, n.40, p.290-293, 1972.
29. HUSNY, Antonette Souto EI e FERNANDES-CALDATO, Milena Coelho. **Erros inatos do metabolismo: revisão de literatura.** *Rev. Para. Med.* [online]. 2006, vol.20, n.2, pp. 41-45. ISSN 0101-5907. MIZUNO, A.C.; FIGUEIREDO, J.B.; TEZA, I.T.V.; TAIRA, L.G.N.; SILVA, T.A.; PAIXÃO, D.L.; MIZUNO J. C. Aspectos clínicos da mucopolissacaridose tipo VI. **Rev Bras Clin Med** 2010;8(4):356-61
30. IBGE. <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>. Acesso online.
31. ISHIDA A.; PINTO J.A.; KUWAJIMA, S.S.; ET AL. DOENÇA OSTEOMETABÓLICA. IN: HEBERT S, BARROS TEPF, XAVIER R, et al. (editores). Ortopedia e traumatologia: princípios e prática. 4ª ed. Porto Alegre: **Artmed**; 2009. p. 843-7.

32. KARAGEORGOS L; BROOKS, D.A.; POLLARD A.; MELVILLE E.L.; HEIN, L.K.; CLEMENTS, P.R.; KETTERIDGE D.; SWIEDLERS, S.J.; BECK, B.M, GIUGLIANI R.; HARMATZ P.; WRAITH J.E.; GUFFONG N.; TELES E.; MIRANDA M.C.; HOPWOOD, J.J, (2007). Mutational Analysis of 105 Mucopolysaccharidosis Type VI Patients. **Hum Mutat.** Sep; 2007, 28(9):897-903.
33. KARAGEORGOS L.; HAARMATZ P.; POLLARD A.; CLEMENTS PR.; BROOKS, D,A.; HOPWOOD, J.J, (2004). Mutacional analysis of Mucopolysaccharidosis type VI patients undergoing a trial of enzyme replacement therapy. **Human Mutation**, 2004, 23:229-233.
34. KIRCHER, S. G.; et al. Therapy. In: Mucopolysaccharidoses – a guide for physicians and parents. **International Medical Publishers**, p.72 a 80, 2007.
35. KRESSE H, VON FIGURA K, KLEIN U, GLOSSI J, PASCHKE E, POHLMANN R, (1982). Enzymic diagnosis of the genetic mucopolysaccharide storage disorders. **Methods Enzymology**, 1982, 83:559.
36. KRIVIT, W.; et al. Lysosomal storage diseases treated by bone marrow transplantation. In.: **Bone Marrow transplantation: current controversions**. New York: Alan Liss, 1989, p.367-378.
37. Khoury MJ 1997. Relation between medical genetics and public healthy: changing the paradigm of disease prevention and the definition of a genetic disease. **American Journal of Medical Genetics** 71:289-291.
38. (<http://www.unifesp.br/centros/creim/tiposheranca.html>). Acesso online.
39. LITJENS T, HOPWOOD JJ. Mucopolysaccharidosis type VI: Structural and clinical implications of mutations in N-acetylgalactosamine-4-sulfatase. **Hum Mutat.** 2001 Oct;18(4):282-95.
40. LIPIELLO, L.; MANKIN, H. Thin-layer chromatographic separation of the isomeric chondroitin sulfates, dermatan sulfate and signm sulfate. **Anal. Biochem.**, n.39, p.54 -58, 1977.
41. LEISTNER S & GIUGLIANI R (1998). A useful routine for biochemical detection and diagnosis of mucopolysaccharidoses. **Genet. Mol. Biol.** Vol. 21 n. 1 São Paulo Mar. 1998.
42. LITJENS T, BAKER EG, BECKMANN KR, HOPWOOD JJ, (1989). Chromosomal localization of ARSB, the gene of human N-acetylgalactosamine-4-sulfatase. **Hum Genet**, 1989, 82:67-68.
43. LOWRY RB, APPLGARTH DA, TOONE JR, MCDONALD E, THUNEM NY. An update of mucopolysaccharide syndromes in British Columbia. **Hum Genet**, 1990;85:389-390.
44. MILLER *et al.*, (1988) S.A. Miller, D.D. Dykes and H.F. Polesky, (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids**

Res 16 (3) (1988), p. 1215.

45. MEIKLE P. J.; HOPWOOD J. J.; CLAQUE A. E.; CAREY W. F. Prevalence of Lysosomal storage disorders. **JAMA**, 1999. Jan;281: 249 – 54.
46. Muenzer J. The mucopolysaccharidoses: a heterogeneous group of disorders with variable pediatric presentations. **J Pediatr**. 2004 May;144(5 Suppl):S27-34.
47. NELSON J. Incidence of the Mucopolysaccharidoses in Northern Ireland. **HUM GENET**. 1997 DEC, 101 (3):355-8.
48. NEUFELD E.; MUENZER J, (2001). The mucopolysaccharidoses In: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease (ed.: Scriver C. et. al.). **McGraw Hill**, New York, 8th ed., 2001, pp. 3421-3452.
49. Níveis de prevenção das doenças. <http://www.inf.furb.br/sias/saude/Textos/Prevencao.htm>. Acesso online.
50. PECKHAM CS, DEZATEUX C 1998. Issues underlying the evaluation of screening programmes. **Br. Med. Bull.** 54 (4):767-778.
51. PENNOCK, C.A. A review and selection of simple laboratory methods used for the study of glycosaminoglycan excretion and the diagnosis of the mucopolycchacaridoses. **J. Clin. Path**, n.29, p.111-128, 1976.
52. PETERS C,; ROMMERSKIRCH W,; MODARESSI S,; VON FIGURA K, (1991). Restoration of arylsulphatase B activity in human mucopolysaccharidosis-type-VI fibroblasts by retroviral-vector-mediated gene transfer. **Biochem J**. Jun 1991, 1;276 (Pt 2):499-504.
53. PETRY MFG, DIETER T, BURIN MG, GIUGLIANI R, LEISTNER S, (2003). Identification of a novel mutation in the ARSB gene that is frequent among brazilian MPS VI patients. **Genetic Testing**, 2003,7:347-349.
54. PETRY, M.F.G.; NONEMACHER K.; SEBEN J.C.; SCHWARTZ I.V.D.; AZEVED, A,C,M,; BURIN, M.G,; REZENDE, A.R,; KIM C.A,; GIUGLIANI R,; LEISTNER-SEGAL S, (2005). Mucopolysaccharidosis type VI: Identification of novel mutations on the arylsulphatase B gene in South American patients. **J Inherit Metab Dis**, 2005, 28:1027–1034.
55. PINTO R, CASEIRO C, LEMOS M, et al. Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal. **Eur J Hum Genet**. 2004;12:87-92.
56. POGGI F; RABIER D; VASSAULT A; CHARPENTIER C; KAMOUN P; SAUDUBRAY J. M. Protocol of Metabolic Investigations in Hereditary Metabolic Diseases. **ARCH PEDIATR**. 1994 JUL 1(7): 667-73.
57. POORTHUIS BJ, WEVERS RA, KLEIJER WJ, GROENER JE, DE JONG JG, VAN WEELY S, NIEZEN-KONING KE, VAN DIGGELEN OP. The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. **Hum Genet**. 1999 Jul-Aug;105(1-2):151-6.

58. READ A, DONNAI D. Genética clínica - Uma nova abordagem. **Ed. Artmed** (2008).
59. SANSEVERINO, MT; KESSLER, RG; BURIN, MG; STEIN, NR; HERMAN, RF; MATTE U; MAGALHÃES, JA. Diagnóstico pré-natal: avanços e perspectivas. **Revista HCPA**. 2001 (3)
60. SCHWARTZ I, MATTE U, LEISTNER S, GIUGLIANI R, (2001). Mucopolissacaridoses. In: Doenças Genéticas em Pediatria. (ed: Gerson Karakushansky) **Guanabara Koogan**, Rio de Janeiro, 2001, pp 180-184.
61. SANCHEZ, M.; Mucopolisacaridosis. In.: SANRURJO, P.; BALDELLOU, A. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias. **Majadahonda: Ergon**, 2006. p.621-629 Kessler, MAIRA G. BURIN, NINA R. STEIN, RAFAELA F. HERMAN, URSULA MATTE, JOSÉ A. Magalhães. Diagnóstico pré-natal: avanços e perspectivas. **Revista HCPA**. 2001 (3).
62. MEIKLE PJ, RANIERI E, RAVENSCROFT EM, HUA CT, BROOKS DA, HOPWOOD JJ. Newborn screening for lysosomal storage disorders. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**. 1999;30 Suppl 2:104-10.
63. SOUZA, CFM; SCHWARTZ, IV; GIUGLIANI R. **Triagem neonatal de distúrbios metabólicos**. *Ciênc. saúde coletiva [online]*. 2002, vol.7, n.1, pp. 129-137. ISSN 1413-8123.
64. SPRANGER JW, KOCH F, MCKUSICK VA, NATZSCHKA J, WIEDEMANN HR, ZELLWEGER H. Mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy's disease). **Helv Paediatr Acta**. 1970 Oct;25(4):337-62.
65. SOUZA C. F. M., SCHWARTZ I, GIUGLIANI R. **Ciência e Saúde Coletiva**, 7(1):129-137, 2002.
66. STEVENS, J. M.; et al. The odontoid process in Morquio – Brailsford's disease. The effects of occipitocervical fusion. **The Journal of Bone and joint surgery**, v.73, n.5, p.851-858, 1991.
67. TAGER, J. M.; et al. Metabolic consequences of genetic defects in lysosomes. **Biochem. Soc. Trans**, n.12, p.902-905, 1984.
68. WHITLEY, C. B.; et al. Urine glycosaminoglycan excretion quantified by an automated semimicro method in specimens conveniently transported from around the globe. **Molecular Genetics and Metabolism**, n.75, p.56-64, 2002.
69. WICKER G, PRILL V, BROOKS D, GIBSON G, HOPWOOD J, VON FIGURA K, PETERS C, (1991). Mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome). An intermediate clinical phenotype caused by substitution of valine for glycine at position 137 of arylsulfatase B. **J Biol Chem**. Nov 15, 1991;266(32):21386-91.

70. WILSON J MG, JUNGER G. Principles and practice of screening for disease.
<http://www.gp-training.net/training/tutorials/management/audit/screen.htm>. Accesso online.
71. WRAITH, J. E. The mucopolysaccharidoses: a clinical review and guide to management. **Arch Dis in Child**, n.72, p.263-267, 1996.

8 ARTIGO EM PORTUGUÊS

ADAPTAÇÃO DE MÉTODOS BIOQUÍMICOS E MOLECULARES PARA A TRIAGEM NEONATAL DE MUCOPOLISSACARIDOSE VI (SÍNDROME DE MAROTHEUX-LAMY)

Fernanda Bender^{1 2}, Maira G. Burin¹, Fabiana Moura Costa-Motta^{1,2}, Antônio Purificação⁶, Tatiana Amorim⁷, Angelina Acosta Xavier^{4,5}, Roberto Giugliani^{1 2 3 4} e Sandra Leistner-Segal^{1 2}

¹ Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brasil.

² Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas, UFRGS. Porto Alegre, RS, Brasil.

³ Departamento de Genética da UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

⁴ INAGEMP - Instituto Nacional de Genética Médica Populacional, Porto Alegre, RS, Brasil

⁵ Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, BA, Brasil

⁶ APAE – Salvador, BA, Brasil

⁷ Serviço de Genética Médica, HUPES/UFBA, Salvador, BA, Brasil

Autor correspondente:

Profa. Sandra Leistner-Segal, PhD

Serviço de Genética Médica - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350 - 90035-903 – Porto Alegre – RS - Brasil

Tel 51 33598011 - Fax 51 33598010

Email: ssegal@hcpa.ufrgs.br

Palavras-Chave: Mucopolissacaridose VI, Síndrome de Maroteux-Lamy, Doenças Lisossômicas, Glicosaminoglicanos, Sangue Impregnado em Papel Filtro, Triagem Neonatal

RESUMO

A Mucopolissacaridose tipo VI (MPS VI) ou Síndrome de Maroteux-Lamy, é uma doença autossômica recessiva causada pela deficiência da enzima lisossomal N-acetilgalactosamina-4-sulfatase (ARSB), a qual resulta no armazenamento lisossômico de dermatan sulfato em vários tecidos e órgãos e dá origem a um espectro clínico variável, incluindo formas mais graves e mais atenuadas. A síndrome de Maroteux-Lamy não tem uma incidência definida no Brasil, entretanto, sabemos que no nosso meio é muito mais frequente do que relatado nos demais países ao redor do mundo. Como tratamento a terapia de reposição enzimática (TRE) é o mais aconselhável, mostrando bons resultados e melhoras no prognóstico dos pacientes quando iniciada em idade precoce. Nós descrevemos neste trabalho uma padronização em microplaca utilizando o método fluorimétrico para o ensaio da ARSB e uma nova metodologia de análise molecular, ambos adaptados para sangue total impregnado em papel filtro (STIPF). Essas padronizações foram desenvolvidas para inclusão da triagem neonatal para MPS VI nas mesmas coletas do “teste do pezinho” nos recém-nascido do município de Monte Santo, Bahia, Brasil. Os métodos foram desenvolvidos para detecção de pacientes com MPS VI e também para portadores, uma vez que a doença parece ter uma alta incidência (ao redor de 1:5.000) nesta localidade, e que todos os pacientes já diagnosticados nesse município apresentavam a mesma mutação (p.H178L) em homozigose. Para a padronização das técnicas foram utilizadas amostras que foram coletadas para o “teste do pezinho”, tendo sido feito ainda um teste piloto com amostras de recém-nascidos de Monte Santo para avaliação das técnicas padronizadas anteriormente e para o estudo de termoestabilidade em controles hígidos. Finalmente, foram analisadas amostras de recém-nascidos provenientes de Monte Santo pelos dois métodos (bioquímico e molecular) para a triagem neonatal de MPS VI. A padronização em microplaca para a atividade enzimática fluorimétrica da ARSB foi realizada em nosso laboratório e o ensaio permitiu, diferenciar os valores de normais e afetados e/ou portadores, possibilitando uma detecção segura de pacientes com MPS VI. Nas padronizações e adaptações para análise molecular em STIPF foi possível diferenciar os resultados de indivíduos normais, heterozigotos e afetados para a mutação p.H178L. O uso de amostras de STIPF do “teste do pezinho” facilita

a etapa de coleta quando se trata de recém-nascido e o transporte, é de extrema importância para testar pacientes quando se tem conhecimento da doença em uma região específica. O protocolo desenvolvido de triagem neonatal para MPS VI, pode ser facilmente incorporado aos protocolos de laboratórios de referência, contribuindo para a detecção precoce de pacientes afetados.

INTRODUÇÃO

A síndrome de Maroteaux-Lamy ou mucopolissacaridose tipo VI (MPS VI) é uma doença autossômica recessiva, causada por um defeito intralisossomal que afeta a degradação do glicosaminoglicano (GAG) dermatan sulfato, sendo o diagnóstico usualmente confirmado pela deficiência na atividade da enzima N-acetilgalactosamina-4-sulfatase (arilsulfatase B – ARSB) em leucócitos. O acúmulo dos GAGs é responsável pelas características fenotípicas da doença (Neufeld e Muenzer, 2001; Schwartz *et al.*, 2001).

Pacientes com MPS VI clinicamente apresentam baixa estatura, dismorfismo facial, opacidade de córnea, otite média recorrente, pneumonia, doença obstrutiva das vias aéreas, valvulopatia cardíaca, esplenomegalia, hérnia umbilical e inguinal, rigidez e contraturas articulares e anormalidades esqueléticas. A inteligência normal é preservada neste tipo de MPS (Azevedo *et al.*, 2004). Outra diferença entre as síndromes é a sobrevida, que é maior nos pacientes com MPS VI (Ishida *et al.*, 2009). A maioria dos pacientes apresenta os primeiros sinais da doença na infância (hepatoesplenomegalia, face infiltrada e retardo de crescimento), mais comumente entre 1 e 3 anos de idade (De Paula *et al.*, 2006). O diagnóstico definitivo da MPS VI é estabelecido através da medida da atividade da ARSB, utilizando leucócitos ou fibroblastos cultivados, usualmente através do método de absorvância (Kresse *et al.*, 1982).

Embora a MPS VI seja uma das MPS mais raras em escala mundial (Meike *et al.*, 1999; Poorthuis *et al.*, 1999), é uma das mais frequentes nos levantamentos disponibilizados pela Rede MPS Brasil, do Serviço de Genética Médica do HCPA (dados não publicados).

O gene da ARSB está localizado no braço longo do cromossomo 5, na região 5q13.3 – 5q14.1 (Litjens *et al.*, 1989). Desde a primeira mutação descrita por Wicker *et al.* (1991) no gene ARSB, uma série de outras mutações foram sendo identificadas, somando aproximadamente 130 mutações até o presente momento (HGMD; Litjens & Hopwood, 2001; Karageorgos *et al.*, 2004, Petry *et al.*, 2003, Petry *et al.*, 2005, Karageorgos *et al.*, 2007). A maioria dos alelos mutantes está presente em somente um ou poucos pacientes, indicando uma grande heterogeneidade alélica da MPS VI (Litjens & Hopwood, 2001).

O Município de Monte Santo, localizado no interior do estado da Bahia, apresenta uma área territorial de 3.186,87 Km² e tem cerca de 52.000 habitantes com uma taxa de anuidade em média de 1.200 nascidos vivos. A grande maioria da população (80 %) reside na zona rural e a taxa de analfabetismo nos indivíduos com 15 anos ou mais é de 44 % com uma incidência de pobreza de 48 %.(IBGE-2009). Nesse município têm sido diagnosticadas diversas doenças genéticas (autossômicas recessivas, dominantes, defeitos congênitos e distúrbios multifatoriais) que estão sendo amplamente estudadas em seus variados aspectos num projeto chamado “Genética no Sertão”.

Dentre as doenças genéticas desta região, a MPS VI apresenta uma alta incidência. Em outro estudo desenvolvido pelo mesmo grupo de pesquisa, a mutação p.H178L (descrita por Karageorgos *et al.*, 2007) foi identificada em um paciente brasileiro da região de Monte Santo e está sendo analisada nos pacientes com diagnóstico clínico da doença e em seus familiares. Já foram identificados 13 pacientes nesta região e os familiares testados indicaram uma frequência de heterozigotos de 40% (Motta-Costa *et al.*, 2011).

A MPS VI já tem tratamento específico, a terapia de reposição enzimática, que tem reconhecido impacto positivo na evolução dos pacientes (Giugliani *et al.*, 2007). Evidências recentes indicam que o tratamento precoce modifica para melhor o prognóstico da doença (McGill, 2010). Este fato justifica a importância da existência de uma técnica simples, fácil para a detecção precoce da deficiência enzimática e da mutação específica em uma amostra conveniente, como a amostra coletada para o “teste do pezinho”.

O uso de amostras de sangue seco coletadas em pape- filtro (STIPF) para o “teste do pezinho”, pode ser uma alternativa para a triagem neonatal de MPS VI e outras doenças lisossômicas. Através do diagnóstico neonatal seria possível dar

início ao tratamento precoce e assim possibilitar um melhor prognóstico e conseqüentemente uma melhor qualidade de vida para os pacientes.

MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto de triagem neonatal para MPS VI foi amplamente divulgado para a comunidade de Monte Santo através da elaboração de um folder explicativo sobre a doença e a proposta do mesmo. Todos os profissionais da saúde e coletadores do “teste do pezinho” foram orientados sobre a importância da triagem neonatal e treinados sobre as condições de secagem e armazenamento das amostras.

Todos os responsáveis pelos recém-nascidos foram informados sobre a triagem neonatal para MPS VI, essa informação foi reforçada no momento da coleta do “teste do pezinho”. Os responsáveis que não concordaram em participar da triagem para MPS VI, assinaram o termo de dissentimento (aprovado pelo comitê de ética e pesquisa do HCPA). Amostras de sangue impregnado em papel filtro (STIPF) foram obtidas de 262 neonatos (0 a 28 dias) e foram enviadas para o nosso serviço pela APAE de Salvador/BA. Após o recebimento, as amostras foram armazenadas a 4°C até a realização dos ensaios.

O desenvolvimento deste trabalho foi dividido em três etapas: na primeira foi realizada a padronização das técnicas e determinação dos valores de referência utilizando STIPF em 100 amostras que foram coletadas para o “teste do pezinho” pelo laboratório CTN de Porto Alegre. Na segunda foi feito um estudo de termoestabilidade em 3 controles hígidos. Na terceira foi feito um piloto com 35 amostras de recém-nascidos de Monte Santo, seguido da análise de 262 amostras de recém-nascidos provenientes de Monte Santo para os dois métodos (bioquímico e molecular).

No ensaio enzimático para a medida da atividade da ARSB, utilizou-se disco de STIPF de 3,0mm de diâmetro, obtido com auxílio de um perfurador. Cada disco de 3,0mm de diâmetro contém aproximadamente 3,6 µL de sangue total (Chamoles *et al.*; 2001). Os ensaios para essa enzima foram realizados em microplaca reduzindo à metade do volume de reagentes e substratos utilizados no ensaio tradicional, método descrito por Chamoles *et al.*,(2001) adaptado por Civalheiro et

al.,(2006). Após o picote da amostra na microplaca foram adicionados 22,5 µL de água destilada para cada amostra, 15 µL de tampão acetato de chumbo 15 mM em sódio acetato 0,05 M pH 5,0, 37,5 µL de substrato 10 mM 4-metilumbeliferil-sulfato diluído em tampão sódio acetato 0,05 M pH 5,0. Antes da adição do substrato somente nos brancos de cada amostra foi adicionado 225 µL de tampão glicina-NAOH 0,085 M pH 10,5. Após a homogeneização, a microplaca foi fechada com uma tampa específica de microplaca para a não evaporação dos reagentes e incubada por 20 horas a 37°C, com agitação de 40 rpm em banho seco.

Após o período de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 225 µL de tampão glicina-NAOH 0,085 M somente nos testes. As amostras foram centrifugadas em uma centrífuga específica de microplaca a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C. A fluorescência (excitação, 365nm; emissão, 450nm) foi medida no sobrenadante, no espectrofluorímetro com leitor de microplaca (Spectramax M2 - Molecular Devices). Utilizou-se uma curva de 4-metilumbeliferona e a atividade enzimática foi expressa em nmol /h/ mL.

Nos casos em que a atividade da ARSB foi baixa analisou-se a atividade da iduronato sulfatase pelo método descrito por Civallero *et al.*, (2006) a fim de descartar deficiência múltipla de sulfatase. Utilizou-se como enzima de referência a beta-galactosidase descrito por Chamoles *et al.*, (2001) com o propósito de testar a integridade da amostra em todas as amostras com resultados alterados para ARSB.

Para o ensaio molecular utilizamos a reação da PCR sem extração prévia de DNA das amostras de STIPF. Esse método foi adaptado e comparado com a lavagem do papel filtro com os reagentes utilizados para sangue impregnado em papel FTA. A PCR foi realizada num volume final de 25µL, e foram utilizadas as seguintes concentrações de reagente: tampão invitrogen 1X dNTP 0,2mM, 5µm de cada primer para amplificação do éxon 3, 1,5mM, MgCl₂ e 10% de DMSO. Após foram adicionados 3 a 4 discos de 1,5 mm de diâmetro de STIPF e as amostras foram colocadas em termociclador (PTC -100TM – MJ Research, Inc.) e submetidas a 30 ciclos de temperaturas de 94 e 46°C para a extração do DNA do papel-filtro. Após este passo foi adicionada 1U da Taq Polimerase e os tubos submetidos novamente ao programa específico para amplificação do exon 3.

Após a obtenção do fragmento do exon 3 amplificado pela PCR, foi realizada a digestão do mesmo com enzima de restrição *Hsp92II* ou seu isoesquizomero *NlaIII* que reconhecem a seqüência 5'...CATG...3' no alelo normal. A reação foi realizada

em um volume final de 35 μL contendo 13,5 μL de água de injeção, 3 μL de BSA, 3 μL de tampão (específico da enzima) 0,5 μL da enzima *Hsp92* II ou *NlaIII* e 15 μL do produto da PCR. As amostras foram incubadas em banho seco a 37°C por aproximadamente 24 horas. Após o produto da digestão foi verificado em gel de agarose 3% e visualizado sob luz UV.

Para a termoestabilidade, as amostras de STIPF foram avaliadas em diversas condições de armazenamento (temperatura e tempo em dias) de acordo com o método adaptado de Camelier *et al.*, (2011). Utilizamos amostras coletadas de 3 controles hígidos. Após coleta e secagem do STIPF durante a noite à temperatura ambiente (22°C), a medida da atividade da ARSB foi realizada e considerada 100% (tempo 0). As amostras foram fracionadas e armazenadas em diferentes temperaturas de 4°C, 22°C e 37°C. Nós avaliamos a atividade enzimática após 30, 45 e 60 dias.

Para o teste molecular usamos as mesmas amostras e condições de tempo e temperatura para avaliação da eficiência da amplificação das amostras por PCR.

Para as 262 amostras com os resultados concluídos, usamos o teste de Fisher para comparar as duas variáveis (análise bioquímica e molecular). Para a análise bioquímica realizamos todos os ensaios em duplicata para melhor confiabilidade nos resultados obtidos.

Todas as análises foram realizadas usando o programa estatístico SPSS, versão 16.1 em um computador compatível PC.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As principais adaptações do método da padronização em microplaca para o ensaio enzimático da ARSB em amostras de STIPF foram a redução dos volumes de reagentes e substrato à metade, gerando um custo menor de gastos em reagentes em relação da técnica descrita por Chamoles *et al.*, (2001) adaptada por Civallero *et al.*, (2006) que é usada na rotina no nosso laboratório. O tempo das leituras em microplaca é muito mais rápido em relação as leituras dos ensaios realizados em tubos de eppendorf.

Para o método molecular, conseguimos adaptar a técnica da PCR sem a realização da extração de DNA das amostras de STIPF, proporcionando assim menos gastos com reagentes e tempo reduzido para a realização das análises. A amplificação por PCR em amostras sem tratamento prévio resultou num sinal de intensidade melhor.

No estudo piloto das 35 amostras de STIPF três amostras apresentaram medida da atividade enzimática da ARSB abaixo do limite inferior dos valores de referência normais. Nas análises moleculares encontramos um heterozigoto para a mutação p.H178L e as demais amostras tiveram todos os resultados normais.

Para os resultados preliminares analisamos um total de 262 amostras e comparamos os resultados da atividade da ARSB com os resultados moleculares de STIPF, utilizando o teste estatístico exato de Fisher considerando o teste molecular como padrão ouro para a triagem. Na medida da atividade enzimática da ARSB encontramos como resultado: 247 indivíduos apresentaram atividade enzimática dentro dos valores de referência de normais, 15 com atividades abaixo do limite inferior de referência. Nas análises moleculares encontramos 259 indivíduos normais, 3 heterozigotos para mutação p.H178L e nenhum afetado.

Os ensaios enzimáticos quando alterados requerem a confirmação em nova amostra de STIPF ou em leucócitos para o diagnóstico final. Neste projeto, este procedimento foi considerado desnecessário, uma vez que os resultados alterados foram confirmados através da análise molecular.

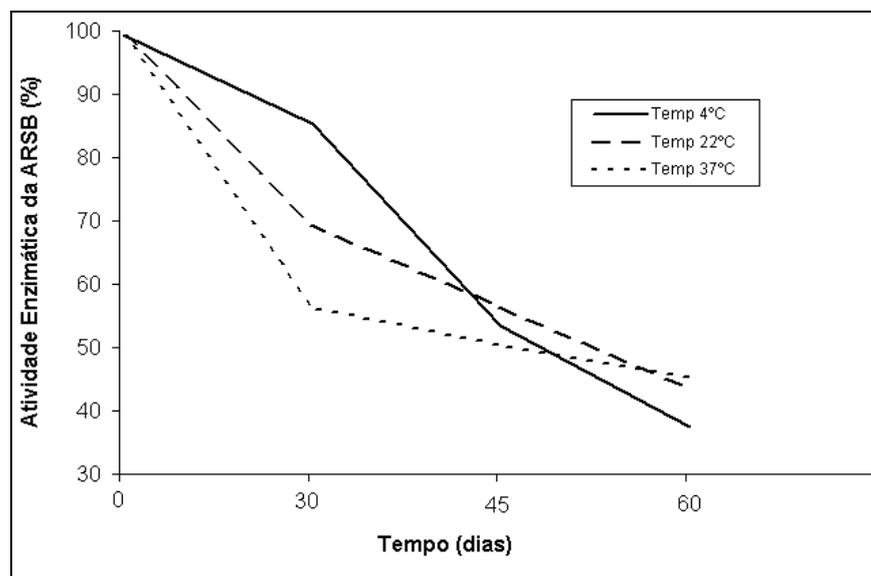
Com o teste estatístico, foram calculadas as frequências de resultados obtidos considerando as análises bioquímica e molecular, obtendo-se uma significância de $p < 0,002$ (tabela 1). Esses resultados demonstraram que a análise molecular possivelmente pode substituir a análise bioquímica em regiões como a de Monte Santo, na qual se tem o conhecimento sobre a prevalência relativa de uma mutação específica.

Tabela 1. Freqüência dos resultados obtidos nas análises bioquímica e molecular.

	Bioquímica	Molecular	Total
Normal	94% (n= 247)	99% (n= 259)	
Alterado	6% (n=15)	1% (n= 3 heterozigotos)	
Total	100% (n=262)	100% (n=262)	P=0,002

Os testes de estabilidade mostraram que, quando as amostras foram mantidas a temperaturas de 4, 22 e 37 ° C, a atividade teve uma diminuição significativa da ARSB após 30 dias da coleta, principalmente para o material mantido a 22 e 37°C (Figura 1). Esses resultados concordam com o trabalho de Camelier *et al.*, (2011) que mostra uma perda de atividade significativa na avaliação da termoestabilidade da galactose-6-sulfatase. Outro estudo recente de Castilhos *et al.*,(2011) mostra a termoestabilidade de três enzimas, incluindo a ARSB, que também obteve perda de atividade, porém utilizando intervalos de tempos diferentes.

Figura 1. Teste de termoestabilidade para a ARSB em STIPF



Essas mesmas amostras foram avaliadas quanto à estabilidade para a análise molecular. Nesses ensaios as amostras amplificaram durante os 60 dias

após as coletas e em todas as condições de temperatura. Mostrando assim uma reprodutibilidade maior nos resultados obtidos na análise molecular.

Esses resultados indicam que amostras de STIPF para medida da atividade da ARSB devem ser coletadas, enviadas ao laboratório imediatamente e armazenadas a 4°C até o momento da análise (que não deve ser superior a 30 dias). O cuidado com a coleta adequada, secagem da amostra, identificação, data da coleta e envio da mesma em STIPF, são fatores que podem influenciar nos resultados, quando não realizados corretamente. Aqui cabe ressaltar que 5 das 15 amostras com resultado alterado estavam armazenadas em tempo 60 dias após a coleta e em todos os resultados da análise molecular foram normais.

Nas amostras nas quais a atividade da ARSB foi alterada, realizamos a análise da β -galactosidase como enzima de referência e a medida da atividade da iduronato sulfatase, para descartar a possibilidade de deficiência múltipla de sulfatases. Em todos os RN testados as atividades de ambas as enzimas foram normais. Estas análises não puderam ser realizadas em 3 dos RN com atividade da ARSB alterada devido à insuficiência da amostra.

Este método de triagem em amostras de STIPF permitiu um teste enzimático prático e seguro para a identificação de pacientes com MPS VI quando o resultado bioquímico pode ser confirmado com o resultado molecular. O trabalho mostrou que amostras de STIPF podem ser usadas para detectar pacientes com MPS VI, como um método que poderia ser facilmente incorporado aos protocolos dos laboratórios de referência, possibilitando uma rápida identificação de pacientes afetados, especialmente quando se tem o conhecimento prévio da mutação recorrente na família ou em determinada região geográfica. Com a terapia de reposição enzimática disponível para MPS VI, sabemos da importância e das vantagens do paciente com diagnóstico precoce, mostrando uma melhora considerável no quadro clínico e qualidade de vida.

Com esses resultados preliminares podemos concluir que a metodologia desenvolvida para a triagem neonatal de MPS VI é eficiente para a detecção precoce da doença na região estudada.

A continuidade do estudo com aumento do tamanho da amostra será fundamental para permitir o cálculo da frequência da mutação e do número estimado de heterozigotos e homozigotos na região estudada.

AGRADECIMENTOS

Nós agradecemos aos coletadores do “teste do pezinho” de Monte Santo. A APAE de Salvador que nos enviou as amostras de sangue de SIPF. Ao Juarez Huve que realizou as coletas dos controles hígidos para os testes de estabilidade. Nós gostaríamos de dar um agradecimento especial ao FIPE/HCPA, UFRGS, CNPq, Rede MPS Brasil, BIOMARIN, INAGEMP pelo suporte parcial deste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. CAMELIER MV, BURIN MG, DE MARI J, VIEIRA TA, MARASCA G, GIUGLIANI R. Practical and reliable enzyme test for the detection of Mucopolysaccharidosis IVA (Morquio Syndrome type A) in dried blood samples. **Clin Chim Acta**. 2011 Sep 18;412(19-20):1805-8. Epub 2011 Jun 12.
2. CASTILHOS CD, MEZZALIRA J, GOLDIM MP, WERLANG FG, COELHO JC. Effect of sample collection, temperature and time of storage on β -galactosidase and total hexosaminidase activities in dried blood collected on filter paper. **Clin Chem Lab Med**. 2011 Aug;49(8):1299-302. Epub 2011 May 17.
3. CHAMOLES NA, BLANCO MB, GAGGIOLI D, CASENTINI C, (2001). Hurler-like phenotype: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. **Clin Chem**. Dec; 2001, 47(12):2098-102
4. CIVALLERO G, MICHELIN K, DE MARI J, VIAPIANA M, BURIN M, COELHO JC, GIUGLIANI R, (2006). Twelve different enzyme assays on dried-blood filter paper samples for detection of patients with selected inherited lysosomal storage diseases. **Clinica Chimica Acta** Vol. 372, Issus 1-2, October, 2006 pp 98 – 102
5. COSTA-MOTTA FM, ACOSTA AX, ABÉ-SANDES K, BENDER F, SCHWARTZ IV, GIUGLIANI R, LEISTNER-SEGAL S. Genetic studies in a cluster of Mucopolysaccharidosis Type VI patients in Northeast Brazil. **Mol Genet Metab**. 2011 Sep 20.
6. DE PAULA AC, BERTOLA DR, ALBANO LMJ, et al. Achados radiológicos em pacientes com mucopolissacaridose tipo VI. **Rev Imagem** 2006;28(1):7-12.
7. GIUGLIANI R, HARMATZ P, WRAITH JE. Management Guidelines for Mucopolysaccharidosis VI. **Pediatrics** 2007;120;405-18.

8. ISHIDA A, PINTO JA, KUWAJIMA SS, *et al.* Doença osteometabólica. In: Hebert S, Barros TEPF, Xavier R, *et al.* (editores). Ortopedia e traumatologia: princípios e prática. 4ª ed. Porto Alegre: **Artmed**; 2009. p. 843-7.
9. KARAGEORGOS L, BROOKS DA, POLLARD A, MELVILLE EL, HEIN LK, CLEMENTS PR, KETTERIDGE D, SWIEDLERS SJ, BECKB M, GIUGLIANI R, HARMATZ P, WRAITH JE, GUFFONG N, LEÃO TELES E, SÁ MIRANDA MC, HOPWOOD JJ, (2007). Mutational Analysis of 105 Mucopolysaccharidosis Type VI Patients. **Hum Mutat.** Sep; 2007, 28(9):897-903.
10. KARAGEORGOS L, HAARMATZ P, POLLARD A, CLEMENTS PR, BROOKS DA, HOPWOOD JJ, (2004). Mutational analysis of Mucopolysaccharidosis type VI patients undergoing a trial of enzyme replacement therapy. **Human Mutation**, 2004, 23:229-233.
11. KRESSE H, VON FIGURA K, KLEIN U, GLOSSI J, PASCHKE E, POHLMANN R, (1982). Enzymic diagnosis of the genetic mucopolysaccharide storage disorders. **Methods Enzymology**, 1982, 83:559.
12. HGMD—The Human Gene Mutation Database (<http://www.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/search>).
13. IBGE. <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>. Acesso online.
14. LITJENS T; HOPWOOD JJ. Mucopolysaccharidosis type VI: Structural and clinical implications of mutations in N-acetylgalactosamine-4-sulfatase. **Hum Mutat.** 2001 Oct;18(4):282-95.
15. LITJENS T, BAKER EG, BECKMANN KR, HOPWOOD JJ, (1989). Chromosomal localization of ARSB, the gene of human n-acetylgalactosamine-4-sulfatase. **Hum Genet**, 1989, 82:67-68.
16. PETRY MFG, DIETER T, BURIN MG, GIUGLIANI R, LEISTNER S, (2003). Identification of a novel mutation in the ARSB gene that is frequent among Brazilian MPS VI patients. **Genetic Testing**, 2003,7:347-349.
17. PETRY, M.F.G.; NONEMACHER K.; SEBEN J.C.; SCHWARTZ I.V.D.; AZEVEDO, A.C.M.; BURIN, M.G.; REZENDE, A.R.; KIM, C.A.; GIUGLIANI R.; LEISTNER-SEGAL S, (2005). Mucopolysaccharidosis type VI: Identification of novel mutations on the arylsulphatase B gene in South American patients. **J Inherit Metab Dis**, 2005, 28:1027–1034.
18. POORTHUIS BJ, WEVERS RA, KLEIJER WJ, GROENER JE, DE JONG JG, VAN WEELY S, NIEZEN-KONING KE, VAN DIGGELEN OP. The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. **Hum Genet.** 1999 Jul-Aug;105(1-2):151-6.
19. MCGILL JJ, INWOOD AC, COMAN DJ, LIPKE ML, DE LORE D, SWIEDLER SJ, HOPWOOD JJ (2010). Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis VI from 8 weeks of age—a sibling control study. **Clin Genet.** 77:492-8.

20. MEIKLE P. J.; HOPWOOD J. J.; CLAQUE A. E.; CAREY W. F. Prevalence of Lysosomal storage disorders. **JAMA**, 1999. Jan;281: 249 – 54.
21. MILLER *et al.*, (1988) S.A. Miller, D.D. Dykes and H.F. Polesky, (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells, **Nucleic Acids Res**, 16 (3) (1988), p. 1215.
22. MIZUNO, A.C.; FIGUEIREDO, J.B.; TEZA, I.T.V.; TAIRA, L.G.N.; SILVA, T.A.; PAIXÃO, D.L.; MIZUNO J. C. Aspectos clínicos da mucopolissacaridose tipo VI. **Rev Bras Clin Med** 2010;8(4):356-61.
23. NEUFELD E, MUENZER J, (2001). The mucopolysaccharidoses In: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease (ed.: Scriver C. et. al.). **McGraw Hill**, New York, 8th ed., 2001, pp. 3421-3452.
24. SCHWARTZ I, MATTE U, LEISTNER S, GIUGLIANI R, (2001). Mucopolissacaridoses. In: Doenças Genéticas em Pediatria (ed: Gerson Karakushansky) **Guanabara Koogan**, Rio de Janeiro, 2001, pp 180-184.
25. WICKER G, PRILL V, BROOKS D, GIBSON G, HOPWOOD J, VON FIGURA K, PETERS C, (1991). Mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome). An intermediate clinical phenotype caused by substitution of valine for glycine at position 137 of arylsulfatase B. **J Biol Chem**. Nov 15, 1991;266(32):21386-91.

9 ARTIGO EM INGLÊS

ADAPTATION OF BIOCHEMICAL AND MOLECULAR METHODS FOR NEWBORN SCREENING OF MUCOPOLYSACCHARIDOSIS VI (MAROTTEUX-LAMY SYNDROME)

Fernanda Bender^{1 2}, Maira G. Burin¹, Fabiana Moura Costa-Motta^{1,2}, Antônio Purificação⁶, Tatiana Amorim⁷, Angelina Acosta Xavier^{4,5}, Roberto Giugliani^{1 2 3 4} e Sandra Leistner-Segal^{1 2}

¹ Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil

² Postgraduate Program in Medicine – Medical Sciences, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

³ Department of Genetics, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

⁴ INAGEMP – National Institute of Population Medical Genetics, Porto Alegre, RS, Brazil

⁵ Bahia School of Medicine and Public Health, Salvador, BA, Brasil

⁶ APAE – Salvador, BA, Brasil

⁷ Medical Genetics Service Médica, HUPES/UFBA, Salvador, BA, Brasil

Corresponding author:

Prof. Sandra Leistner-Segal MD, PhD

Medical Genetics Service

Hospital de Clinicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350

90035-903 – Porto Alegre – RS

Brazil

Tel + 5551 33598011

Fax + 5551 33598010

Email ssegal@hcpa.ufrgs.br

Key Words: Mucopolysaccharidosis VI, Maroteux-Lamy Syndrome, Lysosomal Storage Diseases, Glycosaminoglycans, Dried Blood Spots, Newborn Screening.

ABSTRACT

Mucopolysaccharidosis type VI (MPS VI) or Maroteux-Lamy syndrome, is an autosomal recessive disorder caused by deficiency of the lysosomal enzyme N-acetylgalactosamine-4-sulfatase (ARSB), which results in lysosomal storage of dermatan sulfate in various tissues and organs and leads to a variable clinical spectrum, including more severe and attenuated forms. The accumulation of undegraded substrate causes bone involvement, respiratory problems and short stature, among other signs and symptoms, affecting the eyes, heart and other organs. Although MPS VI does not have a defined incidence in Brazil, we know that in our environment it is much more frequent than in other countries around the world. Today there is a specific treatment for MPS VI, based on enzyme replacement therapy (ERT) with good results and significant improvement for the prognosis of patients, especially when started at an earlier age. We describe herein the standardization of the microplate fluorimetric method for the ARSB test and a new methodology of molecular analysis, both adapted for dried blood spots (DBS) samples. These standardizations were developed for inclusion of newborn screening for MPS VI in the same collections used for the newborns of the city of Monte Santo, Bahia, Brazil. The methods were developed to detect patients and carriers for MPS VI, once the disease seems to have a high incidence (around 1:5.000) at this location. Also, all patients that have already been diagnosed in this city presented the same mutation (p.H178L) in homozygosis. For the technique standardization samples that were collected for the newborn screening, were used and a pilot test with samples of neonates from Monte Santo were used for the validation of the previously standardized techniques. The thermostability studies were performed in healthy controls. Finally, samples of newborns from Monte Santo were analyzed using the two methods (biochemical and molecular) for newborn screening of MPS VI. The standardization on microplate for the fluorimetric enzyme activity of ARSB was performed in our laboratory and the test allowed to differentiate values for normal and affected and/or carriers, allowing a reliable detection of patients with MPS VI. On the standardization and adaptation for molecular analysis in DBS it was possible to differentiate the results of normal individuals, heterozygous and affected for the p.H178L mutation. The use of DBS samples from newborns facilitates

collection and transport. The developed protocol of newborn screening for MPS VI can be easily incorporated into the protocols of reference laboratories, contributing to detection and early treatment of the affected individuals, and providing a better quality of life for these patients.

INTRODUCTION

Maroteaux-Lamy syndrome or Mucopolysaccharidosis VI (MPS VI) is an autosomal recessive disease, caused by intralysosomal defect that affects the degradation of glycosaminoglycans (GAG) dermatan sulfate. The diagnosis is usually confirmed by the deficiency of N-acetylgalactosamine 4-sulfatase (arylsulfatase B - ARSB) enzyme activity in leukocytes. The accumulation of GAGs is responsible for the phenotypic characteristics of the disease (Neufeld and Muenzer, 2001, Schwartz et al, 2001).

MPS VI patients have clinically short stature, facial dimorphism, corneal opacity, recurrent media otitis, pneumonia, obstructive nasal airway disease, cardiac valvulopathy, splenomegaly, inguinal and umbilical hernia, stiffness and articular contractures, and skeletal abnormalities. The normal intelligence is preserved in this type of MPS (Azevedo *et al.*, 2004). Another difference between the syndromes is survival, which is higher in patients with MPS VI (Ishida et al, 2009). Most patients experience the first signs of the disease in childhood (hepatosplenomegaly, infiltrated face and growth retardation) usually between 1 and 3 years of age (De Paula et al, 2006). The definitive diagnosis of MPS VI is established by measuring the ARSB activity in leukocytes or cultured fibroblasts, usually by the absorbance method (Kresse et al., 1982).

Although MPS VI is one of the rarest MPS worldwide (Meike et al. 1999; Poorthuis et al., 1999) it has been shown to be the most frequent in our country according to surveys provided by the MPS Brazil Network, of the HCPA Medical Genetics Service (unpublished data).

The ARSB gene is located in the long arm of chromosome 5, in the region 5q13.3 - 5q14.1 (Litjens et al., 1989). Since the first mutation described by Wicker et al. (1991) in the ARSB gene, a series of other mutations have been identified, adding

approximately 130 mutations to date (HGMD; Litjens & Hopwood, 2001; Karageorgou et al., 2004, Petry et al., 2003, Petry et al., 2005, Karageorgis et al., 2007). Most mutant alleles are present in only one or few patients, indicating a high allelic heterogeneity of the MPS VI (Litjens & Hopwood, 2001).

The city of Monte Santo, located within the state of Bahia, presents a land area of 3,186.87 Km² and has about 52.000 inhabitants with an average annual rate of 1.200 live births. The vast majority of the population (80%) resides in rural areas and the illiteracy rate among individuals aged 15 or over is 44% with a poverty incidence of 48% (IBGE 2009). In this city several genetic disorders (recessive autosomal, dominant, congenital defects and multifactorial disorders) have been diagnosed and are being widely studied in its varied aspects in a project called "Genetics in the hinterland."

Among the genetic diseases in this region, MPV VI presents a high incidence. In another study conducted by the same research group, the p.H178L mutation (described by Karageorgos et al, 2007) was identified in a Brazilian patient from the region of Monte Santo and is being studied in patients with clinical diagnosis of the disease and in their families in this location. Thirteen patients have already been identified, so far and the tested family members indicated a heterozygote frequency of 40 % (Motta-Costa *et al.*, 2011).

MPS VI is already been treated by enzyme replacement therapy, which has recognized positive impact in the patients improvement (Giugliani et al, 2007). Recent evidences indicate that early treatment changes for the better the prognostic of the disease (McGill, 2010). This fact justifies the importance of a simple technique, which could be used to the early detection of enzyme deficiency and specific mutation detection in a convenient sample, such as the sample collected for the newborn screenin.

The use of dry blood samples (DBS) collected for the newborn screening can be an alternative to newborn screening for MPS VI and other lysosomal diseases. Through neonatal diagnosis it would be possible to start early treatment and thus provide a better prognosis and therefore a better quality of life for patients and families.

MATERIALS AND METHODS

The newborn screening for MPS VI project has been widely divulged (ou disclosed) to the community of Monte Santo through an explanatory brochure about the disease and the project proposal. All health professionals and collectors of the neonates were oriented about the importance of neonatal screening and trained on the drying conditions and storage of the samples.

Parents and/or legal representatives for all newborns were informed about newborn screening for MPS VI, that information was reinforced at the time of collection of the newborns. Those that have not agreed to participate in screening for MPS VI, signed the dissent term (approved by the Ethics and Research Committee of HCPA). The DBS were obtained from 262 neonates (0 and 28 days) and were sent to our service by mail from APAE of Salvador/BA. After arrival the samples were stored at 4 °C until analysis.

The development of this work was divided into three steps: on the first phase the standardization of the techniques using DBS was accomplished in 100 samples that were collected for newborn screening by the CTN Laboratory of Porto Alegre. On the second step the thermostability studies were performed in three healthy controls. On the third step a pilot study using 35 samples of neonates, followed by the analyses of 262 samples of newborns, both from the county of Monte Santo, were analyzed using biochemical and molecular methods.

For the biochemical assay the method described by Chamoles *et al.* (2001) adapted by Civallero *et al.* (2006) was used with reduced volumes of substrate and reagents (half of the volume used for the conventional technique) for the standardization of ARSB activity on microplate. For the enzyme assay a 3.0 mm dried spot was used. The blood was eluted with 22.5 μ L of distilled water, 15 μ L of lead acetate buffer 15 mM in sodium acetate 0,05 M, pH 5.0 and 37.5 μ L of substrate 10 mM/L 4-methylumbelliferyl-sulfate diluted in 0.05 M sodium acetate (pH 5.0). Before adding the substrate for the blanks, 225 μ L of glycine-NaOH buffer, 0.085 M, pH 10.5 was added. After homogenization, the microplate was sealed and the samples were incubated at 37 °C, for 20 hours, with shaking at 40 rpm in dry bath. The fluorescence (excitation, 365 nm, emission, 450 nm) was measured in the supernatant, on the spectrofluorometer with microplate reader (Spectramax M2 -

Molecular Devices). The samples were centrifuged at 3000 rpm for 10 min at 4 °C. A 4-methylumbelliferone standard curve was used and enzyme activity was expressed in nmol/h/ml.

In the cases where ARSB activity was low the activity of iduronate sulfatase was measured through the method described by Civallero *et al.*; (2006) to discard multiple sulfatase deficiency. Beta-galactosidase was used as a reference enzyme, according to the method described by Chamoles *et al.* (2001), to check for sample integrity in all samples with abnormal ARSB results.

For the molecular test PCR was used without prior extraction of DNA from DBS samples. This method was adapted and compared with the washing of the filter paper using the FTA reagents and technique described by the manufacturers. PCR was performed in a final volume of 25 μ L, and the following reagent concentrations were used: 1X Invitrogen buffer, 0.2 mM dNTP, 5 μ m of each primer for amplification of exon 3, 1.5 mM, MgCl₂ and 10% DMSO and 3 to 4 1.5 mm DBS discs. The samples were set in a thermocycler (PTC -100™ – MJ Research, Inc.) and submitted to 30 cycles of temperatures of 94 and 46 °C to release DNA from the filter paper. After this step 1U of Taq polymerase was added and the tubes submitted to the specific program for amplification of exon 3.

After amplification, the fragments were submitted to digestion with the restriction enzyme *Hsp92II* (or isoeschisomer *NlaIII*) that recognizes the sequence 5' '...CATG... 3' in the normal allele. The reaction was conducted in a final volume of 30 μ l containing 3 μ l of BSA, 3 μ l of buffer, 0.5 μ l of the *Hsp92* or *NlaIII* enzyme and 15 μ l of the PCR product. The samples were incubated in a dry bath at 37 °C for about 24 hours. After digestion the product was run in a 3% agarose gel and visualized under UV light.

The stability of DBS samples was evaluated in various storage conditions (temperature and time in days) according to the adapted method by Camelier *et al.* (2011). Samples collected from three healthy controls were used. After collecting and drying DBS overnight at room temperature (22 °C) the measurement of ARSB activity was performed and considered to be 100% (time 0). The same samples were analyzed after storage at 4 °C, 22 °C and 37 °C during 15, 30, 45 and 60 days. The same samples were used to evaluate the efficiency of PCR amplification.

For the 262 samples with the completed results, we used Fisher's exact test to compare the two variables (biochemical and molecular analysis). For the biochemical

analysis all the tests were performed in duplicate for better reliability of the obtained results.

All the analysis was performed using SPSS software, version 16.1 on a PC compatible computer.

RESULTS AND DISCUSSION

The main adaptations of the method for the standardization in microplate of ARSB enzyme assay using DBS samples were the volume reduction of the reagents and substrate regarding the technique described by Chamoles *et al.*, (2001) adapted by Civallero *et al.*, (2006) that is used routinely in our laboratory. The time of readings in the microplate is much faster compared the readings of the tests carried out in eppendorf.

For the molecular method, we were able to adapt the PCR technique without performing extraction of DNA from the DBS samples, thus providing less cost on reagents and reduced time to perform the analysis. The amplification of the samples without prior treatment resulted in a better intensity signal.

In the pilot study of 35 samples from DBS three samples had measurements of ARSB enzyme activity below the lower limit for normal reference values. The molecular analysis showed a heterozygous sample for the p.H178L mutation, all the other samples had normal results.

We analyzed a total of 262 samples and compared the results of ARSB activity with the molecular results, using the Fisher's exact statistical test, considering the molecular test as the gold standard for screening. From the ARSB enzyme activity measurements the following results were found: 247 individuals presented enzyme activity within the normal reference values, 15 had activities below the lower reference range. In the molecular analysis we found 259 normal individuals, 3 heterozygous for the p.H178L mutation and none homozygous affected.

It is important that the enzyme assays, when distorted, require confirmation in a new sample of DBS or leukocytes for the final diagnosis. This was not our goal here, once we aimed to detect the specific mutation present in Monte Santo.

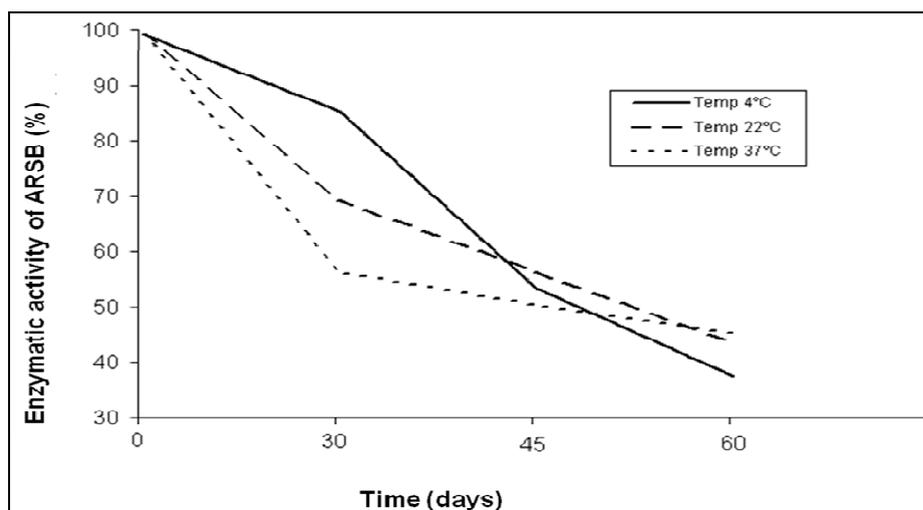
With the statistical test, the frequencies of the obtained results were calculated considering the biochemical and molecular analysis, yielding a significance of $p < 0.002$ (Table 1). These results demonstrate that molecular analysis can possibly replace the biochemical analysis in regions such as Monte Santo, in which there is previous knowledge on the relative prevalence of a specific mutation.

Table 1. Obtained results on the biochemical and molecular analysis frequency.

	Biochemical	Molecular	Total
Normal	94% (n= 247)	99% (n= 259)	
Abnormal Results	6% (n=15)	1% (n= 3 heterozygous)	
Total	100% (n=262)	100% (n=262)	P=0,002

Stability tests showed that, when samples were kept at temperatures of 4, 22 and 37°C, the ARSB activity had a significant decrease after 30 days of collection, especially for the material maintained at 22 and 37 °C (Figure 1). These results agree with the study of Camelier *et al.*, (2011) that shows a significant loss of activity in the evaluation of the thermostability of galactose-6-sulfatase. Another recent study by Castilho *et al.*, (2011) shows the thermostability of three enzymes including ARSB that also showed loss of activity, although using different time intervals.

Figure 1: Thermostability test for the ARSB in DBS



These same samples were also evaluated for molecular analysis stability. In these tests the samples have amplified during 60 days after collection and in all temperature conditions. Thus showing a higher reproducibility of the results obtained for the molecular analysis.

These results indicate that the use of DBS samples to measure ARSB activity should be collected, sent to the laboratory immediately and stored at 4 °C until analysis (must not exceed 30 days). Care for proper collection, drying the sample, identification, date of collection and transport, are factors that can influence the results if not performed correctly. It is noteworthy that 5 out of 15 samples with distorted results were stored for 60 days after collection prior to arrival in the laboratory (molecular analysis results were normal).

In samples in which the ARSB activity were distorted, β -galactosidase analysis were used as a reference enzyme and measurement of iduronate -sulfatase activity, was used to rule out the possibility of multiple sulfatase deficiency. In all newborns tested both enzyme activities were normal. These analyses could not be held in three of the newborns with distorted ARSB activity because of insufficient sample.

This method of screening in DBS samples allowed a practical and safe enzymatic test for the identification of patients with MPS VI when the biochemical result could be confirmed by molecular tests. The study showed that DBS samples can be used to identify patients and carriers with MPS VI, with methods that can be easily incorporated into the protocols of reference laboratories, specially when the recurrent mutation in the family or in a particular geographic region is a already known. The early enzyme replacement therapy can give a better quality of life to

patients with MPS VI. With the available enzyme replacement therapy for MPS VI, we know the importance and benefits of early diagnosis, showing a considerable improvement on clinical features and quality of life when treatment is started as soon as possible.

With these preliminary results we can conclude that the methodology developed for newborn screening of MPS VI is effective for early detection of the disease in the region studied.

The continuing study with an increased sample size will be critical to allow mutation frequency calculation and the estimated number of heterozygotes and homozygotes in the studied region.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank to the collectors of the "Guthrie test" from Monte Santo. To APAE Salvador which has sent us the DBS samples. To Juarez Huve who made the collections of the healthy controls for stability tests. We also would like to give special thanks to FIPE/HCPA, UFRGS, CNPq, Brazil MPS Network, BIOMARIN, INAGEMP for the partial support of this work.

REFERENCES

1. CAMELIER MV, BURIN MG, DE MARI J, VIEIRA TA, MARASCA G, GIUGLIANI R. Practical and reliable enzyme test for the detection of Mucopolysaccharidosis IVA (Morquio Syndrome type A) in dried blood samples. **Clin Chim Acta**. 2011 Sep 18;412(19-20):1805-8. Epub 2011 Jun 12.
2. CASTILHOS CD, MEZZALIRA J, GOLDIM MP, WERLANG FG, COELHO JC. Effect of sample collection, temperature and time of storage on β -galactosidase and total hexosaminidase activities in dried blood collected on filter paper. **Clin Chem Lab Med**. 2011 Aug;49(8):1299-302. Epub 2011 May 17.
3. CHAMOLES NA, BLANCO MB, GAGGIOLI D, CASENTINI C, (2001). Hurler-like phenotype: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. **Clin Chem**. Dec; 2001, 47(12):2098-102

4. CIVALLERO G, MICHELIN K, DE MARI J, VIAPIANA M, BURIN M, COELHO JC, GIUGLIANI R, (2006). Twelve different enzyme assays on dried-blood filter paper samples for detection of patients with selected inherited lysosomal storage diseases. **Clinica Chimica Acta** Vol. 372, Issus 1-2, October, 2006 pp 98 – 102
5. COSTA-MOTTA FM, ACOSTA AX, ABÉ-SANDES K, BENDER F, SCHWARTZ IV, GIUGLIANI R, LEISTNER-SEGAL S. Genetic studies in a cluster of Mucopolysaccharidosis Type VI patients in Northeast Brazil. **Mol Genet Metab.** 2011 Sep 20.
6. DE PAULA AC, BERTOLA DR, ALBANO LMJ, et al. Achados radiológicos em pacientes com mucopolissacaridose tipo VI. **Rev Imagem** 2006;28(1):7-12.
7. GIUGLIANI R, HARMATZ P, WRAITH JE. Management Guidelines for Mucopolysaccharidosis VI. **Pediatrics** 2007;120;405-18.
8. ISHIDA A, PINTO JA, KUWAJIMA SS, et al. Doença osteometabólica. In: Hebert S, Barros TEPF, Xavier R, et al. (editores). Ortopedia e traumatologia: princípios e prática. 4ª ed. Porto Alegre: **Artmed**; 2009. p. 843-7.
9. KARAGEORGOS L, BROOKS DA, POLLARD A, MELVILLE EL, HEIN LK, CLEMENTS PR, KETTERIDGE D, SWIEDLERS SJ, BECKB M, GIUGLIANI R, HARMATZ P, WRAITH JE, GUFFONG N, LEÃO TELES E, SÁ MIRANDA MC, HOPWOOD JJ, (2007). Mutational Analysis of 105 Mucopolysaccharidosis Type VI Patients. **Hum Mutat.** Sep; 2007, 28(9):897-903.
10. KARAGEORGOS L, HAARMATZ P, POLLARD A, CLEMENTS PR, BROOKS DA, HOPWOOD JJ, (2004). Mutational analysis of Mucopolysaccharidosis type VI patients undergoing a trial of enzyme replacement therapy. **Human Mutation**, 2004, 23:229-233.
11. KRESSE H, VON FIGURA K, KLEIN U, GLOSSI J, PASCHKE E, POHLMANN R, (1982). Enzymic diagnosis of the genetic mucopolysaccharide storage disorders. **Methods Enzymology**, 1982, 83:559.
12. HGMD–The Human Gene Mutation Database (<http://www.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/search>).
13. IBGE. <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>. Acesso online.
14. LITJENS T; HOPWOOD JJ. Mucopolysaccharidosis type VI: Structural and clinical implications of mutations in N-acetylgalactosamine-4-sulfatase. **HumMutat.** 2001 Oct; 18(4):282-95.

15. LITJENS T, BAKER EG, BECKMANN KR, HOPWOOD JJ, (1989). Chromosomal localization of ARSB, the gene of human n-acetylgalactosamine-4-sulfatase. **Hum Genet**, 1989, 82:67-68.
16. PETRY MFG, DIETER T, BURIN MG, GIUGLIANI R, LEISTNER S, (2003). Identification of a novel mutation in the ARSB gene that is frequent among Brazilian MPS VI patients. **Genetic Testing**, 2003,7:347-349.
17. PETRY, M.F.G.; NONEMACHER K.; SEBEN J.C.; SCHWARTZ I.V.D.; AZEVEDO, A.C.M.; BURIN, M.G.; REZENDE, A.R.; KIM, C.A.; GIUGLIANI R.; LEISTNER-SEGAL S, (2005). Mucopolysaccharidosis type VI: Identification of novel mutations on the arylsulphatase B gene in South American patients. **J Inherit Metab Dis**, 2005, 28:1027-1034.
18. POORTHUIS BJ, WEVERS RA, KLEIJER WJ, GROENER JE, DE JONG JG, VAN WEELY S, NIEZEN-KONING KE, VAN DIGGELEN OP. The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. **Hum Genet**. 1999 Jul-Aug;105(1-2):151-6.
19. MCGILL JJ, INWOOD AC, COMAN DJ, LIPKE ML, DE LORE D, SWIEDLER SJ, HOPWOOD JJ (2010). Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis VI from 8 weeks of age--a sibling control study. **Clin Genet**. 77:492-8.
20. MEIKLE P. J.; HOPWOOD J. J.; CLAQUE A. E.; CAREY W. F. Prevalence of Lysosomal storage disorders. **JAMA**, 1999. Jan;281: 249 - 54.
21. MILLER *et al.*, (1988) S.A. Miller, D.D. Dykes and H.F. Polesky, (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells, **Nucleic Acids Res**, 16 (3) (1988), p. 1215.
22. MIZUNO, A.C.; FIGUEIREDO, J.B.; TEZA, I.T.V.; TAIRA, L.G.N.; SILVA, T.A.; PAIXÃO, D.L.; MIZUNO J. C. Aspectos clínicos da mucopolissacaridose tipo VI. **Rev Bras Clin Med** 2010;8(4):356-61.
23. NEUFELD E, MUENZER J, (2001). The mucopolysaccharidoses In: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease (ed.: Scriver C. et. al.). **McGraw Hill**, New York, 8th ed., 2001, pp. 3421-3452.
24. SCHWARTZ I, MATTE U, LEISTNER S, GIUGLIANI R, (2001). Mucopolissacaridoses. In: Doenças Genéticas em Pediatria (ed: Gerson Karakushansky) **Guanabara Koogan**, Rio de Janeiro, 2001, pp 180-184.
25. WICKER G, PRILL V, BROOKS D, GIBSON G, HOPWOOD J, VON FIGURA K, PETERS C, (1991). Mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome). An intermediate clinical phenotype caused by substitution of valine for glycine at position 137 of arylsulfatase B. **J Biol Chem**. Nov 15, 1991;266(32):21386-91.

10 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho mostrou que a utilização de amostras de STIPF para o diagnóstico bioquímico e molecular da MPS VI é viável e pode ser incorporado por laboratórios de referência, para identificar pacientes com MPS VI e mesmo portadores da doença. A coleta de STIPF, além de evitar a coleta de sangue venoso, torna mais fácil o transporte das amostras a partir de outros locais mais distantes.

Com vistas à triagem para MPS VI, as amostras de sangue total em papel-filtro devem ser secadas e armazenadas de acordo com as normas de coleta do Programa Nacional de Triagem Neonatal.

Os testes de estabilidade de amostras de STIPF para o ensaio enzimático da ARSB indicaram que, o armazenamento das amostras à 4°C é indicado para a obtenção dos resultados mais confiáveis, evitando-se desta maneira, resultados falso-positivos.

A disponibilização de um teste de triagem neonatal vai permitir um diagnóstico mais precoce da MPS VI, o que é muito importante uma vez que esta doença já tem a terapia específica disponível e que sua introdução em fase mais precoce parece se acompanhar de melhores resultados clínicos.

11 CONCLUSÕES

A utilização simultânea dos dois métodos de triagem permitiu a obtenção de um resultado mais confiável, principalmente nos casos nos quais o diagnóstico molecular concordou com o resultado bioquímico. Para os ensaios bioquímicos em microplaca conseguimos reduzir substancialmente (pela metade) os volumes dos reagentes e substratos em relação à técnica convencional, com uma conseqüente redução de custos. Para os ensaios moleculares, também reduzimos os gastos ao evitar a extração de DNA da amostra e os custos materiais e humanos associados a essa etapa.

Esse estudo terá continuidade com a análise de um número maior de amostras, que deverão permitir o cálculo da incidência da doença na região estudada. Com as padronizações e adaptações das técnicas desenvolvidas para a triagem neonatal para MPS VI percebemos que outras técnicas podem ser desenvolvidas para investigação de outras doenças, usando o mesmo material coletado para o “teste do pezinho”.

ANEXOS

ANEXO A – APROVAÇÃO DO PROJETO



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

COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB00000921) analisaram o projeto:

Projeto: 100282 **Versão do Projeto:** 19/07/2010 **Versão do TCLE:** 08/12/2010

Pesquisadores:

FERNANDA BENDER
MAIRA GHAEFF BURIN
FABIANA MAIA MOURA COSTA MOTTA
ANGELINA XAVIER ACOSTA
FATIANA REGIA SUZANA AMORIM BOA SORTE
ROBERTO GIUGLIANI
SANDRA LEISTNER SEGAL

Título: TRIGEM NEONATAL PARA MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO VI (SÍNDROME DE MAROTEAUX-LAMY) EM UMA REGIÃO COM ALTA INCIDÊNCIA DA DOENÇA

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada imediatamente ao CEP/HCPA.

Porto Alegre, 17 de dezembro de 2010.

Profª Nadine Clausell
Coordenadora GPPG e CEP/HCPA

ANEXO B – FOLDER DE DIVULGAÇÃO DO PROJETO

CAPA DO FOLDER

Principais Características Físicas da MPS VI



Órgãos aumentados:
Fígado aumentado (hepatomegalia)
Baço aumentado (esplenomegalia)



Córnea opaca



Hérnia

Fonte das imagens: http://www.lysosomalearning.com/healthcare/about/lsd_hc_abt_mps6.asp

Equipe Envolvida:

Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre:
Fernanda Bender, Maira Graeff Burin, Fabiana Moura Costa-Motta, Roberto Giugliani, Sandra Leisner-Segal

Serviço de Genética Médica, HUPES/UFBA, Salvador, BA:
Angelina Xavier Acosta, Kiyoko Sandes

APAE de Salvador, BA:
Antônio Purificação, Ney Boa Sorte, Taitana Amorim

Apoio:








Fipe-HCPA, Porto Alegre/RS

GENÉTICA NO SERTÃO

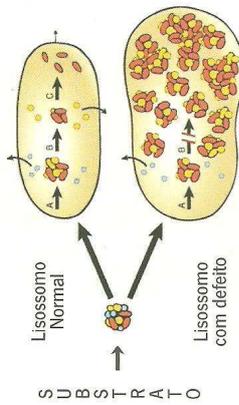
Triagem Neonatal para
Mucopolissacaridose
Tipo VI (MPS VI)

Monte Santo | Bahia

TEXTO DO FOLDER

O que é MPS VI

A MPS VI é uma doença genética rara com alta incidência no Brasil, em comparação com outros países. Pacientes com MPS VI têm uma anormalidade em uma enzima específica chamada arilsulfatase B, que tem a função de fazer a quebra dos glicosaminocícaros (GAGs). Os GAGs que não são completamente quebrados ficam depositados dentro das células do corpo e se acumulam.



© Elsevier 2005

MPS VI em Monte Santo

No município de Monte Santo têm sido diagnosticadas diversas doenças genéticas (autossômicas recessivas, dominantes, defeitos congênitos e distúrbios multifatoriais) que estão sendo amplamente estudadas em seus variados aspectos no projeto "Genética no Sertão" coordenado pela Dra. Angelina Xavier Acosta.

A MPS VI é uma doença que tem alta incidência relativa na região do município de Monte Santo, Bahia.

Estudos realizados já diagnosticaram mais de 12 pacientes com MPS VI no município.

Esse projeto tem como principais objetivos facilitar o acesso ao diagnóstico, tratamento e prevenção da MPS VI.



A Importância do Diagnóstico Precoce da MPS VI

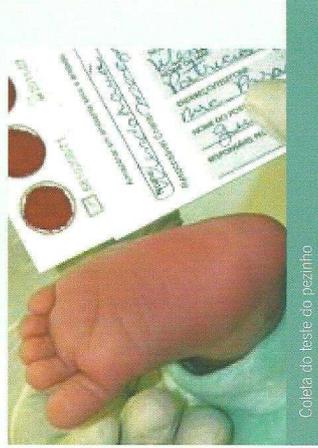
As características físicas dos pacientes com MPS VI são identificadas na infância.

O diagnóstico em recém-nascidos permite que o paciente receba o tratamento da reposição enzimática o mais precoce possível, que é eficaz e melhora a qualidade de vida.

Como seu filho pode colaborar

Quando seu filho for até um posto de saúde fazer a coleta para o "teste do pezinho" juntamente será feita a análise para a MPS VI.

Somente algumas gotas de sangue serão necessárias para as análises.



Coleta do teste do pezinho

As amostras serão encaminhadas para o Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, para realização dos ensaios enzimáticos e análise molecular.

Após as análises, será enviado um laudo para a equipe de saúde de Salvador que comunicará os resultados. Para os casos positivos e heterozigotos será prestado o aconselhamento genético, e será prescrito tratamento adequado para os casos positivos.

ANEXO C – TERMO DE DISSSENTIMENTO

TERMO DE DISSSENTIMENTO

**PROJETO: TRIGEM NEONATAL PARA MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO VI
(SÍNDROME DE MAROTEAUX-LAMY) EM UMA REGIÃO COM ALTA
PREVALÊNCIA DA DOENÇA**

A MPS VI é uma doença genética rara com alta incidência no Brasil, em comparação com outros países. Além disto tem alta incidência relativa na região do município de Monte Santo, Bahia.

A divulgação deste projeto foi feita no município de Monte Santo através de palestras e folders explicativos e tem como principais objetivos executar um programa de triagem neonatal para Mucopolissacaridose tipo VI (MPS VI) com vistas a facilitar o acesso ao diagnóstico, tratamento e prevenção desta doença.

Este projeto será realizado em amostra do teste do pezinho sob a coordenação dos Professores Sandra Leistner-Segal e Roberto Giugliani (do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos, 2350. Fone: 51- 3359 8011), Angelina Xavier Acosta (Serviço de Genética Médica, HUPES/UFBA, Salvador, BA) e Tatiana Amorim (APAE de Salvador).

O que acontece se eu não participar?

Sua participação é voluntária. O exame do teste do pezinho de seu filho não será prejudicado se você não desejar participar.

Eu li e compreendi totalmente as informações fornecidas.
Sendo conhecedor disto, eu não concordo em participar deste Projeto.

Entendo que este formulário será preenchido e que receberei uma cópia.

Local / Data: _____

Nome do Paciente: _____

Nome e Assinatura da Mãe ou Responsável legal pela criança

Nome e Assinatura do Pesquisador:

HCPA / GPPG
VERSÃO APROVADA
14/12/2010
nº 100282 83

ANEXO D – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TRIGEM NEONATAL PARA MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO VI (SÍNDROME DE MAROTEAUX-LAMY) EM UMA REGIÃO COM ALTA PREVALÊNCIA DA DOENÇA

Seu filho fez parte de um estudo que envolveu a análise da amostra de 800 crianças que realizaram o “teste do pezinho” na cidade de Monte Santo, no Estado da Bahia no período de novembro/2010 a setembro/2011.

Este trabalho está sob a coordenação dos Professores Sandra Leistner-Segal e Roberto Giugliani (do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350, Fone: 51- 3359 8011), Angelina Xavier Acosta (Serviço de Genética Médica, HUPES/UFBA, Salvador, BA) e Tatiana Amorim (APAE Salvador, Fone: (71) 32708300).

O que é a Mucopolissacaridose VI?

A MPS VI é uma doença genética rara com alta incidência no Brasil, em comparação com outros países. Pacientes com MPS VI têm uma anormalidade em uma enzima específica chamada arilsulfatase B, que tem a função de fazer a quebra dos glicosaminoglicanos (GAGs). Os GAGs que não são completamente quebrados ficam depositados dentro das células do corpo e se acumulam, originando a doença.

Qual é a finalidade do estudo?

A MPS VI é uma doença que tem alta incidência relativa na região do município de Monte Santo, Bahia.

Esse projeto tem como principais objetivos executar um programa de triagem neonatal para Mucopolissacaridose tipo VI (MPS VI) com vistas a facilitar o acesso ao diagnóstico, tratamento e prevenção desta doença.

São finalidades adicionais do projeto:

1. Identificar recém-nascidos afetados por MPS VI, que seriam candidatos a programa de tratamento precoce da doença com terapia de reposição enzimática, a ser oferecido em projeto paralelo;
2. Identificar os portadores e os eventuais casais em risco de terem filhos afetados, candidatos a um programa de aconselhamento genético a ser oferecido pela equipe participante.

O que devo fazer a partir deste momento?

Neste momento, será solicitada a coleta de sangue total para extração de leucócitos (para testes bioquímicos) ou DNA (para testes moleculares), bem como uma amostra de urina (para dosagem de glicosaminoglicanos). Esta coleta servirá para esclarecer se as alterações encontradas no material coletado para o teste do pezinho de seu filho serão confirmadas numa nova amostra.

O que acontece se eu não participar?

Sua participação é voluntária. O tratamento será indicado do mesmo modo e seu filho terá direito ao mesmo. Também o aconselhamento genético estará disponível, mesmo que você não aceite participar da pesquisa. Se você não desejar participar da

HCPA / GPPG
VERSÃO APROVADA

11/12/2010
1210028283

pesquisa, seus dados e os do seu filho não serão utilizados na mesma, e isso não afetará o atendimento do seu bebê.

A informação colhida será confidencial?

Neste estudo, seu filho será identificado apenas com as iniciais de seu nome e a data de nascimento, e somente terão acesso aos resultados o seu médico, os médicos da equipe de estudo ou membros do Comitê de Ética.

Os dados obtidos deverão ser publicados, quaisquer que sejam os resultados, mas o sigilo será mantido e a sua identidade não será divulgada.

Como foi minha participação neste estudo?

Você foi informado (a) deste projeto através de divulgação com folders e cartazes em postos de coleta aonde foi explicado que o sangue de seu filho, colhido para o teste do pezinho, seria utilizado também para dosagem da atividade enzimática da enzima Arilsulfatase B e para análise molecular para a detecção de uma alteração específica no gene que causa MPS VI.

Nesta fase inicial, não foi necessária coleta adicional além daquela prevista para o teste do pezinho. Na presença de um resultado alterado na triagem, você será informado desta alteração, da necessidade de exames adicionais e da possibilidade de tratamento caso a alteração seja confirmada.

CONSENTIMENTO INFORMADO

Ao dar o meu consentimento assinando neste formulário, eu concordo que os objetivos foram explicados e que minhas perguntas foram respondidas satisfatoriamente. Sendo conhecedor disto, eu:

Concordo em participar da segunda etapa deste Projeto voluntariamente. Fui também informado (a) de que possuo o direito de me retirar deste Projeto a qualquer momento.

NÃO concordo em participar da segunda etapa deste Projeto e não desejo que os resultados referentes à investigação de MPS VI que foi feita utilizando o material coletado no Teste do pezinho do meu (minha) filho (a) seja utilizado para este fim. Fui também informada de que a análise das outras doenças investigadas pelo Teste do Pezinho, assim como o tratamento das mesmas, caso ocorram, não serão prejudicados por causa da minha decisão.

Entendo que este formulário será preenchido e que receberei uma cópia.

Local / Data: _____

Nome do Paciente: _____

Nome e Assinatura do Responsável legal pela criança: _____

Nome e Assinatura do Pesquisador: _____

HCPA / GPPG
VERSÃO APROVADA
14/12/2010
nº 100282 83

ANEXO E - AUTORIZAÇÃO PARA USO DE IMAGEM



HOSPITAL DE
CLÍNICAS
PORTO ALEGRE RS

SERVIÇO DE GENÉTICA MÉDICA
CENTRO COLABORADOR DA
ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE
PARA O DESENVOLVIMENTO DE SERVIÇOS DE
GENÉTICA MÉDICA NA AMÉRICA LATINA



AUTORIZAÇÃO PARA USO DE IMAGEM

Concordo com a utilização de imagem fotográfica de _____
_____, incluindo rosto, sem
divulgação simultânea de nome, ou qualquer forma de identificação, para fins de
documentação de investigação diagnóstica bem como uso em publicação científica. As
imagens fotográficas ficarão sob tutela do Serviço de Genética Médica do Hospital de
Clínicas de Porto Alegre, estando o Dr Roberto Giugliani (chefe do Serviço), disponível para
eventuais esclarecimentos pelo telefone (51) 2101 8011.

Porto Alegre, _____

Paciente

Responsável

Médico

Rua Rámiro Barcelos, 2350
90035-903 - Porto Alegre - RS - Brasil
www.hcpa.ufrgs.br

HCPA /OPPC
VERSÃO APROVADA
12/10/10

fone (51) 2101-8011
fax (51) 2101-8010
l-genetica@hcpa.ufrgs.br