

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

**VALIDAÇÃO DAS TÉCNICAS FLUORIMÉTRICAS PARA ESTABELECIMENTO  
DA ATIVIDADE ESPECÍFICA DA BETA-GLICOSIDASE E QUITOTRIOSIDASE DE  
SANGUE IMPREGNADO EM PAPEL FILTRO PARA O DIAGNÓSTICO DA  
DOENÇA DE GAUCHER**

**MARIANA PEREIRA DE SOUZA GOLDIM**

Orientadora  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Janice Carneiro Coelho

Porto Alegre  
2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

**VALIDAÇÃO DAS TÉCNICAS FLUORIMÉTRICAS PARA ESTABELECIMENTO  
DA ATIVIDADE ESPECÍFICA DA BETA-GLICOSIDASE E QUITOTRIOSIDASE DE  
SANGUE IMPREGNADO EM PAPEL FILTRO PARA O DIAGNÓSTICO DA  
DOENÇA DE GAUCHER**

**MARIANA PEREIRA DE SOUZA GOLDIM**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-graduação em  
Ciências Biológicas: Bioquímica da  
Universidade Federal do Rio Grande  
do Sul, como requisito para à  
obtenção do título de Mestre em  
Bioquímica

Orientadora  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Janice Carneiro Coelho

Porto Alegre  
2012

### CIP - Catalogação na Publicação

Goldim, Mariana Pereira de Souza

Validação de técnicas fluorimétricas para estabelecimento da atividade específica em sangue impregnado em papel filtro para o diagnóstico da Doença de Gaucher / Mariana Pereira de Souza Goldim. - 2012.

113 f.

Orientadora: Janice Carneiro Coelho.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. sangue impregnado em papel filtro. 2. Doença de Gaucher. 3. quitotriosidase. 4. beta-glicosidase. I. Coelho, Janice Carneiro, orient. II. Título.

## **Agradecimentos**

À minha orientadora, Dr<sup>a</sup> Janice Carneiro Coelho, pela confiança e competência, por todos esses anos de orientação que contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal.

À Dr<sup>a</sup> Cristina Dickie de Castilhos, pela amizade, apoio e ensinamentos que muito me auxiliaram.

À minha bolsista de iniciação científica, Cristina da Silva Garcia, pela sua dedicação e competência que foram fundamentais para o sucesso desse trabalho.

Às colegas-amigas de laboratório, pelas contribuições e pelo convívio que tornaram esses dois anos extremamente agradáveis e divertidos de se trabalhar.

À Prof<sup>a</sup> Vera e colegas do laboratório 25, pela amizade e convívio.

Aos colegas do laboratório 21, pela amizade e convívio, que se tornaram um anexo do nosso laboratório.

Aos meus pais, Susana e José Roberto, por serem um exemplo de sucesso pessoal e profissional.

Aos meus irmãos, Laura e Alberto, pelos momentos de descontração e pela compreensão nos meus momentos de ausência.

Às minhas famílias, Pereira de Souza, Goldim e Born, pelo apoio e compreensão ao longo de minha vida e especialmente durante estes dois anos de mestrado.

Ao meu noivo, Fabrício, pelo incentivo e confiança que me estimulam à crescer.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

À Genzyme do Brasil, pelo suporte e logística para a execução desta triagem de pacientes de alto-risco.

## Parte I

### Resumo

A Doença de Gaucher (DG) é a Doença Lisossômica de Depósito mais frequente com prevalência de 1:50.000. Ela é causada pela deficiência da beta-glicosidase ácida (GBA), gerando acúmulo de glicosilceramidas (glicocerebrosídeo) nos lisossomos. Outra enzima relacionada é a quitotriosidase (QT), onde a atividade está aumentada nos pacientes em até 1000 vezes. Atualmente o diagnóstico é baseado na atividade específica de enzimas em leucócitos ou fibroblastos. O uso de sangue impregnado em papel filtro (SPF) vem sendo ampliado, porém somente como forma de triagem, pois não há forma validada de estabelecer a atividade específica da enzima. A utilização de sangue em papel filtro tem diversas vantagens, tais como: fácil transporte, fácil armazenagem das amostras, menor volume de reação e segurança de manipulação das amostras. Esse estudo tem como objetivo validar técnicas fluorimétricas para o estabelecimento da atividade específica da GBA e QT em sangue impregnado em papel filtro eluído com tampão universal (20 mmol/L de fosfato de sódio, pH 7,0) através da correção do volume amostral pela quantificação de proteínas totais. Além disso, foram miniaturizadas as técnicas padrão para a triagem em SPF e as técnicas confirmatórias padrão ouro em leucócitos da DG. Foram estabelecidos novos valores de referência para todas as técnicas estabelecidas. Foi possível diferenciar os controles saudáveis dos pacientes com DG utilizando as técnicas miniaturizadas em SPF e leucócitos. A atividade específica em SPF se mostrou válida e os coeficientes de variação foram considerados aceitáveis. A estabilidade enzimática foi analisada por 21 dias de armazenamento a 4°C e foi observado que há um decaimento da atividade da GBA, mas não da QT. Deste modo a atividade específica em SPF pode ser utilizada de forma confiável como método de triagem e confirmação do diagnóstico de DG.

Palavras-chave: sangue impregnado em papel filtro, Doença de Gaucher, beta-glicosidase, quitotriosidase

## Abstract

Gaucher disease (GD) is the most frequent Lysosomal Storage Disorder with a prevalence of 1:50,000. It is caused by the deficiency of acid beta-glucosidase (GBA), generating glucosylceramide (glucocerebroside) accumulation in the lysosomes. Another enzyme related to GD is chitotriosidase (CT), which activity is increased in patients up to 1000 times. Currently the diagnosis is based on the specific activity of enzymes in leukocytes or fibroblasts. The use of dried blood spots (DBS) has been extended, but only as screening, because there is no validated specific activity of the enzymes. The use of DBS has several advantages, such as easy transport and easy storage of samples, smaller reaction volume and safety of handling samples. This study aims to validate fluorometric techniques for establishing specific activity of the GBA and CT in DBS eluted with universal buffer (20 mmol/L sodium phosphate, pH7.0) by correcting for sample volume quantification of total protein. Moreover, standard screening techniques in DBS and standard diagnosis techniques in leukocytes for GD have been miniaturized. New reference values and cut-off points were established for all techniques. It was possible to differentiate healthy controls from patients with GD using miniaturized techniques in DBS and leukocytes. The specific activity of DBS proved valid and coefficients of variation were acceptable. The enzymatic stability was analyzed by 21 days of storage at 4° C and it was observed that there is a decrease of the activity of GBA, but not of CT. Thus the specific activity on DBS can be used as a reliable screening method and as diagnosis of GD.

Key-words: dried-blood filter paper, Gaucher Disease, beta-glucosidase, chitotriosidase

**Lista de abreviaturas**

CS: controles saudáveis

DG: Doença de Gaucher

DLD: Doenças Lisossômicas de Depósito

G: pacientes com doença de Gaucher

GBA: beta-glicosidase ácida

GLB: beta-galactosidase

HT: heterozigotos obrigatórios

ISS: Inibição da Síntese de Substrato

ND: não detectável

QT: Quitotriosidase

SPF: Sangue impregnado em Papel Filtro

TG: pacientes com doença de Gaucher em tratamento

TRE: Terapia de Reposição Enzimática

TU: Tampão Universal

## Sumário

Parte I.....	V
Resumo.....	V
Abstract.....	VI
Lista de abreviaturas.....	VII
Introdução.....	10
Doenças lisossômicas de depósito.....	10
Doença de Gaucher.....	11
Diagnóstico.....	14
Tratamento.....	15
Diagnóstico das DLDs.....	17
Enzimas lisossômicas abordadas no trabalho.....	19
Estabelecimento da atividade enzimática.....	20
Tampão Universal.....	21
Objetivos do trabalho.....	22
Objetivo geral.....	22
Objetivos específicos.....	22
Parte II.....	23
Capítulo I - Materiais e Métodos.....	23
Local de execução.....	23
Amostras.....	23
Grupo controle.....	23
Grupo experimental.....	25
Armazenamento das amostras.....	26
Miniaturização da técnica de leucócitos.....	26
Atividade enzimática da QT em plasma.....	28
Miniaturização da técnica de SPF.....	28
Estabelecimento do tempo e temperatura ideal para eluição com o Tampão Universal.....	31
Quantificação de proteínas totais em SPF.....	32
Estabelecimento da atividade específica em SPF.....	33
Validação da atividade específica em SPF.....	33
Descarte de materiais.....	35
Considerações éticas.....	35
Capítulo II – Resultados.....	36
1. Miniaturização das técnicas de medida da atividade enzimática e correlação com as técnicas padrão.....	36
1.1. Miniaturização das técnicas em leucócitos.....	36
1.2. Miniaturização da técnica de SPF.....	37
1.3. Atividade enzimática da QT em plasma.....	39
1.4. Triagem em pacientes de alto risco.....	40
2. Padronização do uso do Tampão Universal em SPF.....	46
2.1. Estabelecimento do tempo e temperatura ideal para eluição com o Tampão Universal.....	46

3. Comparação entre a atividade enzimática de indivíduos saudáveis (CS) e pacientes com Doença de Gaucher sem (G) e com tratamento (TG) e heterozigotos obrigatórios (HT).....	50
3.1. Atividade da enzima beta-glicosidase em SPF eluido com TU .....	50
3.1.1 Atividade total .....	50
3.1.2. Atividade específica por proteínas totais .....	52
3.2. Atividade da enzima Quitotriosidase em SPF com TU.....	54
3.2.1. Atividade total .....	54
3.2.2. Atividade específica por proteínas totais .....	55
3.3. Correlação entre as técnicas padrão ouro e a atividade específica em SPF com TU.....	57
4. Validação das técnicas .....	58
4.1.Coeficiente de variação intra-ensaio .....	58
4.2.Coeficiente de variação interensaio .....	61
4.3.Coeficiente de variação interpessoal.....	63
4.4.Local do picote .....	65
4.5.Estabilidade enzimática a 4°C.....	67
Parte III.....	69
Discussão.....	69
Miniaturização das técnicas padrão ouro e de triagem para Doença de Gaucher .....	69
Triagem de população alto-risco.....	71
Estabelecimento e validação da atividade específica de hidrolases lisossômicas em sangue impregnado em papel filtro .....	74
Considerações finais .....	79
Conclusões.....	81
Perspectivas.....	82
Referências .....	83
Lista de tabelas .....	89
Lista de figuras .....	90
Apêndice A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	92
Apêndice B – Artigo submetido a revista <i>Molecular Genetics and Metabolism</i> .....	93

## **Introdução**

### ***Doenças lisossômicas de depósito***

As Doenças Lisossômicas de Depósito (DLD) compreendem um subgrupo dos Erros Inatos do Metabolismo, onde a maioria destas doenças genéticas é causada pela deficiência de enzimas chamadas hidrolases lisossômicas, que agem na degradação de substratos no interior dos lisossomos. Esses substratos, não degradados, acumulam-se nos lisossomos causando um amplo espectro de anormalidades esqueléticas, comprometimento do sistema nervoso, disfunções orgânicas e acúmulo de lipídios complexos nos tecidos [Scriver et al., 2000]. Atualmente são classificadas como DLD mais de 50 doenças. Apesar de cada uma dessas doenças serem, individualmente, relativamente raras, juntas elas afetam um em cada 1500 a 7000 recém-nascidos [Staretz-Chacham et al., 2009].

Nas últimas décadas vêm sendo desenvolvidos e já estão disponíveis diversos tipos de tratamentos para as DLDs como, terapia gênica, transplante de medula óssea, inibidores de síntese de substrato e terapia de reposição enzimática, embora não disponíveis para todas elas [Wenger et al., 2003; Desnick, 2004; Kwapiszewski et al., 2011]. Essas terapias atenuam os sintomas e melhoram significativamente a qualidade de vida dos pacientes [Kornfeld, 1992]. O transplante de medula óssea foi o primeiro tratamento utilizado para DLDs em pacientes com Síndrome de Hurler em 1980 [Hobbs et al., 1981].

## Doença de Gaucher

A Doença de Gaucher (DG; OMIM 230800) é a DLD mais comum, com prevalência de 1:50.000 indivíduos [de Fost et al., 2003], porém na população judaica Ashkenazi a estimativa de prevalência chega a 1:900 afetados [Charrow, 2004] e 1:15 heterozigotos obrigatórios [Scott et al., 2010]. Ela é causada pela deficiência da enzima  $\beta$ -glicosidase ácida (GBA, EC 3.2.1.45), que tem como função a conversão de glicosilceramidas (glicocerebrosídeos) em ceramida e glicose através da clivagem da ligação O-glicosídica com a adição de água (figura 1).

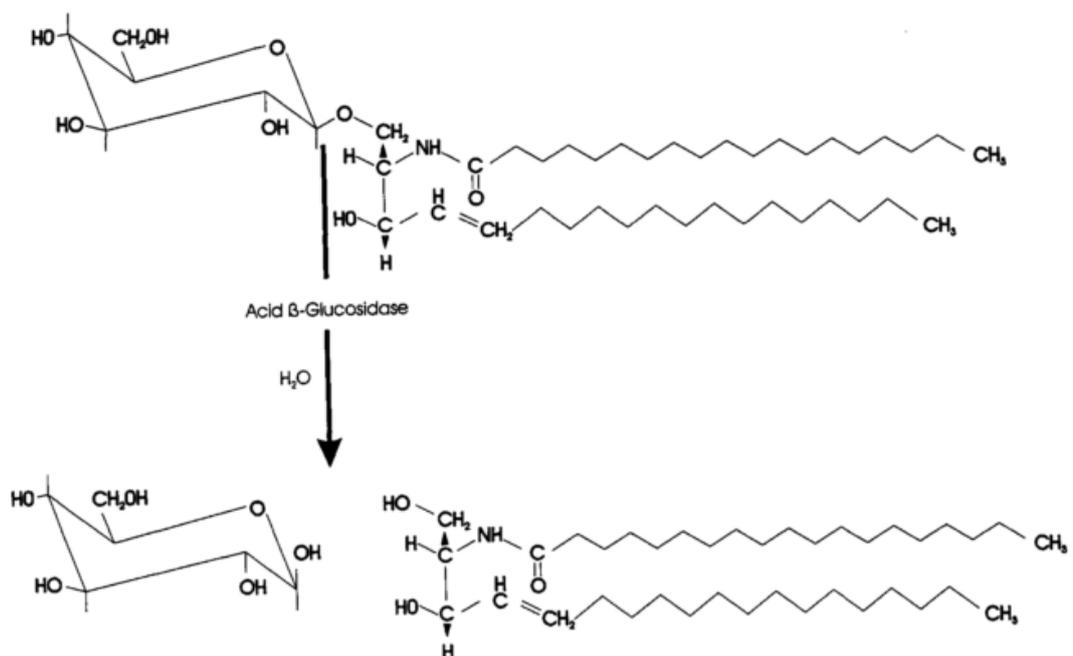


Figura 1. Esquema mostrando a conversão de glicosilceramidas (glicocerebrosídeos) em ceramida e glicose realizada pela beta-glicosidase ácida [Grabowski, 1997].

Nos pacientes com DG essa clivagem não ocorre, levando ao acúmulo de glicosilceramidas nos lisossomos principalmente das células da linhagem dos macrófagos, dando origem às “células de Gaucher” [Beutler and Grabowski, 2001]. Estas células de Gaucher podem ser observadas em punções de medula óssea, e podem ser utilizadas como forma auxiliar ao diagnóstico da doença [Zschocke and Hoffmann, 2004]. O acúmulo de glicosilceramidas é sistêmico, ocorrendo principalmente no fígado, baço, medula óssea e pulmões e em menor frequência em outros órgãos, causando diversos sintomas como hepatoesplenomegalia, citopenia periférica e osteopenia [Kaplan et al., 2006].

A Doença de Gaucher é uma doença autossômica recessiva com mais de 350 mutações descritas para o gene da GBA [Lee et al., 2012]. Estudos de correlação genótipo-fenótipo mostram que há uma correlação fraca entre as mutações e o prognóstico da doença [Jmoudiak and Futerman, 2005].

Existem três subtipos da DG conforme a presença de sintomas neurológicos. Grande parte dos pacientes, 80-90%, são diagnosticados para o subtipo I, que possuem o sistema nervoso preservado [de Fost et al., 2003]. Os subtipos II e III possuem neuropatias, sendo o subtipo II (OMIM 230900) com neuropatia aguda e o subtipo III (OMIM 231000) com neuropatia subaguda. A incidência dos subtipos com envolvimento do sistema nervoso central é de 1:100.000 [Lim-Melia and Kronn, 2009]. A diferenciação dos sintomas dos três subtipos pode ser observado na tabela 1.

Tabela 1. Sintomas encontrados em pacientes com Doença de Gaucher com os subtipos I, II e III (adaptado de ZSCHOCKE e HOFFMANN, 2004).

	Retardo	Convulsões	Hidropsia	Oligossacarídeos		
	Organomegalias	mental	Espasticidade	mioclônicas	fetal	patológicos
Gaucher subtipo I	+					+
Gaucher subtipo II	+	++	+	+	+	+
Gaucher subtipo III	+	+	(+)	(+)	(+)	+

++: característica principal; +: geralmente presente; (+): algumas vezes presente.

Outra enzima relacionada à DG é a quitotriosidase (QT; EC 3.2.1.14), o aumento da sua atividade no plasma dos pacientes é um marcador para a DG. Esse aumento pode chegar a 1000 vezes em pacientes com DG quando comparados com controles sadios [Wajner et al., 2007]. Essa enzima é secretada por macrófagos e não possui correlação com a severidade clínica, mas sim com o acúmulo de glicosilceramidas nos lisossomos das “células de Gaucher” [Bodamer and Hung, 2010].

Com o tratamento, tanto por terapia de reposição enzimática quanto de redução de substrato, os níveis de QT são reduzidos, assim sendo, este parâmetro, utilizado como controle de eficácia do tratamento [Hollak et al., 1994; Bodamer and Hung, 2010]. Em um estudo recente foi demonstrado que ao diminuir a dosagem da droga administrada no tratamento de terapia de reposição enzimática com imiglucerase houve um aumento na atividade enzimática da QT, demonstrando que o tratamento não estava sendo tão eficiente na diminuição do acúmulo das glicosilceramidas [Chien et al., 2010].

A QT, apesar de ser um marcador bastante utilizado no diagnóstico e acompanhamento do tratamento de pacientes com DG, também pode ter sua atividade aumentada nos pacientes com Doença de Krabbe, Gangliosidose

GM1 e Doença de Niemann-Pick [Wajner et al., 2007, 2004], contaminação por fungos [Wu et al., 2010; Labadaridis et al., 2005, 1998], contaminação por bactérias [Labadaridis et al., 2005] e em pacientes com Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) [Létuvé et al., 2010].

### *Diagnóstico*

O diagnóstico da DG não pode ser feito levando em consideração somente os sintomas clínicos, por haver semelhanças clínicas com a doença de Niemann-Pick tipos A, B ou C [Michelin et al., 2005; Lo et al., 2010]. Deste modo, o diagnóstico deve ser realizado através da medida da atividade enzimática da enzima deficiente. A quantificação da GBA em leucócitos e/ou fibroblastos atualmente é utilizada como diagnóstico enzimático para DG, contribuindo, junto com os sintomas clínicos, para o diagnóstico definitivo da DG [Keutzer and Yee, 2008; Zschocke and Hoffmann, 2004]. Além disso, a quantificação da QT no plasma é utilizada como forma auxiliar ao diagnóstico enzimático da doença, porém tem-se que levar em consideração que 5% da população é homozigota para a duplicação de 24 pb no exon 10 do gene da QT, que confere uma deficiência na atividade desta enzima. Nestes casos, a QT não pode ser utilizada no auxílio ao diagnóstico [Boot et al., 1998].

Além do diagnóstico bioquímico/enzimático está disponível o diagnóstico molecular, através da análise das mutações no gene da GBA. Atualmente existe mais de 350 mutações descritas em pacientes com DG, o que dificulta a genotipagem dos pacientes [Lee et al., 2012]. Para a grande maioria das mutações não é observada uma correlação genótipo-fenótipo, com algumas

exceções como para a mutação L444P que quando em homozigose está presente nos casos de DG com sintomas neurológicos (subtipo II) e a mutação N370S que é quase que exclusivamente encontrada em pacientes do subtipo I [Bodamer and Hung, 2010]. Na população judaica Askenasi há uma maior frequência da mutação N370S [Hruska et al., 2008]. Deste modo, a genotipagem dos pacientes se torna um diagnóstico demorado e de alto custo pela grande variedade de mutações e falta de correlação genótipo-fenótipo.

### *Tratamento*

Existem 5356 pacientes diagnosticados para DG no mundo, sendo que 531 estão no Brasil (ICGG Gaucher Registry, 2009). A estimativa é de que a cada ano 250 novos pacientes iniciem tratamento [Charrow et al., 2000].

De acordo com a Portaria 708, de 25 de outubro de 2011, da Secretaria de Atenção a Saúde, o governo através do Sistema Único de Saúde (SUS) oferece aos pacientes de DG quatro medicamentos para o tratamento: imiglucerase, alfavelaglucerase e taliglucerase para Terapia de Reposição Enzimática (TRE) e miglustate para Inibição da Síntese de Substrato (ISS). Estes medicamentos estão disponíveis para os pacientes com DG com os subtipos I e III, que não apresentam sintomas neurológicos, já que não há resultados comprovando a eficiência em pacientes com o subtipo II, que possuem alterações neurológicas acentuadas.

A DG foi a primeira DLD a ter disponível o tratamento de Terapia de Reposição Enzimática (TRE) com a droga imiglucerase (Cerezyme®; Genzyme

Inc, Cambridge, MA, USA) que é produzida em células de ovário de hamster [Barton et al., 1991]. A Alfavelaglucerase (VPRIV®; Shire Human Genetic Therapies, Dublin, Irlanda) é outra droga que é utilizada como TRE, porém é produzida em células humanas [Burrow and Grabowski, 2011]. Uma terceira droga para TRE é a taliglucerase (Protalix Biotherapeutics, Carmiel, Israel), produzida em células de cenoura [Aviezer et al., 2009; Shaaltiel et al., 2007]. Os pacientes adultos com DG subtipo I que apresentam contra-indicação ou não toleram a TRE podem fazer uso da terapia ISS. Esta, utiliza a droga N-butyldeoxynojirimycin (Miglustate, Zavesca® ou OGT918; Actelion Pharmaceuticals, Allschwill, Suíça) através de administração oral de 100 mg, três vezes ao dia [Mehta, 2006]. O miglustate é um iminoaçúcar análogo à glicose, que age como inibidor da glicosilceramida sintase, enzima responsável pelo primeiro passo da síntese dos glicoesfingolipídios, que converte as ceramidas em glicocerebrosídeos [Cox et al., 2000; Ficicioglu, 2008].

### ***Diagnóstico das DLDs***

O diagnóstico das DLDs, assim como o da DG, não pode ser realizado somente levando em consideração os sintomas clínicos dos pacientes. É necessária a realização de exames laboratoriais específicos como a medida da atividade enzimática. A grande variedade de sintomas e a semelhança destes entre as diferentes DLDs fazem com que o diagnóstico de uma DLD seja demorado necessitando o acompanhamento de um médico especializado [Staretz-Chacham et al., 2009].

Atualmente o diagnóstico laboratorial é baseado na atividade específica de enzimas em plasma, leucócitos e/ou fibroblastos [Zschocke and Hoffmann, 2004]. Para a quantificação em plasma e leucócitos são necessários aproximadamente 9 mL de sangue, variando conforme o número de enzimas a serem analisadas. Para a análise ser adequada as amostras devem ser processadas o quanto antes e devem ser armazenadas no mínimo a -20°C [Wajner et al., 2007]. O transporte das amostras também deve ser feito refrigerado para a preservação das enzimas durante o transporte até o laboratório [Wajner et al., 2007].

A coleta de material para o diagnóstico utilizando fibroblastos causa desconforto para o paciente, pois é feita a retirada de um pedaço de pele (biópsia de pele) de aproximadamente 3 a 5 mm do antebraço [Sopelsa et al., 2000]. Além disso, após a coleta são necessários de um a dois meses de cultivo dos fibroblastos até que se obtenha a quantidade necessária para que seja feita a medida da atividade enzimática.

O uso de sangue impregnado em papel filtro (SPF) como forma de triagem de novos pacientes com DLDs vem sendo ampliado por diversos grupos de pesquisa [Chamoles et al., 2002; Civallero et al., 2006; Rodrigues et al., 2009], porém não é utilizado como forma de diagnóstico final. Isso ocorre, pois as quantificações em SPF são feitas em atividade enzimática total e não em atividade enzimática específica como em leucócitos, plasma ou fibroblastos. As técnicas em SPF padrão são feitas somente medindo a atividade enzimática através da clivagem de um substrato artificial, geralmente ligado a um radical 4-metilumbeliferil. Deste modo o resultado pode ser alterado devido a fatores como: quantidade de sangue impregnado, forma de secagem e local do picote no papel [Elbin et al., 2011; Mei et al., 2001; Adam et al., 2011]. Estudos mostram que o uso do SPF como forma de triagem neonatal gera resultados falso-positivos [Fletcher and Wilcken, 2011; Reuser et al., 2011], com taxas variando de 5% [Clague and Thomas, 2002] a 6% [Goldstein et al., 2009]. Quando é utilizada uma técnica de SPF onde há a correção do volume amostral ou controle interno a taxa de falso-positivo é reduzida a 1% [Clague and Thomas, 2002].

Na triagem neonatal também são utilizadas amostras em SPF, porém com técnicas em espectrofotometria de massa, não fluorimétricas como aqui propostas. O equipamento para espectrofotometria de massa é de custo muito elevado, inviabilizando que as técnicas sejam feitas em pequenos centros de diagnóstico. Essas técnicas utilizam hematócrito de 55%, como forma de correção da concentração da amostra [De Jesus et al., 2009].

A utilização de SPF como forma de triagem seja de pacientes de alto risco ou triagem neonatal tem diversas vantagens como: fácil transporte das

amostras, podendo ser enviado via correio em envelope convencional, sem necessidade de refrigeração [Rodrigues et al., 2009]; fácil armazenagem das amostras, com atividade preservada até seis meses a temperatura ambiente e durante dois anos a 4 °C [Gasparotto et al., 2009; de Castilhos et al., 2011a, 2011b]; menor volume de reação, economizando reagentes e quantidade de amostra, se tornando mais barato que o uso de leucócitos, plasma ou fibroblastos [Civallero et al., 2006]; e, segurança na manipulação das amostras, pois se trabalha com material seco e não líquido, diminuindo a contaminação por agentes patogênicos como HIV e Hepatite B [Rodrigues et al., 2009].

O uso de SPF também reduz o tempo de diagnóstico, quando comparado com leucócitos, pois não há a necessidade de haver a separação celular e a lise celular das amostras para liberação do material do interior do lisossomo. Além disso, com a redução de duas técnicas no processamento da amostra, há uma menor manipulação e perda de material.

### ***Enzimas lisossômicas abordadas no trabalho***

Neste trabalho foram utilizadas as seguintes enzimas lisossômicas: beta-glicosidase (GBA) para o diagnóstico de DG, quitotriosidase (QT) como auxiliar ao diagnóstico e como forma de acompanhamento do tratamento, e beta-galactosidase (GLB) como controle interno da amostra para evitar o uso de amostras que tenham sido degradadas.

### ***Estabelecimento da atividade enzimática***

A atividade enzimática específica é expressa em nmol/h/mg de proteína para amostras em leucócitos e fibroblastos. Esse cálculo é feito para que seja feita a correção da atividade enzimática pelo tempo de incubação com o substrato da reação e o volume de amostra. O cálculo do volume da amostra é feito a partir da quantidade de proteínas totais, já que a amostra é preparada a partir de um precipitado de células que é diluído em água para a realização do ensaio enzimático, assim a quantidade de água e células pode alterar os resultados.

Para que o diagnóstico utilizando SPF seja considerado definitivo é necessário padronizar técnicas que possam ser utilizadas como forma de controle de volume de amostra. Esse controle de volume de amostra é importante para poder ter certeza de que o resultado não foi alterado devido a maior impregnação de sangue, qualidade do papel filtro ou procedimento de coleta [Civallero et al., 2006]

Nesse estudo foram padronizadas técnicas para a determinação da atividade específica de hidrolases lisossômicas em SPF a partir da quantificação de proteínas totais. A quantificação de proteínas totais em SPF foi realizada a partir da técnica proposta por Lowry *et al* [1951], esta técnica já é utilizada pelo nosso laboratório para o estabelecimento da atividade específica em leucócitos e fibroblastos. A técnica foi adaptada a fim de possibilitar a quantificação de proteínas totais a partir de SPF eluido com tampão universal (TU).

### ***Tampão Universal***

O Tampão Universal (TU) consiste em um tampão de 20 mmol/L de fosfato de sódio, pH 7,0 que é utilizado como tampão de eluição único para SPF para medida da atividade enzimática de cinco enzimas lisossômicas em espectrofotometria de massa [Li et al., 2004]. A utilização deste tampão reduz o volume de amostra e possibilita a quantificação de diversas enzimas a partir de uma mesma eluição de SPF. Na espectrofotometria de massa ele é utilizado para a quantificação de metabólitos em SPF [Chace et al., 2003]. Essas técnicas utilizam pequenas quantidades de amostra, porém o custo do equipamento é muito alto, se tornando uma técnica inviável para pequenos centros de diagnóstico.

Neste trabalho, essa forma de eluição foi adaptada para técnicas fluorimétricas, sendo possível o controle do volume da amostra, pela quantificação de proteínas totais, para o estabelecimento da atividade específica de enzimas lisossômicas. Com esta eluição, de um único picote, é possível fazer alíquotas para a medida da atividade enzimática e também para quantificação de proteínas totais, reduzindo a quantidade de amostra e aumentando a segurança dos resultados.

## **Objetivos do trabalho**

### ***Objetivo geral***

Validar as técnicas fluorimétricas para o estabelecimento da atividade específica de hidrolases lisossômicas em sangue impregnado em papel filtro.

### ***Objetivos específicos***

- 1) Miniaturizar a técnica de medida da atividade da beta-glicosidase (GBA) e da quitotriosidase (QT) em sangue impregnado em papel filtro e leucócitos.
- 2) Estabelecer um protocolo para triagem de novos pacientes em população de alto-risco para a Doença de Gaucher utilizando a medida da atividade enzimática em sangue impregnado em papel filtro como triagem inicial e confirmação em leucócitos e plasma utilizando técnicas com volume reduzido.
- 3) Padronizar a solução de eluição Tampão Universal para sangue impregnado em papel filtro com métodos fluorimétricos para a medida da atividade das enzimas GBA e QT e para a quantificação de proteínas.
- 4) Estabelecer a atividade específica da QT e da GBA após correção da mesma pelas proteínas totais.
- 5) Correlacionar os resultados das quantificações em sangue impregnado em papel filtro com os resultados em leucócitos e plasma.
- 6) Estabelecer os coeficientes de variação e a estabilidade da atividade específica da GBA e QT.

## **Parte II**

### **Capítulo I - Materiais e Métodos**

#### ***Local de execução***

Essa dissertação foi executada no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo - Doenças Lisossômicas de Depósito (LEIM-DLD, laboratório 25) do Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

#### ***Amostras***

Foi feito o cálculo de tamanho de amostra para comparação entre médias com variâncias diferentes, estabelecendo o nível de significância em 5% e o poder em 90%. Para isso foi utilizado o programa estatístico MiniTab®. A estimativa de tamanho de amostra foi de oito indivíduos por grupo por enzima, ou seja, seriam necessários oito indivíduos saudáveis e oito pacientes homozigotos para DG.

#### ***Grupo controle***

As amostras de sangue utilizadas como controles saudáveis foram coletadas de doadores voluntários do Banco de Sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Os doadores voluntários para o projeto assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (anexo 1). As amostras foram

devidamente identificadas com números, preservando a identidade dos doadores, que não foram informados dos resultados e nem sua identidade revelada em nenhuma etapa de execução do trabalho.

Foram coletados 9 mL de sangue com anticoagulante heparina de cada indivíduo. Deste sangue foram pingadas duas gotas, uma sobre a outra, em cada círculo do cartão de papel filtro (Whatman 903®; Whatman Inc., EUA). As amostras de sangue em papel filtro foram secas em temperatura ambiente (~25°C) por no mínimo três horas em posição horizontal. O restante do sangue foi processado para a separação do plasma, por centrifugação a 2000 rpm durante dez minutos (Baby I Centrifuge Mod. 206, Fanem, Brasil), e de leucócitos de acordo com o método de Skoog e Beck (1956).

Segundo este método foi misturado ao sangue total o mesmo volume de solução de separação de leucócitos (glicose 5% + dextran 6% + ácido cítrico dextrose). Esta mistura foi homogeneizada levemente por inversão e ficou em temperatura ambiente de 45 a 60 minutos sedimentando os eritrócitos. Após transcorrido o tempo, o sobrenadante foi transferido para um tubo cônico plástico gelado (TPP, Techno Plastic Products, Suíça) e centrifugado (himac CR22GII, Hitachi Ltd, Japão) a 2000 rpm por 10 min a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e adicionado NaCl 0,9%. Os leucócitos foram suspensos com vortex (MA-162, Marconi, Brasil). Água destilada gelada foi adicionada e bem homogeneizada com o auxílio de vortex e ficou por 90 segundos no gelo. NaCl 3,6% foi adicionado e centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos a 4°C. Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante e, se ainda existiam eritrócitos no sedimento, foi repetida a

adição do NaCl e a centrifugação anterior. O sedimento de leucócitos foi armazenado a -20°C até o momento das análises.

Antes da medida da atividade enzimática nos leucócitos isolados, foi necessária a diluição do sedimento com água destilada e a sonicação das mesmas para que as membranas plasmáticas e lisossomais fossem lisadas para a liberação das enzimas lisossômicas. A sonicação (Sonicator Ultrasonic Processor, Hert Systems) foi feita utilizando dois ciclos de 25 segundos intercalados por 30 segundos com intensidade de 7,5 a 10%, que representa 45 W, com as amostras em banho de gelo.

### ***Grupo experimental***

No período de abril de 2010 a setembro de 2011, nosso laboratório recebeu 274 amostras de SPF de indivíduos com suspeita de DG. Os médicos responsáveis por estas coletas procederam, segundo instruções de nosso laboratório, da mesma maneira citada acima para a obtenção das amostras controles. Nestas amostras foram medidas as atividades da GBA e da QT em SPF. Após esta triagem inicial, aqueles indivíduos que tiveram a atividade da GBA diminuída e a QT elevada no SPF, foram comunicados e a coleta de 9 mL de sangue heparinizado para a confirmação do diagnóstico bioquímico em leucócitos (GBA) e plasma (QT), foi solicitada. As amostras de sangue heparinizado foram processadas da mesma forma que aquelas dos controles saudáveis.

Amostras de pacientes já diagnosticados para DG que estavam em tratamento também foram recebidas por nosso laboratório para

acompanhamento do tratamento, através da medida da atividade da QT em plasma e SPF, utilizando a mesma técnica utilizada para o diagnóstico.

Após a confirmação do diagnóstico, as amostras foram incluídas neste projeto como controles positivos para DG. Os heterozigotos obrigatórios foram os pais e mães de pacientes diagnosticados com DG.

### ***Armazenamento das amostras***

As amostras de SPF foram armazenadas a +4°C, em geladeira, em sacos plásticos individuais com dissecante. Já as amostras de plasma e leucócitos foram armazenadas a -20°C e após serem analisadas foram armazenadas a -80°C. Todas as amostras foram devidamente identificadas somente com números para a preservação da identidade dos indivíduos.

### ***Miniaturização da técnica de leucócitos***

Neste trabalho utilizamos a técnica de Peters et al. [1976] para medida da atividade enzimática da GBA como forma de diagnóstico da DG e a técnica de Suzuki e Suzuki [1970] para a medida da atividade da beta-galactosidase (GLB) como forma de testar a integridade da amostra. Estas técnicas, realizadas conforme citam os autores acima, serão a partir de agora denominadas de técnicas padrão. As técnicas padrão foram também miniaturizadas a fim de serem efetuadas e lidas em placa de 96 poços, havendo uma diminuição do volume de amostra bem como dos custos do ensaio e não necessitando a transferência do material do tubo de ensaio para a

cubeta de leitura como preconizado pelos autores acima. As técnicas foram reduzidas quatro vezes para GBA e dez vezes para GLB. A alteração dos protocolos pode ser observada na tabela 2.

Tabela 2. Protocolos de medida da atividade da GBA e da GLB para leucócitos, técnicas padrão e miniaturizada.

Enzima	Volume de amostra	Tampão de eluição	Substrato	Tempo de incubação	Tampão de parada da reação
beta-glicosidase (GBA)	20 $\mu$ L	50 $\mu$ L de tampão citrato fosfato 0,54 mol/L, pH 5.5	100 $\mu$ L de 4-metilumbeliferil $\beta$ -D-glicosídeo 10 mmol/L com 50 mmol/L de taurocolato de sódio em água destilada	1 hora	1,5 mL de tampão glicina-NaOH 0,5 M pH 10,5
	5 $\mu$ L	12,5 $\mu$ L de tampão citrato fosfato 0,54 mol/L, pH 5.5	25 $\mu$ L de 4-metilumbeliferil $\beta$ -D-glicosídeo 10 mmol/L com 50 mmol/L de taurocolato de sódio em água destilada		200 $\mu$ L de tampão glicina-NaOH 0,5 M pH 10,5
beta-galactosidase (GLB)	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L de NaCl 0,2 M	200 $\mu$ L de 4-Metilumbeliferil- $\beta$ -D-galactosídeo 1,33 mM	1 hora	2 mL de tampão glicina-NaOH 0,5 M pH 10,5
	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L de NaCl 0,2 M	20 $\mu$ L de 4-Metilumbeliferil- $\beta$ -D-galactosídeo 1,33 mM		200 $\mu$ L de tampão glicina-NaOH 0,5 M pH 10,5

As reações, conforme a técnica padrão, foram realizadas em tubos de ensaio de vidro. Após o término da reação, 200  $\mu$ l foram transferidos para placas fluorimétricas pretas de 96 poços (OptiPlate™ -96F, Perkin Elmer), para

a realização da leitura da fluorescência com leitor de placa a 365 e 450 nm (SpectraMax M5 – Molecular Devices). Já as reações miniaturizadas foram efetuadas e lidas diretamente nas placas pretas de 96 poços. Ambas as incubações foram realizadas a 37°C em incubadora de placas a seco com agitação (Marconi MA-127).

As técnicas foram comparadas por correlação de Pearson e foram estabelecidos valores de referência e ponto de corte para a técnica miniaturizada utilizando curva ROC com 100% de sensibilidade e especificidade.

#### ***Atividade enzimática da QT em plasma***

A técnica para a medida da atividade enzimática da QT em plasma utilizada foi aquela descrita por HOLLAK *et al.* (1994), mas foram estabelecidos novos valores de referência e ponto de corte utilizando curva ROC com 100% de sensibilidade e especificidade.

#### ***Miniaturização da técnica de SPF***

As técnicas para medida da atividade da GBA e da QT foram miniaturizadas a partir da técnica padrão de Civallero *et al.* (2006), onde era utilizado um picote de 3 mm de diâmetro como amostra. Nossa miniaturização consistiu em reduzir o tamanho do picote para 1,2 mm de diâmetro (figura 2) e

o volume da reação em 2,5 vezes, a fim de serem incubadas e lidas em placas fluorimétricas pretas de 96 poços.



Figura 2. Cartão Whatman 903 utilizado para amostras em sangue impregnado em papel filtro. No segundo círculo, esquerda para direita, foram feitos picotes de 3 mm e nos círculos seguintes picotes de 1,2 mm.

As medidas em picotes de 3 mm foram feitas em tubos plásticos de 1,5 mL. Após o término da reação, foram transferidos 200  $\mu$ l do conteúdo do tubo para placas fluorimétricas pretas de 96 poços para a realização da leitura da fluorescência com leitor de placa a 365 e 450 nm. Ambas as incubações foram realizadas a 37°C em incubadora de placas a seco com agitação. As relações entre os reagentes foram mantidas, conforme tabela 3.

Tabela 3. Protocolos de medida da atividade enzimática da GBA e da QT para SPF, técnica padrão de 3 mm (Civallero et al, 2006) e 1,2 mm (miniaturizada).

Enzima	Diâmetro do picote de SPF	Tampão de eluição	Substrato	Tempo de incubação	Tampão de parada da reação
beta-glicosidase (GBA)	3 mm	50 µl de tampão citrato fosfato 0,54 mol/L, pH 5.5	100 µL de 4-metilumbeliferil β-D-glicosídeo 10 mmol/L com taurodeoxicolato de sódio 50 mmol/L em água destilada	5 horas	1,5 mL de tampão glicina-NaOH 0,5 M pH 10,5
	1,2 mm	20 µl de tampão citrato fosfato 0,54 mol/L, pH 5.5	40 µL de 4-metilumbeliferil β-D-glicosídeo 10 mmol/L com taurodeoxicolato de sódio 50 mmol/L em água destilada		200 µL de tampão glicina-NaOH 0,5 M pH 10,5
Quitotriosidase (QT)	3 mm	40 µL de 0,25 mol/L acetato de sódio, pH,5,5	40 µL de 0,19 mmol/L 4-metilumbeliferil β-D-NN'-N"-triacetilquitotriosídeo em água destilada	30 min	1,2 mL de 0,13 M etilenodiamina, pH 11,3
	1,2 mm	15 µL de 0,25 mol/L acetato de sódio, pH,5,5	15 µL de 0,19 mmol/L 4-metilumbeliferil β-D-NN'-N"-triacetilquitotriosídeo em água destilada		200 µL de 0,13 M etilenodiamina, pH 11,3

Após o estabelecimento das técnicas miniaturizadas foi feita correlação (Pearson para GBA e Spearman para QT) com as técnicas de Civallero et al (2006). Assim foram estabelecidos novos valores de referência e ponto de corte, utilizando a análise estatística por curva ROC, com 100% de sensibilidade e especificidade.

### ***Estabelecimento do tempo e temperatura ideal para eluição com o Tampão Universal***

Quinze amostras de controles saudáveis foram utilizadas para o estabelecimento do melhor tempo e temperatura de incubação com o Tampão Universal. Foram testadas duas temperaturas (30 e 37°C) e quatro tempos (10, 20, 30 e 60 minutos). Cada uma das amostras foi testada para todas as temperaturas e tempos separadamente utilizando sempre um picote de 3 mm de diâmetro de SPF e adicionando-se ao picote 40 µL de tampão fosfato de sódio 20 mmol/L, pH 7,0 (Tampão Universal, TU) em uma placa de 96 poços com fundo cônico (Sarstedt). As amostras foram agitadas manualmente a fim de eliminar bolhas e garantir que o picote estava em contato com o tampão e foram incubadas em uma incubadora de placas a seco na temperatura e no tempo a ser testado. Após a eluição com o TU foram retiradas três alíquotas de 10 µL para a medida da atividade enzimática de QT e GBA, e a quantificação de proteínas totais. Para a medida da atividade enzimática foi feita a técnica que utiliza o picote de 1,2 mm e para a quantificação de proteínas totais foi feita a técnica descrita por Lowry *et al* [1951]. Todas as reações foram feitas no

mesmo dia. A análise estatística foi feita utilizando ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Bonferroni.

### ***Quantificação de proteínas totais em SPF***

Para quantificar as proteínas, foi utilizada a técnica colorimétrica de Lowry *et al* [1951] miniaturizada, que atualmente é utilizada pelo nosso laboratório para dosagem de proteínas totais em leucócitos. Essa técnica utiliza somente 10  $\mu\text{L}$  de amostra e é toda feita em placas transparentes de fundo plano de 96 poços (PE SpectraPlate™ -96TC, Perkin Elmer).

O protocolo consiste em preparar uma curva de oito pontos variando a concentração de 2,5 a 100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de albumina, com o volume final de 50  $\mu\text{L}$ . Para a reação foram utilizados 10  $\mu\text{L}$  de amostra (SPF eluido com TU) com 40  $\mu\text{L}$  de água destilada. O controle negativo foi feito utilizando-se 50  $\mu\text{L}$  de água destilada. Em todos os tubos foram adicionados 150  $\mu\text{L}$  de reativo alcalino de cobre. Os tubos foram agitados e incubados por 10 min em temperatura ambiente. Após foi adicionado, sob agitação em vortex, 15  $\mu\text{L}$  de Folin-Ciocalteus (Merck) diluído 1,4 vezes em água destilada e incubado por 30 min em temperatura ambiente. A leitura a 750 nm de absorbância foi feita em espectrofotômetro com leitor de placa.

### ***Estabelecimento da atividade específica em SPF***

Após a padronização do tempo e temperatura de eluição do SPF com o TU, foram medidas as atividades das amostras de SPF de controles saudáveis (n=15), pacientes com DG (n=9), pacientes com DG em tratamento (n=15) e heterozigotos obrigatórios (n=4), onde foi obtida a atividade da GBA e da QT corrigida pela quantificação de proteínas totais, a fim de estabelecer a atividade específica.

Foi feita uma análise por ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey, para GBA e proteínas totais e Kruskal-Wallis para QT, para diferenciação entre os grupos. Também foi feita curva ROC, com 100% de sensibilidade e especificidade, para determinação do ponto de corte e valores de referência.

### ***Validação da atividade específica em SPF***

Para a validação das técnicas de medida da atividade específica em SPF foi determinado o coeficiente de variação intra-ensaio, interensaio e inter-pessoal. Para estas determinações foram utilizadas quatro amostras de SPF de pacientes com DG e quatro amostras de controles saudáveis e, então, realizadas as medidas das atividades das enzimas QT e GBA.

Para a análise intra-ensaio foram feitos dois experimentos diferentes: no primeiro, a partir de um picote de 3 mm eluido com TU, foram feitas duas alíquotas e comparadas as atividades enzimáticas na mesma reação

enzimática; e no segundo, três picotes diferentes, de cada amostra, foram eluidos com TU e as atividades enzimáticas comparadas.

Para o estabelecimento do coeficiente de variação interensaio foram realizadas três reações enzimáticas diferentes, utilizando as mesmas amostras de SPF.

Para o coeficiente de variação interpessoal foram comparados os resultados obtidos por dois pesquisadores treinados simultaneamente.

Os resultados foram analisados por ANOVA de uma via de medidas repetidas para as análises intraensaio e interensaio. Já para a análise do coeficiente de variação interpessoal foi feito teste *t* de Student.

Também foi testado se o local do SPF onde é feito o picote de 3 mm para a medida da atividade enzimática pode influenciar o resultado. Para isso foram testados dois locais de picote no sangue seco: central e periférico (figura 3). Após, os resultados foram comparados por teste *t* de Student.

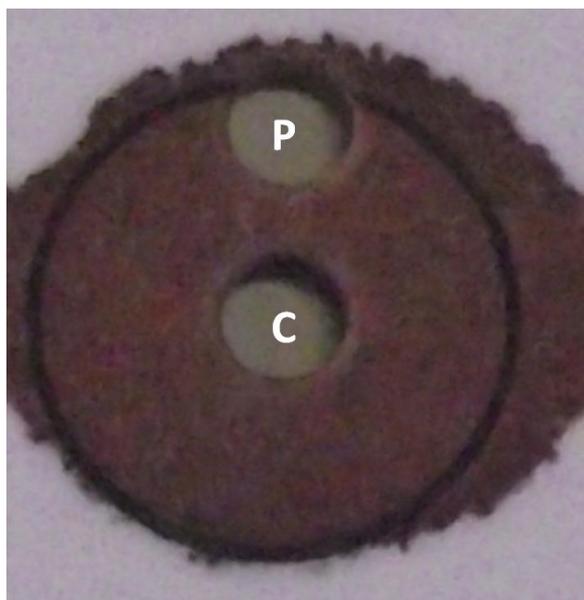


Figura 3. Cartão Whatman 903 com sangue impregnado mostrando como foram feitos os picotes de 3 mm centrais (C) e periféricos (P) para testar se o local do picote influenciaria a atividade enzimática com TU.

A estabilidade enzimática na amostra de SPF foi testada a partir do armazenamento de oito amostras a 4°C, em sacos plásticos individuais com dissecante, por 21 dias. Os resultados foram analisados por ANOVA de 1via.

### ***Descarte de materiais***

O sangue processado foi descartado na pia junto com hipoclorito de sódio (conforme orientação da Vigilância Ambiental/UFRGS). Os rejeitos gerados das reações colorimétricas e fluorimétricas foram depositados em containers devidamente classificados com os seus reagentes em sala especial no Departamento de Bioquímica. Todos os materiais plásticos utilizados foram de uso descartável e foram descartados como lixo contaminado A1 em sacos brancos, que foram armazenados temporariamente no laboratório e após, levados até o ponto de coleta do Departamento (armazenamento externo), em bombonas próprias para este fim. Estas foram recolhidas pela empresa Aborgama do Brasil Ltda que é a responsável pelo transporte externo, tratamento e disposição final.

### ***Considerações éticas***

Esta pesquisa seguiu as condições estabelecidas na declaração de Helsinque e na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares em especial a 340/04. Foi categorizada no Grupo II (risco mínimo) – coleta de material do paciente. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS sob o número 18166.

## Capítulo II – Resultados

### **1. Miniaturização das técnicas de medida da atividade enzimática e correlação com as técnicas padrão**

#### *1.1. Miniaturização das técnicas em leucócitos*

As medidas das atividades enzimáticas, cujas técnicas foram miniaturizadas para placas de 96 poços obtiveram uma correlação positiva com a técnica padrão, realizada em tubo de ensaio, sendo  $r$  Pearson = 0,74 para GBA e 0,95 para GLB. Com isso foram estabelecidos novos valores de referência para o diagnóstico de DG (tabela 4).

Tabela 4. Valores de referência estabelecidos para a medida da GBA e GLB em leucócitos.

Enzima	n	Atividade enzimática (nmol/h/mg de proteína)*	Ponto de corte
<i>GBA</i>			
Pacientes com DG	30	ND-5,03 (1,38 ± 1,60)	6,52
Controles saudáveis	36	8,01-35,63 (16,15 ± 6,65)	
<i>GLB</i>			
Controles saudáveis	36	73,2 a 250,6 (157,9 ± 69,3)	70,00

ND = não detectável; \* variação (média ± desvio padrão)

A medida da atividade da GBA foi de  $16,15 \pm 6,65$  nmol/h/mg de proteína para controles saudáveis e  $1,38 \pm 1,6$  nmol/h/mg de proteína para

pacientes com DG na técnica miniaturizada. Os mesmos, na técnica padrão foram  $11,56 \pm 7,36$  nmol/h/mL e  $2,39 \pm 1,93$  nmol/h/mL.

Os resultados de atividade normal para GLB miniaturizada variaram de 73,2 a 250,6 nmol/h/mg de proteína ( $157,9 \pm 69,3$ ). Como esta enzima estava sendo utilizada para verificarmos a integridade da amostra, as amostras com atividade de GLB inferior a 70 nmol/h/mg de proteína foram descartadas da análise e novo material foi solicitado. Já na técnica padrão, encontramos valores de  $57,5 \pm 48,6$  nmol/h/mg de proteínas.

Como houve correlação significativa, Pearson  $r > 0,70$ , entre as técnicas padrão e as técnicas miniaturizadas em leucócitos, a técnica miniaturizada foi considerada válida e todas as medidas realizadas a partir deste momento, foram feitas utilizando-se estas técnicas de menor volume.

### *1.2. Miniaturização da técnica de SPF*

As medidas realizadas diretamente na placa de 96 poços com o picote de 1,2 mm (miniaturizadas) tiveram correlação positiva com as realizadas em tubo com o picote de 3 mm de amostra (Spearman = 0,98 para QT e Pearson = 0,77 para GBA). Com isso foram estabelecidos novos valores de referência para a triagem da DG (tabela 5).

Tabela 5. Valores de referência estabelecidos para a medida da GBA e QT em SPF.

Enzima	n	Atividade enzimática (nmol/h/mL) *	Ponto de corte
<i>GBA</i>			
Pacientes com DG	27	ND-2,50 (1,06 ± 0,67)	2,77
Controles saudáveis	21	3,04-7,09 (4,60 ± 1,08)	
<i>QT</i>			
Pacientes com DG	22	38,04-2.249 (552,00 ± 619,80)	46,10
Controles saudáveis	36	ND-44,51 (17,61 ± 11,66)	

ND = não detectável; \* variação (média ± desvio padrão)

A média da atividade da GBA em picotes de 1,2 mm foi de  $4,60 \pm 1,08$  nmol/h/mL para os controles saudáveis e para os pacientes com DG foi de  $1,06 \pm 0,67$  nmol/h/mL. Estas amostras quando medidas em SPF utilizando a técnica padrão com picotes de 3 mm obtiveram as médias de  $5,31 \pm 1,28$  nmol/h/mL e  $0,60 \pm 0,36$  nmol/h/mL, respectivamente. Já para a QT as médias em picotes de 1,2 mm foi de  $17,61 \pm 11,66$  nmol/h/mL e  $552,00 \pm 619,80$  nmol/h/mL para controles saudáveis e pacientes com DG respectivamente. E em 3 mm as médias dos mesmos foram de  $3,75 \pm 2,79$  nmol/h/mL e  $47,85 \pm 46,07$  nmol/h/mL

Como houve correlação significativa, Pearson e Spearman  $r > 0,70$ , entre as técnicas padrão (realizadas em tubo de ensaio) e as técnicas miniaturizadas em SPF, as técnicas miniaturizadas foram consideradas válidas e todas as medidas realizadas a partir deste momento, foram feitas utilizando-se estas técnicas de menor volume.

### 1.3. Atividade enzimática da QT em plasma

A técnica para o estabelecimento da atividade enzimática da QT em plasma utilizada foi aquela descrita por Hollak et al [1994], mas foram estabelecidos novos valores de referência segundo a tabela 6.

Tabela 6. Valores de referência estabelecidos para a medida da QT em plasma.

Enzima	n	Atividade enzimática (nmol/h/mL) *	Ponto de corte
QT			
Pacientes com DG	28	130,70-53.991 (14.951 ± 16.477)	190,30
Controles saudáveis	33	1,74-175,70 (68,75 ± 45,27)	

\* variação (média ± desvio padrão)

#### 1.4. *Triagem em pacientes de alto risco*

Uma vez padronizadas as técnicas miniaturizadas e estabelecidos as médias e variações de atividade dentro dos grupos, propusemos um protocolo para triagem de DG em populações de alto risco.

A triagem das amostras em SPF foi realizada através da medida da atividade da GBA e da QT. Foi enviado ao nosso laboratório material de 274 indivíduos com suspeita de DG. Após medida das atividades enzimáticas, quando os valores encontrados foram menores que 2,77 nmol/h/mL para GBA e maiores que 46,10 nmol/h/mL para QT, de acordo com o ponto de corte estabelecido (tabela 5), foi solicitada uma amostra de 9 mL de sangue heparinizado.

O diagnóstico definitivo de DG foi estabelecido quando a atividade enzimática do paciente apresentou valores menores que 6,52 nmol/h/mg de proteína para GBA (tabela 4) em leucócitos e valores maiores que 190,3 nmol/h/mL de QT em plasma (tabela 6). Além disso, quando a atividade de GLB, enzima de controle interno, foi menor que 70 nmol/h/mg de proteína essas amostras foram descartadas e solicitada uma nova coleta de sangue.

Após a triagem inicial em SPF, 94 amostras (34,3%) obtiveram a atividade da GBA diminuída e da QT elevada (figura 4). Para estes indivíduos foi solicitada uma coleta de 9 mL de sangue para a confirmação do diagnóstico bioquímico em leucócitos (GBA) e plasma (QT). Destes, recebemos o sangue em heparina de 72 indivíduos (76,5%), onde houve a confirmação do resultado em 37, representando 55,2% das amostras de leucócitos enviadas em boas condições para análises (figura 4). Cinco amostras, 6,9%, recebidas para a

confirmação do diagnóstico em leucócitos e plasma não foram consideradas em condições para a análise, pois a atividade da GLB foi menor do que 70 nmol/h/mg de proteína. Destes indivíduos, mesmo sendo solicitado uma nova coleta, esta não foi enviada. Considerando todas as amostras enviadas com suspeita de DG, foram obtidos 13,5% de resultados positivos distribuídos pelas 5 regiões brasileiras (tabela 7).

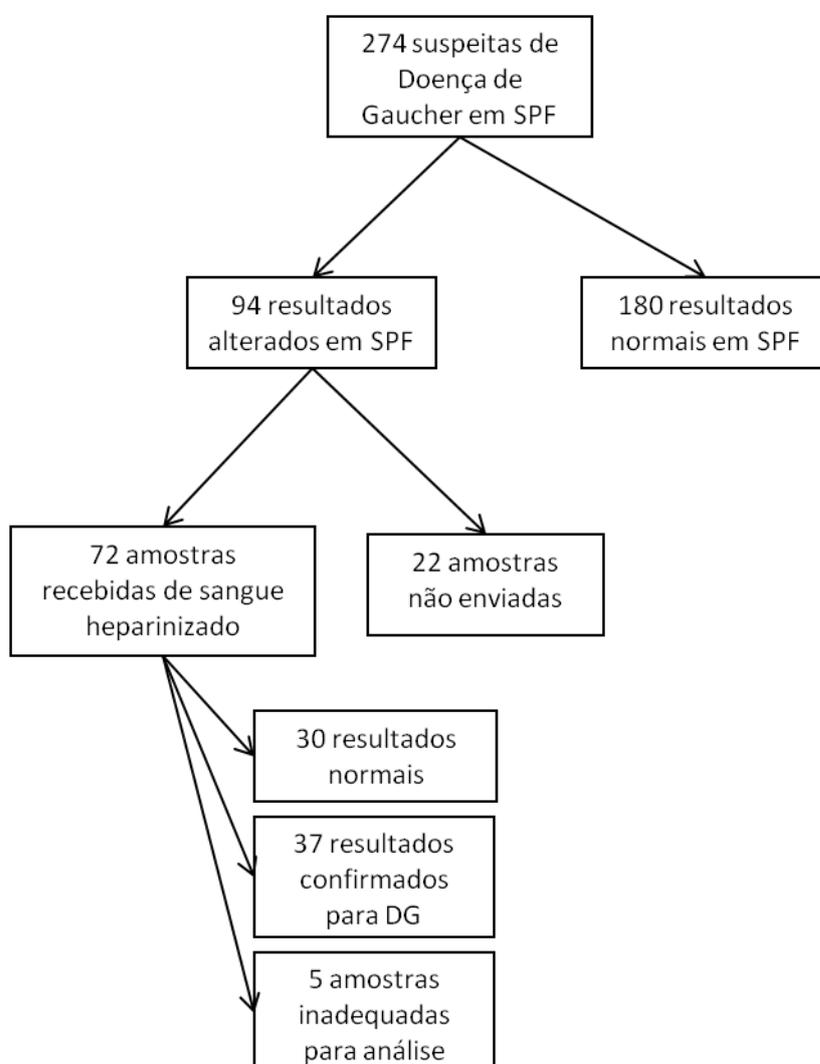


Figura 4. Fluxograma do diagnóstico dos pacientes com doença de Gaucher diagnosticados pelo LEIM-DLD.

Tabela 7. Distribuição regional das amostras enviadas para triagem da DG em população de alto risco no Brasil.

Regiões do Brasil	SPF enviados	Amostras com atividade da GBA baixa e da QT alta em SPF	Resultado positivo para DG em leucócitos e plasma
Nordeste	115	39	15
Sudeste	81	26	12
Norte	38	12	3
Sul	22	9	5
Centro-oeste	18	8	2
<b>TOTAL</b>	<b>274</b>	<b>94 (34,3%)</b>	<b>37 (13,5%)</b>

Foram diagnosticados com DG 16 indivíduos do sexo feminino (43,2%) e 21 do sexo masculino (56,7%). A idade dos pacientes ao diagnóstico variou de seis meses a 64 anos de idade, sendo a maioria dos pacientes diagnosticados com mais de 18 anos (59,5%), seguido por 24,3% diagnosticados dos 2 aos 13 anos de idade.

As alterações clínicas, presentes em alguns dos indivíduos analisados, podem ser observadas na tabela 8. Nem todos os médicos enviaram as alterações clínicas de seus pacientes.

Tabela 8. Sintomas clínicos e achados laboratoriais observados pelos indivíduos com suspeita de DG (n=165).

Sintomas clínicos e achados laboratoriais	%
Hepatoesplenomegalia	41%
Alterações Hematológicas	19%
Alterações Neurológicas	7%
Alterações Hepáticas	4%
Células de Gaucher na Medula Óssea	4%
Alteração Gastrointestinal	3%
Dor Óssea	2%
Hipotonia	2%
Alteração Cardíaca	1%
Alterações Respiratórias	1%
Alterações Esqueléticas	1%
Alteração Renal	1%
Alteração Ocular	1%
Outros	13%

Dos 165 indivíduos cuja manifestação clínica foi relatada (60%), 44 tinham algum caso de DG na família (26,6%) e 12 apresentavam consanguinidade entre os pais (7,2%).

Além das 274 amostras de indivíduos enviadas, foram enviadas 84 amostras de SPF de pacientes em terapia de reposição enzimática para controle do tratamento através da medida da atividade da QT. A idade dos pacientes em tratamento variou de seis meses de idade a 81 anos, sendo que 51% deles eram do sexo masculino. A maioria dos pacientes tratados, 56 pessoas (67%), eram adultos com mais de 18 anos de idade, seguido por dez adolescentes de 14 a 18 anos (12%), nove crianças de 2 a 13 anos (11%) e um

bebe de 6 meses (1%). Oito pessoas não tiveram a sua idade informada (10%). A maioria dos pacientes em tratamento, 57 pacientes (68%), eram da região sudeste, seguido por 30% da região nordeste e 2% da região centro-oeste o Brasil.

Na figura 5, podemos observar a atividade da QT em indivíduos, cuja amostra foi enviada antes e durante o tratamento por reposição enzimática. Como pode ser observado, em todos estes pacientes houve um declínio significativo na atividade da QT,  $p < 0,05$ , em SPF miniaturizada (figura 5A) e em plasma (figura 5B).

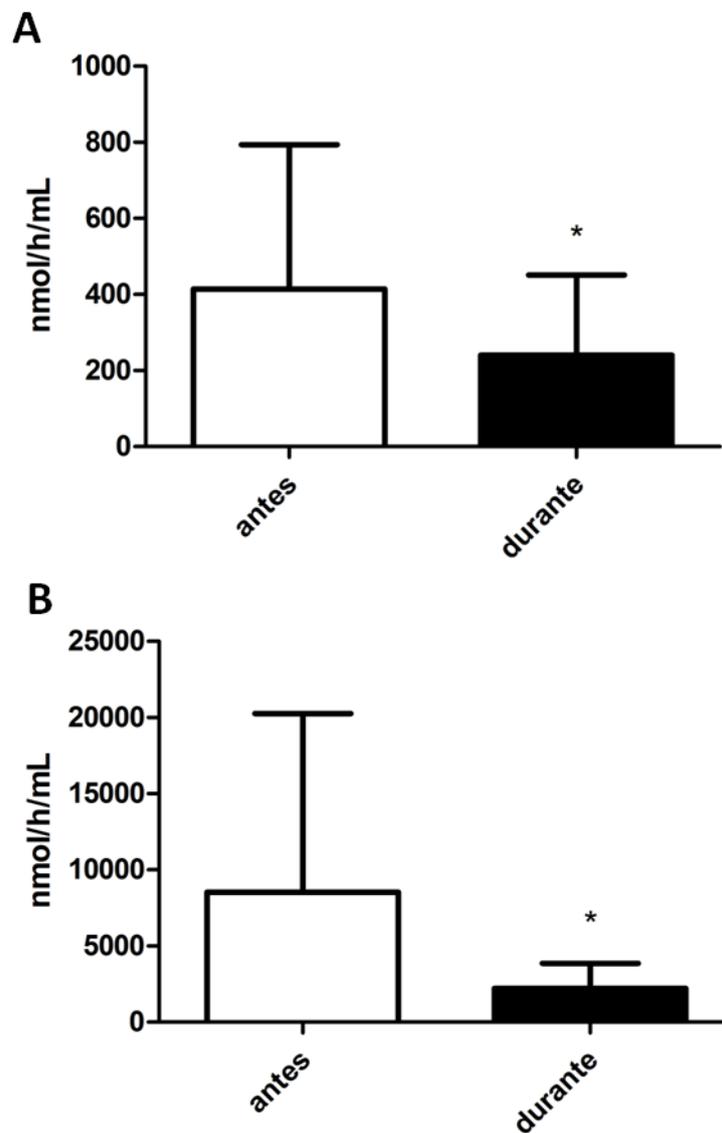


Figura 5. Atividade da QT em indivíduos, cuja amostra foi enviada antes e durante o tratamento por reposição enzimática. Decaimento da atividade significativo nas técnicas em SPF miniaturizado (A) e plasma (B): \* $p < 0,05$ . Média  $\pm$  desvio padrão.

Os resultados apresentados até aqui foram submetidos em forma de um artigo original a revista *Molecular Genetics and Metabolism* (apêndice B).

## **2. Padronização do uso do Tampão Universal em SPF**

### *2.1. Estabelecimento do tempo e temperatura ideal para eluição com o Tampão Universal*

Foram testadas oito alternativas de eluição com TU, sendo estas, duas temperaturas (30 e 37°C) e quatro tempos (10, 20, 30 e 60 minutos) com um n=15 em cada grupo. As atividades totais de GBA e QT foram influenciadas pela temperatura, pois observamos um aumento significativo das atividades totais em ambas as enzimas ( $p < 0,005$  para GBA e  $p < 0,019$  para a QT) à 37°C na maioria dos tempos analisados (figura 6).

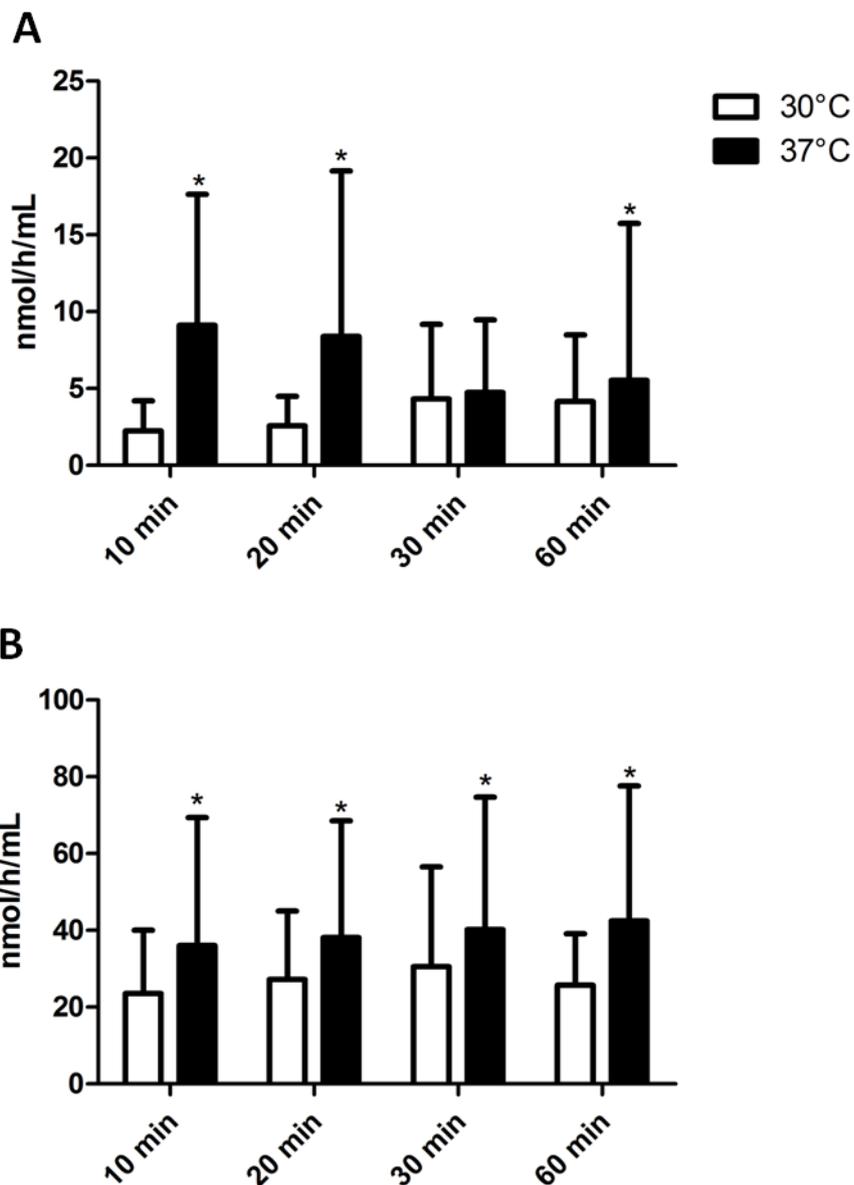


Figura 6. Efeito da temperatura e do tempo de eluição do SPF com o TU sobre a atividade enzimática total da GBA (A) e QT (B). Foram testadas oito alternativas de eluição sendo duas temperaturas (30°C e 37°C) e quatro tempos (10, 20, 30 e 60 minutos) de eluição, n=15. Diferença significativa entre as temperaturas: \* $p=0,005$  para GBA e \* $p=0,019$  para QT por ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni. Média  $\pm$  desvio padrão.

A dosagem de proteínas totais também foi influenciada pela temperatura, pois esta sofreu um aumento significativo à 37°C ( $p<0,0001$ ; figura 7).

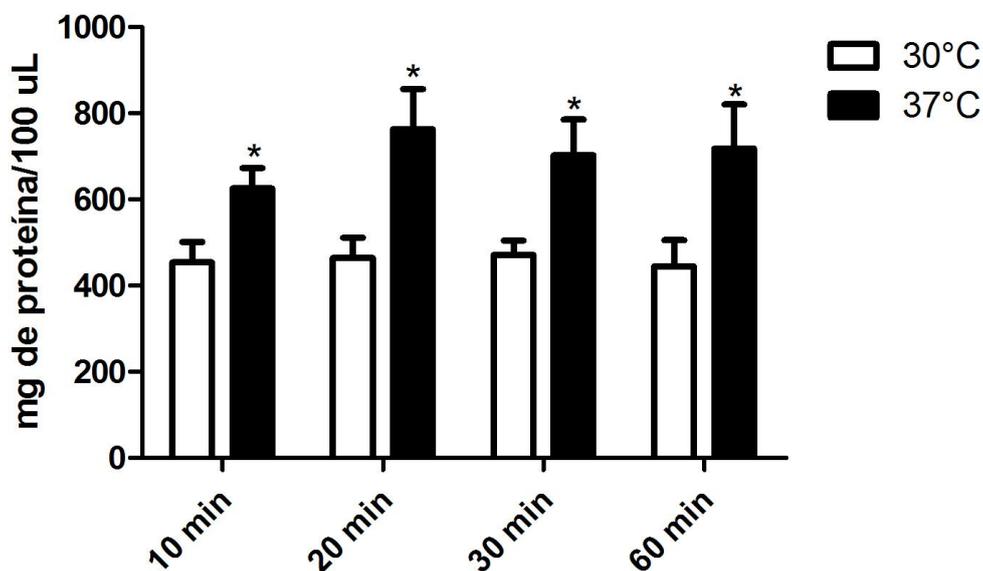


Figura 7. Efeito da temperatura e do tempo de eluição do SPF com o TU sobre a quantificação de proteínas totais. Foram testadas oito alternativas de eluição sendo duas temperaturas (30°C e 37°C) e quatro tempos (10, 20, 30 e 60 minutos) de eluição, n=15. Diferença significativa entre as temperaturas: \* $p < 0,0001$  por ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni. Média  $\pm$  desvio padrão.

Nosso próximo passo foi corrigir as atividades enzimáticas pela quantidade de proteína da amostra. Mesmo após a correção das atividades enzimáticas pela quantidade de proteínas totais (figura 8), a influência da temperatura permaneceu significativa ( $p=0,0005$  para GBA e  $p < 0,0001$  para QT). As atividades das duas enzimas eram significativamente maiores a 37°C. Não houve diferença significativa entre os tempos de incubação ( $p=0,70$  para GBA e  $p=0,93$  para QT). Deste modo a temperatura ideal de eluição foi estabelecida em 37°C, por ser aquela que apresentava a atividade mais alta e

o tempo de incubação, 10 minutos, por ser o mais curto, já que não há diferença nas atividades entre os demais tempos.

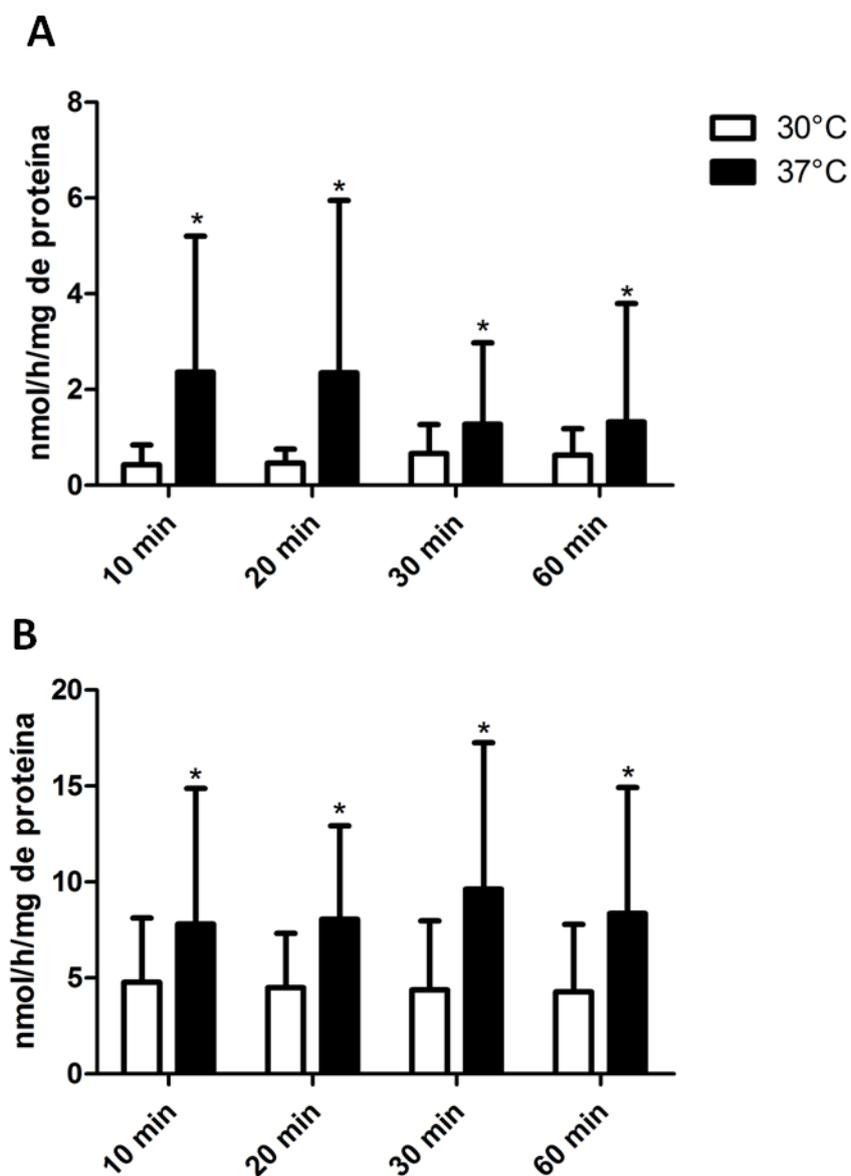


Figura 8. Efeito da temperatura e do tempo de eluição do SPF com o TU sobre a atividade enzimática específica da GBA (A) e QT (B). Foram testadas oito alternativas de eluição sendo duas temperaturas (30°C e 37°C) e quatro tempos (10, 20, 30 e 60 minutos) de eluição, n=15. Diferença significativa entre as temperaturas: \*p=0,0005 para GBA e \*p<0,0001 para QT por ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni. Média  $\pm$  desvio padrão.

### ***3. Comparação entre a atividade enzimática de indivíduos saudáveis (CS) e pacientes com Doença de Gaucher sem (G) e com tratamento (TG) e heterozigotos obrigatórios (HT)***

Foram feitas comparações entre os grupos testados, a fim de observar se era possível diferencia-los utilizando a técnica aqui proposta que utiliza SPF eluido com TU. Os grupos comparados foram: indivíduos saudáveis (CS) e pacientes com Doença de Gaucher sem (G) e com tratamento (TG) e heterozigotos obrigatórios (HT). Foram comparados os grupos através da atividade enzimática total e específica para as enzimas: beta-glicosidade (GBA) e quitotriosidase (QT).

#### ***3.1. Atividade da enzima beta-glicosidase em SPF eluido com TU***

##### ***3.1.1 Atividade total***

Foi possível medir a atividade enzimática total da GBA em todos os grupos e, por ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni, diferenciar significativamente ( $p < 0,0001$ ): controles saudáveis (CS) de G e, HT de G (figura 9 e tabela 9).

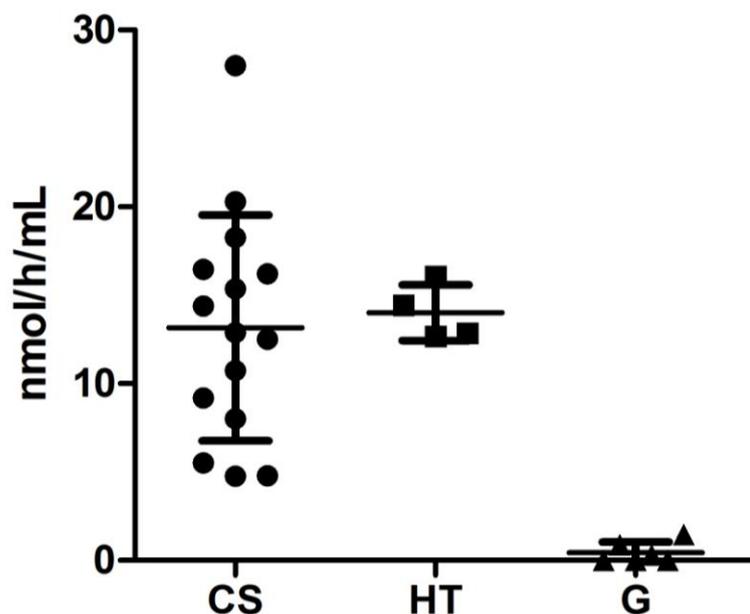


Figura 9. Atividade total da GBA em SPF com incubação de eluição de 10 minutos a 37°C. Diferença significativa entre os grupos por ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni: CS e G e, HT e G ( $p < 0,0001$ ). Média (linhas maiores)  $\pm$  desvio padrão (linhas menores). CS: controles saudáveis,  $n=15$ ; HT: heterozigotos obrigatórios,  $n=4$ ; G: pacientes com Doença de Gaucher,  $n=9$ .

Tabela 9. Atividade total da GBA em SPF com incubação de eluição de 10 minutos a 37°C.

	CS	HT	G
Mínimo	4,77	12,68	0,00
Máximo	27,99	16,07	1,46
Media	13,16*	14,02*	0,44
Mediana	12,88	13,66	0,16
Desvio padrão	6,39	1,58	0,60

Resultados expressos em nmo/h/mL. Diferença significativa entre: G e CS,  $*p < 0,001$  por ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni. CS: controles saudáveis,  $n=15$ ; HT: heterozigotos obrigatórios,  $n=4$ ; G: pacientes com Doença de Gaucher,  $n=9$ .

### 3.1.2. Atividade específica por proteínas totais

A atividade média da GBA em SPF, após correção pelas proteínas totais, em todos os grupos analisados pode ser verificada na tabela 10.

Tabela 10. Atividade específica da GBA em SPF.

	CS	HT	G
Mínimo	0,94	2,24	0,00
Máximo	9,29	4,61	0,43
Media	3,43**	3,06*	0,10
Mediana	2,69	2,70	0,00
Desvio padrão	2,34	1,09	0,17

Resultados expressos em nmol/h/mg de proteína. Diferença significativa entre: G e HT (\* $p < 0,05$ ) e, G e CS (\*\* $p < 0,001$ ) por ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni. CS: controles saudáveis, n=15; HT: heterozigotos obrigatórios, n=4; G: pacientes com Doença de Gaucher, n=9.

Foi feita ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni e foi possível diferenciar CS de G ( $p < 0,001$ ) e HT de G ( $p < 0,05$ ). Além disso, foi estabelecido o ponto de corte (100% de sensibilidade e especificidade) de 0,68 nmol/h/mg de proteína (figura 10).

Não houve sobreposição de atividades (figura 10) entre o grupo dos controles saudáveis (CS) e o grupo G, demonstrando que é possível diferenciá-los com segurança, sendo a atividade mínima para CS de 0,94 nmol/h/mg de proteína e a máxima encontrada nos pacientes diagnosticados para Gaucher de 0,43 nmol/h/mg de proteína. Além disso, foi possível diferenciar o grupo HT de pacientes com Gaucher (G).

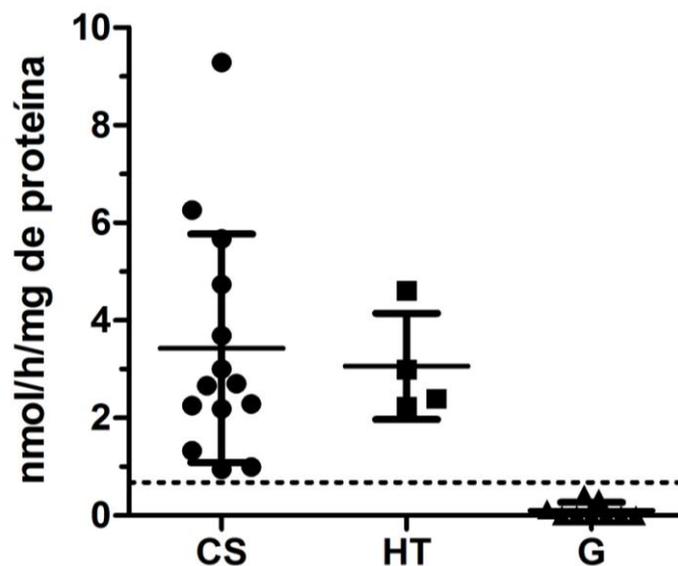


Figura 10. Atividade específica da GBA. Diferença significativa entre os grupos por ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni: CS e G ( $p < 0,001$ ) e, HT e G ( $p < 0,05$ ). Linha pontilhada indica o ponto de corte estabelecido de 0,68 nmol/h/mg de proteína. Média (linhas maiores)  $\pm$  desvio padrão (linhas menores). CS: controles saudáveis,  $n=15$ ; HT: heterozigotos obrigatórios,  $n=4$ ; G: pacientes com Doença de Gaucher,  $n=9$ .

### 3.2. Atividade da enzima Quitotriosidase em SPF com TU

#### 3.2.1. Atividade total

Foi possível medir a atividade da QT em todos os grupos citados no item anterior, bem como naqueles pacientes em tratamento por reposição enzimática (TG).

As maiores médias das atividades da QT foram observadas no grupo G (1141,61 nmol/h/mg de proteína), seguido do grupo TG (400,67 nmol/h/mg de proteína). Os grupos CS e HT tiveram valores bastante inferiores aos afetados com DG, sendo 36,07 e 28,25 nmol/h/mg de proteína, respectivamente (tabela 11).

Tabela 11. Atividade total da QT em SPF com incubação de eluição de 10 minutos a 37°C.

	CS	HT	G	TG
Mínimo	3,10	10,00	156,60	42,00
Máximo	107,40	39,00	3580,30	1172,00
Media	36,07	28,25*	1141,61**	400,67**
Mediana	23,50	32,00	791,90	205,00
Desvio padrão	33,33	13,02	1045,27	363,55

Resultados expressos em nmol/h/mL. Diferença significativa entre: HT e G (\* $p < 0,01$ ), CS e G, e CS e TG (\*\* $p < 0,0001$ ) comparado por ANOVA de uma via para o teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de comparações múltiplas de Dunn. CS: controles saudáveis,  $n=15$ ; HT: heterozigotos obrigatórios,  $n=4$ ; G: pacientes com Doença de Gaucher,  $n=9$ ; TG: pacientes com Doença de Gaucher em tratamento,  $n=15$ .

Pela análise estatística utilizada, por ANOVA de uma via para o teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de comparações múltiplas de Dunn foi possível

diferenciar (figura 11): CS de G ( $p < 0,0001$ ), CS de TG ( $p < 0,0001$ ), e HT de G ( $p < 0,01$ ).

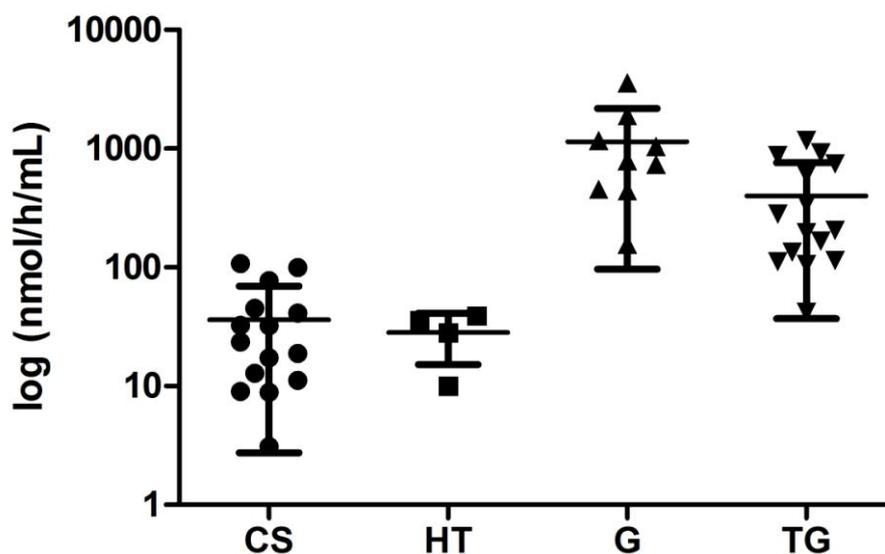


Figura 11. Atividade total da QT em SPF com incubação de eluição de 10 minutos a 37°C. Foi possível diferenciar significativamente os grupos CS de G ( $p < 0,0001$ ), CS de TG ( $p < 0,0001$ ), e HT de G ( $p < 0,01$ ). Média (linhas maiores)  $\pm$  desvio padrão (linhas menores). CS: controles saudáveis,  $n=15$ ; HT: heterozigotos obrigatórios,  $n=4$ ; G: pacientes com Doença de Gaucher,  $n=9$ ; TG: pacientes com Doença de Gaucher em tratamento,  $n=15$ .

### 3.2.2. Atividade específica por proteínas totais

De acordo com a tabela 12 podemos observar que a correção da atividade da QT pelas proteínas totais levou aos mesmos resultados encontrados no item anterior, ou seja, houve uma maior atividade enzimática no grupo G, seguida pelo grupo TG, CS e HT.

Tabela 12. Atividade específica da QT em SPF.

	CS	HT	G	TG
Mínimo	0,50	2,11	46,26	7,90
Máximo	22,54	10,37	639,98	218,43
Media	7,81	6,20**	283,66***	78,98*
Mediana	5,36	6,16	226,01	43,19
Desvio padrão	7,07	3,50	176,58	71,16

Resultados expressos em nmo/h/mg de proteína. Diferença significativa entre: CS e TG (\* $p < 0,01$ ), CS e G (\*\* $p < 0,001$ ), e G e HT (\*\* $p < 0,01$ ) comparado por ANOVA de uma via para o teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de comparações múltiplas de Dunn. CS: controles saudáveis,  $n=15$ ; HT: heterozigotos obrigatórios,  $n=4$ ; G: pacientes com Doença de Gaucher,  $n=9$ ; TG: pacientes com Doença de Gaucher em tratamento,  $n=15$ .

Também foi possível diferenciar (figura 12) o grupo CS do grupo G ( $p < 0,001$ ), CS do TG e HT do G ( $p < 0,01$ ). Além disso foi estabelecido o ponto de corte (100% de sensibilidade e especificidade) de 34,4 nmol/h/mg de proteína.

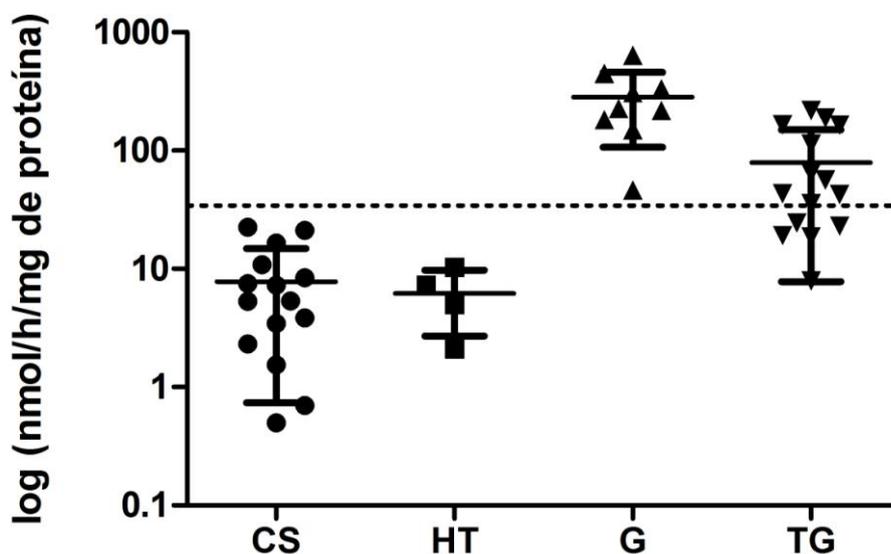


Figura 12. Diferenciação em SPF da atividade específica da QT. Diferença significativa entre os grupos: CS e G ( $p < 0,001$ ), CS e TG, e HT e G ( $p < 0,01$ ). Linha pontilhada indica o ponto de corte estabelecido de 34,4 nmol/h/mg de proteína. Média (linhas maiores)  $\pm$  desvio padrão (linhas menores). CS: controles saudáveis,  $n=15$ ; HT: heterozigotos obrigatórios,  $n=4$ ; G: pacientes com Doença de Gaucher,  $n=9$ ; TG: pacientes com Doença de Gaucher em tratamento,  $n=15$ .

### 3.3. Correlação entre as técnicas padrão ouro e a atividade específica em SPF com TU

Todos os indivíduos testados para a nova técnica de SPF eluido com TU foram testado previamente utilizando as técnicas padrão ouro miniaturizada, ou seja, QT em plasma e GBA em leucócitos, a fim de evitar resultados falsos. Os resultados obtidos nas técnicas padrão ouro foram correlacionados com a atividade específica em SPF eluido com TU corrigido por proteínas totais.

Não foi obtida correlação através da medida da GBA quando as técnicas foram comparadas utilizando amostras de HT ( $r = 0,05$ ) e CS ( $r = -0,54$ ). Entretanto, com as amostras de CS sim, sendo  $r = 0,70$  (tabela 13). Quando comparadas através da medida da QT foi observada correlação positiva em todos os grupos: HT ( $r = 0,70$ ), CS ( $r = 0,71$ ) e G ( $r = 0,90$ ).

As análises de correlação não foram feitas para os pacientes em tratamento (TG), pois não havia leucócitos e plasma disponíveis para a análise.

Tabela 13. Correlação entre a técnica padrão ouro miniaturizada, leucócitos para GBA e plasma para QT, e a atividade específica em SPF eluido com TU.

<i>Enzimas</i>	Grupos		
	CS	HT	G
QT	0,71	0,80	0,90
GBA	-0,54	0,05	0,70

CS: controles saudáveis, n=15; HT: heterozigotos obrigatórios, n=4; G: pacientes com Doença de Gaucher, n=9. Valores indicam r de Spearman para QT e r de Pearson para GBA.

#### **4. Validação das técnicas**

##### *4.1. Coeficiente de variação intra-ensaio*

Foi estabelecido o coeficiente de variação intra-ensaio através de dois experimentos: comparação entre alíquotas do mesmo picote e entre picotes diferentes na mesma reação enzimática.

No primeiro, foram feitas alíquotas da mesma eluição do SPF com TU do mesmo picote de 3 mm. Foram utilizadas oito amostras de pacientes com DG. As reações foram feitas utilizando os mesmos reagentes. Não houve diferença significativa tanto para a medida de GBA ( $p=0,55$ ) quanto da QT ( $p=0,76$ ) no estabelecimento da atividade específica em SPF (figura 13). E o pareamento foi significativo para GBA ( $r=0,90$  e  $p<0,001$ ) e QT ( $r=0,99$  e  $p<0,0001$ ). O coeficiente de variação calculado para a GBA foi de 13% e para a QT foi de 8%.

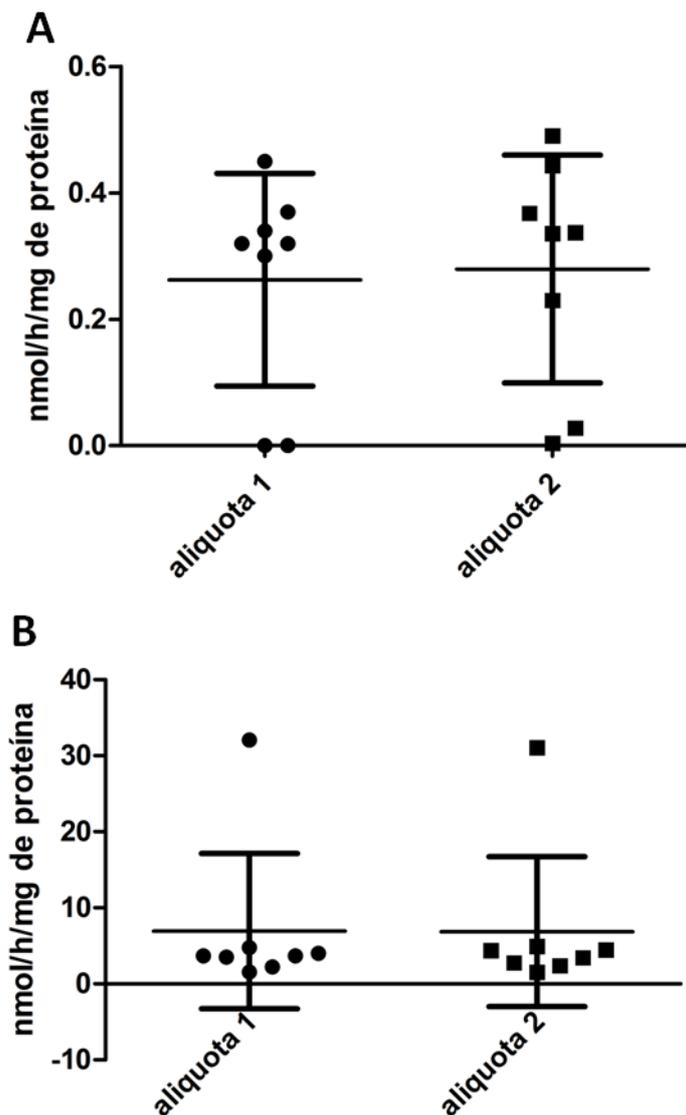


Figura 13. Atividade da GBA (A) e da QT (B) em duas alíquotas da mesma eluição da amostra (SPF) com TU. Foram utilizadas oito amostras para o estabelecimento do coeficiente de variação intraensaio. Pareamento significativo, teste *t*, para ambas enzimas:  $r > 0,90$ . Média (linhas maiores)  $\pm$  desvio padrão (linhas menores).

Já no segundo experimento foram medidos três picotes de 3 mm da mesma amostra eluídos separadamente com TU de oito amostras. Para as reações enzimáticas foram utilizados os mesmos reagentes. Não houve diferença significativa tanto para a medida de GBA ( $p=0,56$ ) quanto da QT ( $p=0,07$ ) no estabelecimento da atividade específica em SPF (figura 14). O

pareamento foi significativo para GBA ( $r=0,82$  e  $p<0,0002$ ) e QT ( $r=0,94$  e  $p<0,0001$ ). O coeficiente de variação calculado para a GBA foi de 18% e para a QT foi de 16%.

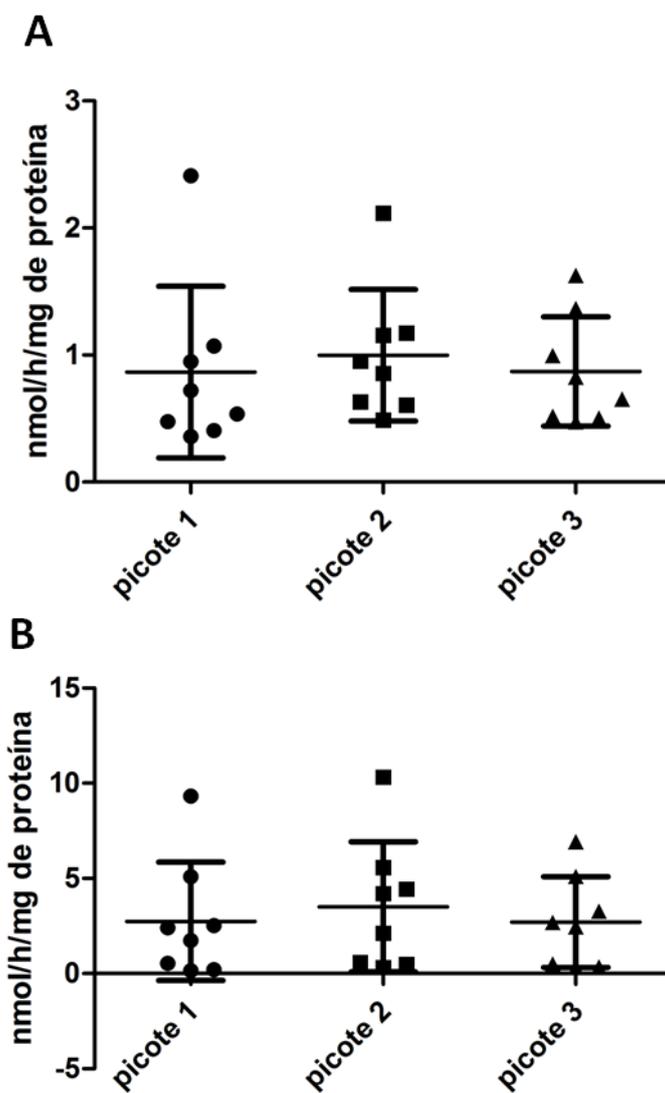


Figura 14. Atividade da GBA (A) e da QT (B) em três picotes da mesma amostra (SPF) eluídos com TU. Foram utilizadas oito amostras diferentes para o estabelecimento do coeficiente de variação intra-ensaio. Pareamento significativo para ambas enzimas:  $r>0,80$ . Média (linhas maiores)  $\pm$  desvio padrão (linhas menores).

#### *4.2. Coeficiente de variação interensaio*

Foi estabelecido o coeficiente de variação interensaio através da medida da atividade enzimática em três reações enzimáticas diferentes de oito amostras. Não houve diferença significativa tanto para a medida de GBA ( $p=0,21$ ) quanto da QT ( $p=0,90$ ) no estabelecimento da atividade específica em SPF (figura 15). O coeficiente de variação calculado para a GBA foi de 27% e para a QT foi de 15%.

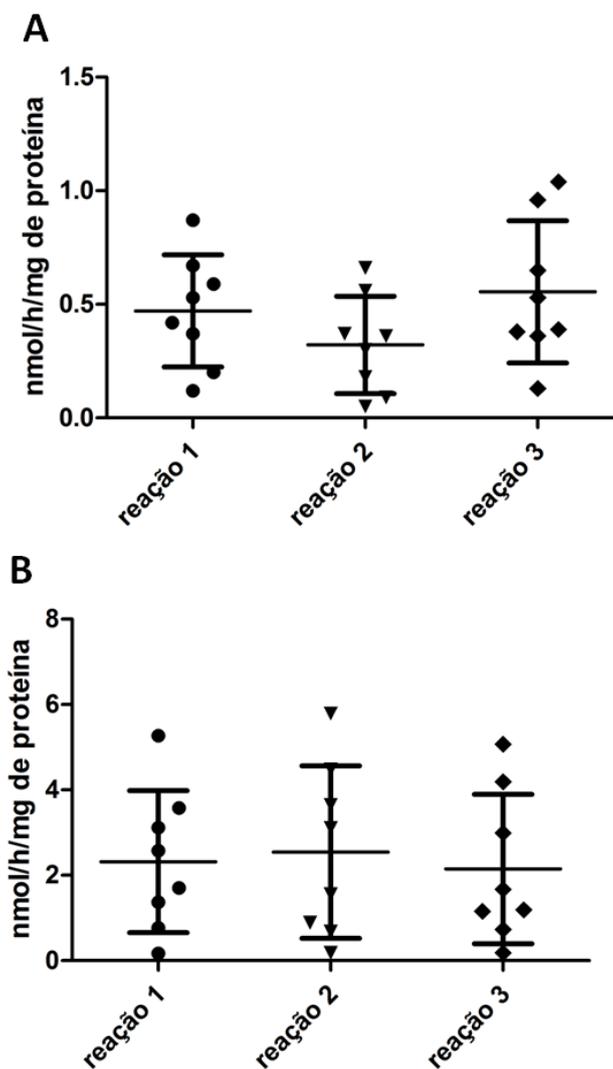


Figura 15. Atividade da GBA (A) e da QT (B) em 3 reações enzimáticas diferentes da mesma amostra (SPF) eluída com TU. Foram utilizadas oito amostras diferentes para o estabelecimento do coeficiente de variação intrerensaio. Média (linhas maiores)  $\pm$  desvio padrão (linhas menores).

#### *4.3. Coeficiente de variação interpessoal*

Foi estabelecido o coeficiente de variação interpessoal através da repetição de oito amostras em triplicata por duas pessoas, onde foram utilizados os mesmos reagentes, mas em reações separadas. Não houve diferença significativa tanto para a medida de GBA ( $p=0,49$ ) quanto da QT ( $p=0,55$ ) no estabelecimento da atividade específica em SPF (figura 16). O pareamento foi significativo somente para a QT ( $r=0,84$  e  $p<0,004$ ). O coeficiente de variação calculado para a GBA foi de 35% e para a QT foi de 17%.

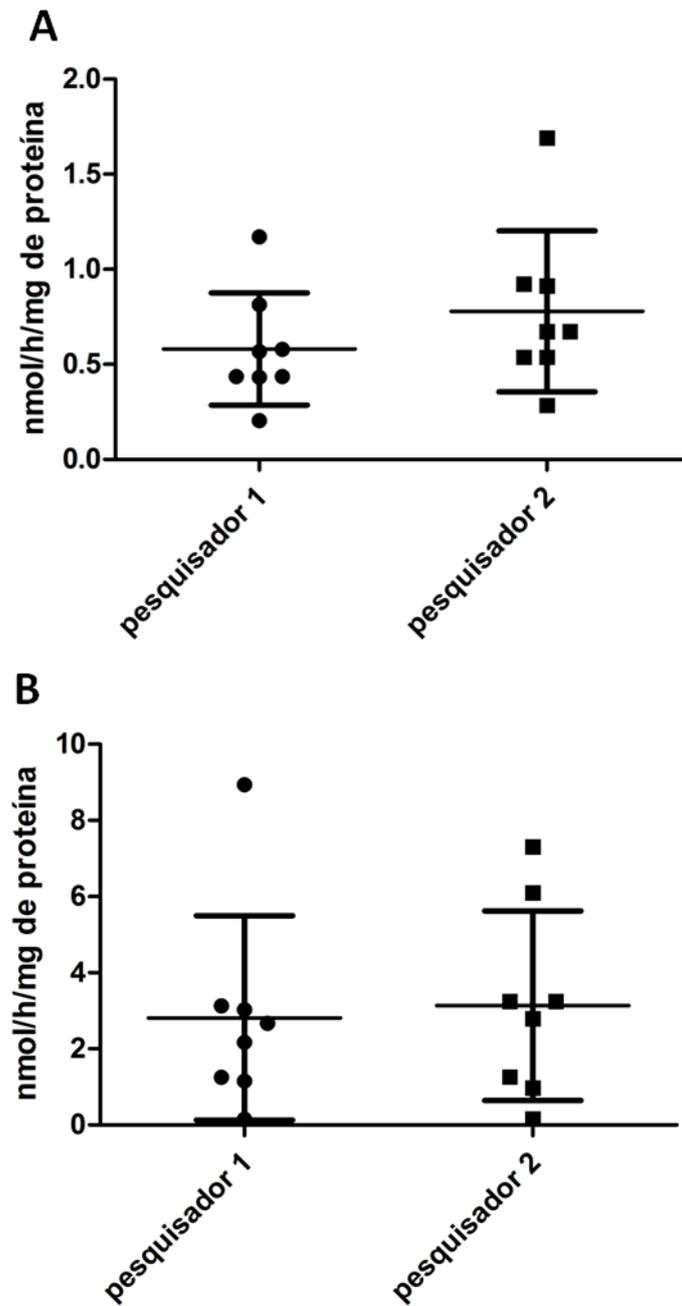


Figura 16. Atividade da GBA (A) e da QT (B) nas mesmas amostras (SPF) eluídas com TU, realizada por dois profissionais diferentes. Foram utilizadas oito amostras diferentes para o estabelecimento do coeficiente de variação interpessoal. Pareamento significativo, teste *t*, somente para a QT:  $r=0,84$ . Média (linhas maiores)  $\pm$  desvio padrão (linhas menores).

#### *4.4.Local do picote*

Foi observado que não há diferença significativa na atividade enzimática de ambas as enzimas ( $p=0,82$  para GBA e  $p=0,59$  para QT) quando foi comparada a medida a atividade enzimática específica de um picote feito no centro da gota de sangue do SPF com picote feito na periferia (figura 17). Também foi observada uma correlação significativa de 0,85 para GBA ( $p<0,003$ ) e 0,99 para QT ( $p<0,0001$ ). O coeficiente de variação entre os dois grupos foi de 11% para GBA e 18% para QT.

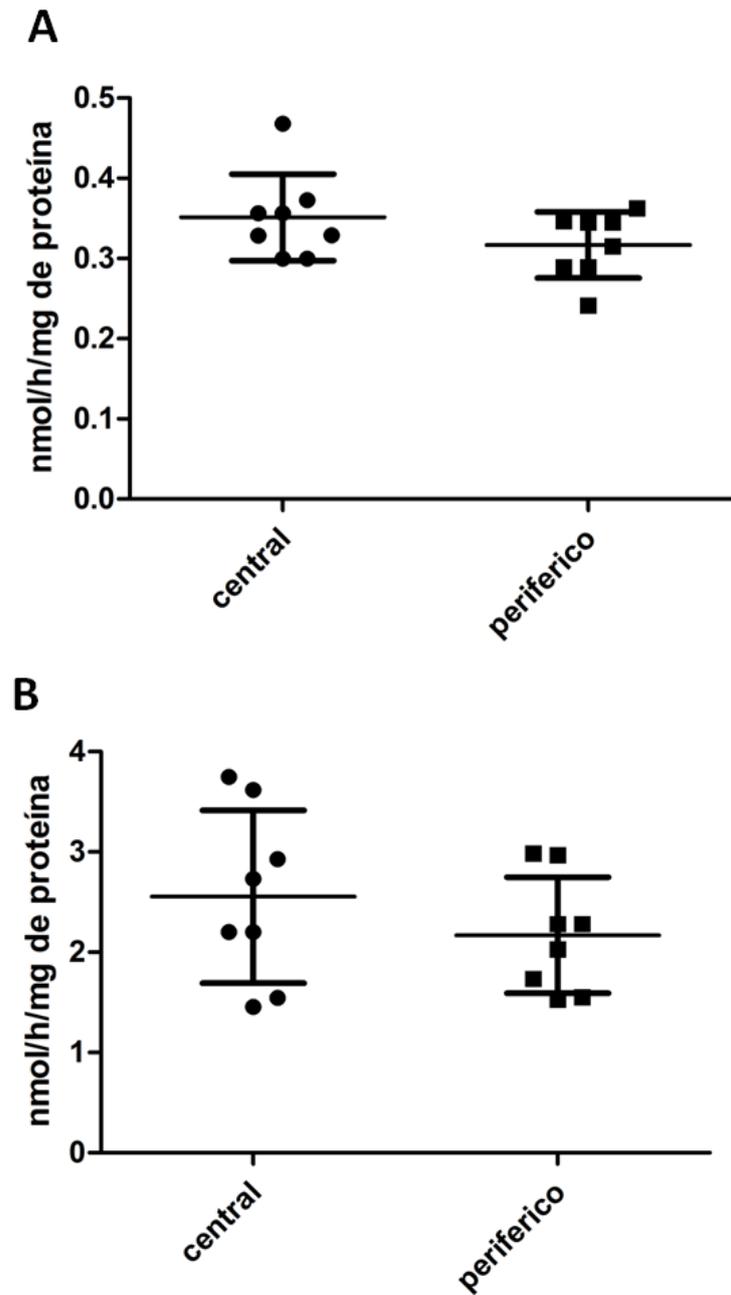


Figura 17. Atividade da GBA (A) e QT (B) em dois locais diferentes do picote da mesma amostra de SPF, central ou periférico. Foram utilizadas oito amostras diferentes. Média (linhas maiores)  $\pm$  desvio padrão (linhas menores).

#### *4.5. Estabilidade enzimática a 4°C*

Foram armazenadas oito amostras durante 21 dias após a coleta. As amostras foram armazenadas em sacos plásticos individuais com dissecante a 4°C. A atividade da GBA e da QT foi medida à 7, 14 e 21 dias após a coleta do sangue. Foi observada correlação significativa para GBA ( $r=0,79$  e  $p<0,0001$ ) e para a QT ( $r=0,89$  e  $p<0,0001$ ). Foi observado um decaimento na atividade da GBA significativo após 14 dias de coleta. Neste tempo, a atividade reduziu a 77,7% daquela inicial (7 dias). Após 21 dias de coleta, a atividade da GBA das amostras chegaram a 54,6% da atividade inicial ( $p<0,001$ ; figura 18A). Não foi observado decaimento significativo na atividade da QT (figura 18B).

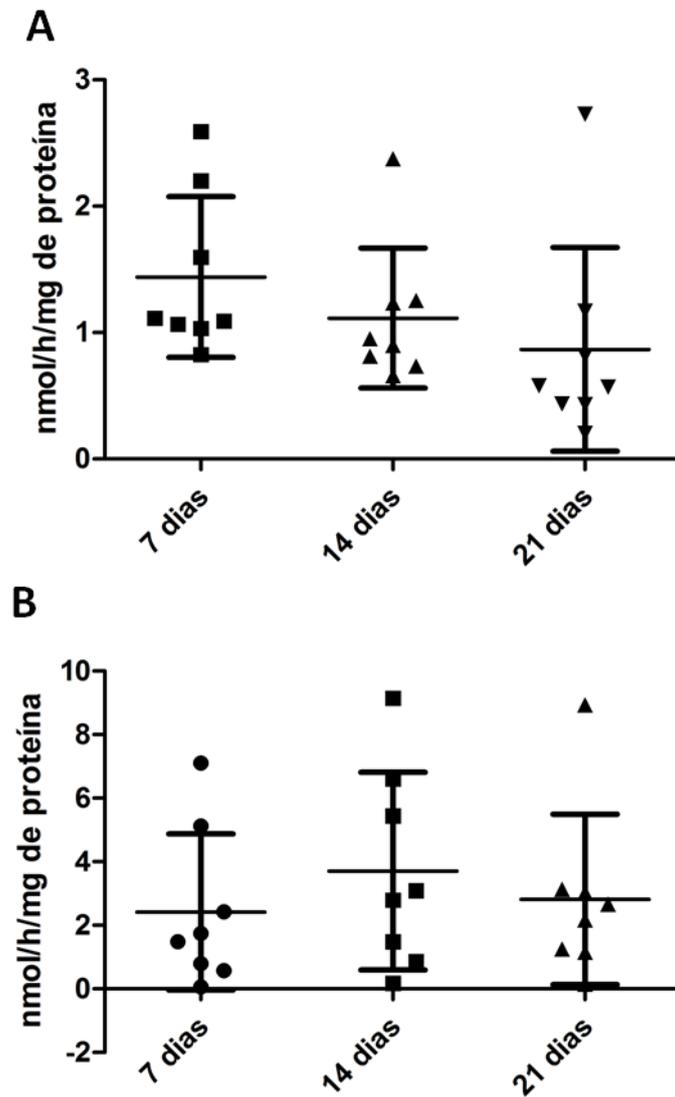


Figura 18. Atividade da GBA (A) e QT (B) após 21 dias de coleta da amostra (SPF). Foram analisadas 8 amostras armazenadas a 4°C. Decaimento significativo para a GBA:  $p < 0,001$ . Média (linhas maiores)  $\pm$  desvio padrão (linhas menores).

## **Parte III**

### **Discussão**

O diagnóstico para a doença de Gaucher é realizado através da medida da atividade da enzima beta-glicosidase (GBA) em leucócitos e auxiliado pela medida da enzima quitotriosidase (QT) em plasma. Trabalhos mais recentes utilizam o sangue impregnado em papel filtro (SPF) como técnica de triagem, reduzindo os custos para se chegar a um diagnóstico definitivo [Chaves et al., 2011; de Castilhos et al., 2011a; Müller et al., 2010; Rodrigues et al., 2009; Civallero et al., 2006; Lukacs et al., 2011].

Neste trabalho, propomos uma nova forma de diagnóstico da Doença de Gaucher utilizando o estabelecimento da atividade enzimática específica em SPF previamente diluído com Tampão Universal (TU) para a medida das enzimas GBA e QT. Além disso, foram miniaturizadas as técnicas de diagnóstico padrão ouro, GBA em leucócitos e QT em plasma, e de triagem em SPF com picote de 1,2 mm, com o propósito de serem realizadas em placas de 96 poços. A beta-galactosidase (GLB) também teve a sua técnica em leucócitos miniaturizada, já que é utilizada para avaliar a qualidade da amostra.

#### ***Miniaturização das técnicas padrão ouro e de triagem para Doença de Gaucher***

As miniaturizações das técnicas em leucócitos e SPF se mostraram eficientes e válidas. Deste modo foi possível reduzir as reações enzimáticas em SPF a 37,5% do volume original e também diminuir o tamanho do picote de 3

mm para 1,2 mm podendo assim serem efetuados mais picotes por gota de sangue seco. As reações em leucócitos também se mostraram satisfatórias. A GBA foi reduzida a 25% do volume original e a GLB a 10%, sendo uma redução em reagentes e volume de amostra considerável. Assim, o diagnóstico para a DG se tornou mais barato e o volume de amostra reduzido. A miniaturização de técnicas para medida da atividade de enzimas chaves no diagnóstico de DLDs já tinha sido estabelecida por nosso grupo, embora para outras enzimas. Em de Castilhos *et al* [2011] foi realizada a redução das técnicas de SPF de 3 mm para 1,2 mm para as enzimas alfa-galactosidase A, alfa-glicosidase e arilsulfatase B. Esta miniaturização mostrou ser eficiente, com correlação de 0,90. O mesmo foi observado no presente trabalho.

Os valores de referência estabelecidos para as técnicas miniaturizadas foram diferentes dos estabelecidos para as técnicas com volume maior. O ponto de corte para GBA em SPF foi mais alto (2,77 nmol/h/mL) do que o encontrado em outras triagens de populações de alto risco: 1,78 nmol/h/mL [Civallero *et al.*, 2006] e 2,19 nmol/h/mL [Chaves *et al.*, 2011]. Em leucócitos o ponto de corte para GBA também foi mais alto (6,52 nmol/h/mg de proteína) que o estabelecido por outros grupos: 4,1 nmol/h/mg protein [Chaves *et al.*, 2011] e 5,9 nmol/h/mg de proteína [Michelin *et al.*, 2005].

Já o ponto de corte estabelecido para QT oscila bastante entre os estudos de triagem em SPF, variando de 86,59 nmol/h/mL em Civallero *et al* 2006 a 16,95 nmol/h/mL em Rodrigues *et al* 2009. No presente trabalho obtivemos valores intermediários a esses estudos (46,10 nmol/h/mL). Já em plasma o nosso ponto de corte estabelecido para a atividade desta enzima foi

de 190 nmo/h/mL, maior do que o estabelecido por Michelin et al (2005) que foi de 132 nmol/h/mL.

A miniaturização da técnica de medida da atividade de GLB em leucócitos, com a determinação de novos valores de referência e ponto de corte (70 nmol/h/mg de proteína) foi muito importante, já que essa enzima é amplamente utilizada como forma de controle da estabilidade da amostra [Reuser et al., 2011; Gasparotto et al., 2009]. As diferenças entre todos estes resultados reforçam a necessidade do estabelecimento de valores de referência específicos para cada laboratório.

A diminuição do volume de amostras e do volume de reação representa uma diminuição de custos para o diagnóstico da DG. Aliado a isso, a realização das técnicas em placa de 96 poços e a leitura das mesmas em equipamento com leitor de placa se mostraram eficientes gerando uma menor manipulação das amostras, o que torna o resultado mais seguro.

### ***Triagem de população alto-risco***

Para este estudo, contamos com a colaboração de vários médicos dos mais diversos locais do Brasil. Todos eles colheram material (SPF ou sangue em heparina, conforme solicitado) de seus pacientes e os enviaram por correio (SPF) ou por uma empresa especializada no transporte de material refrigerado. No total, foram amostras de 274 indivíduos com suspeita de DG.

Do total de amostras enviadas em SPF, 34,3% apresentaram atividade da GBA diminuída e da QT aumentada na análise em papel filtro com técnica miniaturizada. Depois, os médicos responsáveis por estes indivíduos foram contatados e recebemos 76,6% de recoletas para a confirmação em leucócitos

e plasma. Destas 6,9% estavam inadequadas, de acordo com a atividade da GLB, e foram descartadas. Foi possível utilizar 93% delas. Destas amostras que recebemos para a confirmação do diagnóstico, 55,2% foram diagnosticadas para doença de Gaucher. Estes resultados foram bastante altos, demonstrando que a forma de diagnóstico com as técnicas miniaturizadas é satisfatória. Não recebemos, para a confirmação em leucócitos e plasma, 24 amostras. De acordo com a porcentagem de resultados positivos, provavelmente 13 suspeitas seriam confirmadas, reforçando a necessidade de solicitar aos médicos que enviem as recoletas.

Nesse estudo foram obtidos 13,5%, em relação às 274 amostras iniciais em SPF, de resultados positivos para DG. Em Chaves et al [2011] foi feito um estudo de triagem da DG na população de Tabuleiro do Norte, cidade do estado do Ceará/Brasil, onde há uma maior prevalência de DG. Nesse trabalho foram diagnosticados para DG 2,3% das pessoas testadas, sendo que foram excluídas as famílias com pacientes já diagnosticados. Outro trabalho focado em DG é o de Michelin et al [2005] onde foi proposto um protocolo de identificação de pacientes para DG. Este estudo mostra os resultados obtidos em 11 anos de diagnóstico para DG em um centro de referência para o diagnóstico desta doença no Brasil. Nesse trabalho foram encontrados 412 pacientes para DG em 2710 indivíduos, representando 15,2% de resultados positivos, que foram triados diretamente em leucócitos e plasma. Nossos resultados estão de acordo com os resultados de Michelin et al [2005].

O fato de termos diagnosticado, com nosso protocolo, baseado em uma técnica miniaturizada para medida da atividade da GBA e da QT em SPF, uma porcentagem de pacientes semelhante aquela encontrada por Michelin et al.

[2005], que utilizava as técnicas em leucócitos e plasma, nos indica que o protocolo seguido em nosso trabalho atingiu os objetivos esperados. A triagem em SPF e a posterior confirmação em leucócitos e plasma se mostrou eficiente com 55,2% de confirmação do diagnóstico. O diagnóstico de 37 pacientes em 1,5 anos de triagem representa um número bastante elevado.

Além de amostras de SPF de indivíduos para o diagnóstico da DG, nós também recebemos, durante o período desta dissertação, amostras de SPF de indivíduos já diagnosticados que haviam iniciado o tratamento para DG. Recebemos 84 amostras de pacientes em tratamento e foi observada uma redução significativa da atividade da QT,  $p < 0,05$  após o tratamento, tanto em amostras de plasma quanto de SPF miniaturizada. Assim ambas as técnicas mostraram-se eficientes como forma de acompanhamento do tratamento através da medida da atividade da QT.

Grande parte dos diagnósticos de DG (32,4%) foi de indivíduos da região sudeste do Brasil. De acordo com o último Censo Brasileiro a região sudeste é a região mais populosa, com 41% da população brasileira [IBGE, 2010]. Além disso, nessa região se encontram centros de referência para diagnóstico clínico para a Doença de Gaucher. A segunda região com o maior número de pacientes diagnosticados (40,5%) foi a região nordeste. Isso provavelmente se deve a estudos recentes que detectaram uma maior prevalência da DG no estado do Ceará, especificamente na cidade de Tabuleiro do Norte [Chaves et al., 2011] e também por ser a segunda região mais populosa do Brasil [IBGE, 2010].

***Estabelecimento e validação da atividade específica de hidrolases lisossômicas em sangue impregnado em papel filtro***

Após atingido o objetivo da miniaturização das técnicas de SPF, partimos para o estabelecimento da atividade específica em SPF utilizando a quantificação de proteínas totais como forma de controle do volume de sangue impregnado. A partir de um picote de 3 mm foi feita uma eluição de 40  $\mu\text{L}$  com TU e testada duas temperaturas diferentes (30 e 37°C) em quatro tempos (10, 20, 30 e 60 minutos) de incubação para eluição do picote no tampão. Após a eluição foram retiradas três alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  para a medida das atividades enzimáticas, GBA e QT, utilizando as técnicas de SPF miniaturizadas e quantificação de proteínas totais. Houve aumento significativo das atividades enzimáticas e da quantidade das proteínas totais, com o aumento da temperatura. Porém não houve diferença entre os tempos de incubação. Deste modo, a incubação a 37°C por 10 min se mostrou satisfatória.

Esta técnica foi adaptada de uma técnica de espectrofotometria de massa [Li et al., 2004], onde um picote de 5 mm é incubado a 37°C por 1h com 80  $\mu\text{L}$  de TU. Após a incubação são feitas alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  para a medida da atividade de cinco hidrolases lisossômicas para triagem neonatal de DLD. Na adaptação que fizemos foi possível reduzir o tempo de incubação em dez vezes, de 1h para 10 min, sem haver alteração na atividade enzimática. Além disso, foi possível com um picote de 3 mm retirar três alíquotas de 10  $\mu\text{L}$ , a partir de uma eluição com 40  $\mu\text{L}$  de TU.

Após padronizada a eluição com TU foram comparados quatro grupos de amostras: controles saudáveis (CS), heterozigotos obrigatórios (HT),

pacientes com DG (G) e pacientes em tratamento (TG). Foi possível diferenciar o grupo CS do G para ambas as enzimas, GBA e QT. Também foi possível diferenciar o grupo HT do G, mas o HT não foi diferente do CS, confirmando os achados clínicos, pois como os HT não possuem sintomas estão mais próximos clinicamente dos CS do que dos G.

Foram estabelecidos valores de referência e ponto de corte para a atividade específica das enzimas GBA e QT utilizando a técnica de SPF eluído com TU. Foi estabelecido o ponto de corte de 0,68 nmol/h/mg de proteína para GBA com 100% de sensibilidade e especificidade, sem haver sobreposição de valores entre os CS (0,94 a 9,29 nmol/h/mg de proteína) e G (0,00 a 0,43 nmol/h/mg de proteína), aumentando a confiabilidade da técnica. Já para a QT o ponto de corte estabelecido foi de 34,4 nmol/h/mg de proteína com 100% de sensibilidade e especificidade. Os valores de referência para CS foram de 0,50 a 22,54 nmol/h/mg de proteína e para G de 46,26 a 639,98 nmol/h/mg de proteína, sem haver sobreposição de valores entre os grupos.

Não foi possível utilizar os resultados da atividade da GBA em SPF do grupo TG. Neste grupo foi observado dois tipos de indivíduos, aqueles com atividade diminuída ou nula e aqueles com atividade próxima ao normal ou normal. Atribuímos este fato ao tratamento que estes pacientes estavam recebendo. Provavelmente estávamos medindo a enzima recombinante administrada por via intravenosa, Dependendo do período da coleta (próximo ou longe da infusão) observávamos ou não a atividade enzimática.

Na diferenciação dos grupos através da medida da QT foram obtidas as maiores atividades no grupo G, como era esperado, corroborando os resultados da técnica padrão ouro (plasma), com a atividade variando de 46,26

a 639,98 nmol/h/mg de proteína. Não houve sobreposição de valores entre o grupo G (46,26 a 639,98 nmol/h/mg de proteína) e o grupo CS (0,50 a 22,54 nmol/h/mg de proteína), ou HT (2,11 a 10,37 nmol/h/mg de proteína), sendo possível diferenciar os grupos com segurança. O grupo dos pacientes em tratamento (TG) não foi significativamente diferente do grupo G, devido à amplitude dos resultados de ambos os grupos, mas é evidente que há uma grande redução entre as médias dos grupos de 283,66 nmol/h/mg de proteína (G) para 78,98 nmol/h/mg de proteína (TG). Isso demonstra que há efeito sobre a atividade da QT nos pacientes em tratamento, como mostrado por outros grupos, e que essa nova técnica pode ser utilizada como forma de acompanhamento do tratamento dos pacientes [Hollak et al., 1994a; Bodamer and Hung, 2010].

As novas técnicas que utilizam a eluição do SPF com TU foram comparadas com as técnicas padrão ouro, leucócitos para GBA e plasma para QT. Foi obtida correlação positiva para QT para todos os grupos. Já os resultados das correlações para a GBA não foram tão satisfatórios. Observamos correlação somente entre no grupo G e uma tendência no grupo CS. Estes dados confirmam achados do grupo de Lukacs, que afirmam que os resultados em SPF não possuem correlação em leucócitos, pois a maioria das enzimas medidas nas reações em SPF são enzimas que estão solúveis no plasma [Lukacs et al., 2003].

Para a validação das técnicas utilizando a eluição com o TU foram estabelecidos três coeficientes de variação para cada enzima: intraensaio, interensaio e interpessoal. Os melhores resultados foram obtidos nos coeficientes de variação intra-ensaio, quando comparadas duas alíquotas feitas

do mesmo picote (13% para GBA e 8% para QT) e entre picotes diferentes realizadas no mesmo ensaio (18% para GBA e 16% para QT). Estes resultados estão de acordo com outros trabalhos que utilizam SPF, cujo coeficiente variou de 10% [Müller et al., 2010] a 18% [Olivova et al., 2008] para a GBA. Segundo vários autores, um coeficiente de variação aceitável é aquele até 20% [Müller et al., 2010; Olivova et al., 2008; Lukacs et al., 2011].

A variação interensaio foi de 27% para GBA e 15% para QT. Já a interpessoal, foi acima do aceitável para a GBA, 35%, sendo que para a QT foi de 17%, apesar disto, estas variações não foram significativas. Variações elevadas também foram observadas para GBA por outros grupos chegando a 23,9% em medidas feitas em dias diferentes [Elbin et al., 2011] e 41% entre laboratórios diferentes [De Jesus et al., 2009].

Confirmando achados na literatura para técnicas padrão de SPF fluorimétricas e de espectrofotometria de massa, não foi encontrada diferença significativa entre os picotes feitos no centro e na periferia do sangue seco no papel filtro [Reuser et al., 2011; Mei et al., 2001].

A estabilidade enzimática foi analisada por 21 dias nas amostras armazenadas a 4°C com dissecante para as enzimas GBA e QT com a técnica de SPF eluido com TU. Foi observado decaimento da atividade da GBA armazenada a 4°C com dissecante. A atividade enzimática decaiu 22,3% após duas semanas de coleta e 45,4% após três semanas. Já para a QT não foi observado decaimento da atividade enzimática. Outros estudos mostram que a atividade da GBA decai 35% após 34 dias quando armazenada a 37°C e 21% após um ano a 4°C em baixas condições de umidade, <30% [Adam et al., 2011]. Embora tenhamos utilizado dissecante (saquinhos de sílica gel) dentro

do saco plástico onde conservamos as amostras, acreditamos que a umidade dentro deste local ainda era muito alta o que pode explicar nossos resultados, bem como a diferença dos resultados de Adam et al. (2011), que utilizou baixa umidade controlada. Novos experimentos, com controle da umidade necessitam ser feitos para podermos comparar os resultados. Em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, cinco enzimas foram analisadas conforme a estabilidade em diferentes temperaturas sendo que, somente a alfa-glicosidase obteve decaimento em menos de um mês de armazenamento em quatro temperaturas diferentes [de Castilhos et al., 2011a, 2011b]. Portanto, a estabilidade de acordo com o tempo e a temperatura de armazenamento varia muito de enzima para enzima.

## Considerações finais

A diminuição do volume de amostras e do volume de reação representa uma redução de custos para o diagnóstico da DG. Aliado a isso, a realização das técnicas em placa de 96 poços e a leitura das mesmas em equipamento com leitor de placa se mostraram eficientes e com menor manipulação das amostras, se tornando mais seguras. A triagem em SPF e a posterior confirmação em leucócitos e plasma se mostrou eficiente com 55,2% de confirmação do diagnóstico. O diagnóstico de 37 pacientes em 1,5 anos de triagem representa um número bastante elevado.

A padronização e validação da técnica de medida da atividade específica em SPF eluido com TU com correção do volume de amostra através da quantificação de proteínas totais se mostrou viável. Adaptando a técnica miniaturizada de SPF que utiliza para a reação enzimática um picote de 1,2 mm foi possível, a partir de um único picote de 3 mm, medir a atividade de duas enzimas ou uma enzima em duplicata, além da quantificação de proteínas totais. Além disso, a realização de apenas um “branco” por reação reduz os custos, ao invés, de um branco por amostra como nas técnicas de SPF. A nova técnica demonstrou uma variação entre reações dentro do aceitável, sendo uma técnica reproduzível. A necessidade de realização das reações o mais breve possível após a coleta de sangue, de modo a diminuir o número de falsos positivos, foi demonstrada pela diminuição da atividade enzimática da GBA após 14 dias.

É proposto que a técnica de medida da atividade específica em SPF eluido com TU com correção do volume de amostra pela quantificação de

proteínas totais seja utilizada como uma forma mais segura de triagem e que também pode ser utilizada como forma de diagnóstico enzimático, desde que sejam feitas as dosagens em até 14 dias após a coleta.

## Conclusões

- As técnicas de triagem em SPF para DG foram miniaturizadas e consideradas válidas.
- As técnicas padrão ouro para o diagnóstico de DG foram miniaturizadas e consideradas válidas.
- Foram estabelecidos novos valores de referência e ponto de corte para as técnicas miniaturizadas.
- Foi estabelecido um protocolo de triagem de população de alto-risco para Doença de Gaucher no Brasil utilizando as técnicas miniaturizadas.
- Foi padronizada a temperatura e tempo de eluição do SPF com TU.
- Foi estabelecida a atividade enzimática da GBA e QT em SPF eluído com TU através da correção pela quantificação de proteínas totais.
- Foram estabelecidos valores de referência e ponto de corte para a atividade específica em SPF eluído com TU para GBA e QT.
- Foi possível diferenciar os controles saudáveis dos pacientes com DG através da atividade específica em SPF eluído com TU.
- Os coeficientes de variação obtidos estão dentro do aceitável.

## Perspectivas

Temos como perspectivas deste trabalho:

1. Fazer um estudo mais longo da estabilidade das amostras em SPF eluido com TU a 4°C
2. Ampliar o estudo de estabilidade para outras temperaturas: 37, 25, -20 e -80°C com controle da umidade.
3. Padronizar a atividade específica em SPF para outras enzimas lisossômicas: beta-galactosidase, alfa-glicosidase, alfa-iduronidase, esfingomielinase, arilsulfatase B e hexosaminidase total.
4. Miniaturizar a técnica da medida da atividade da QT em plasma.

## Referências

- Adam, BW, Orsini, JJ, Martin, M, Hall, EM, Zobel, SD, Caggana, M, Hannon, WH. 2011. The preparation and storage of dried-blood spot quality control materials for lysosomal storage disease screening tests. *Clinical biochemistry* 44: 704-10.
- Aviezer, D, Brill-Almon, E, Shaaltiel, Y, Hashmueli, S, Bartfeld, D, Mizrachi, S, Liberman, Y, Freeman, A, Zimran, A, Galun, E. 2009. A plant-derived recombinant human glucocerebrosidase enzyme--a preclinical and phase I investigation. *PLoS one* 4: e4792.
- Barton, NW, Brady, RO, Dambrosia, JM, Di Bisceglie, AM, Doppelt, SH, Hill, SC, Mankin, HJ, Murray, GJ, Parker, RI, Argoff, CE, Grewal, RP, Yu, K-T. 1991. Replacement therapy for inherited enzyme deficiency - macrophage-targeted glucocerebrosidase for Gaucher disease. *The New England Journal of Medicine* 324: 1464-1470.
- Beutler, E, Grabowski, GA. 2001. Gaucher Disease. In: *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill, p 3635-3668.
- Bodamer, O a, Hung, C. 2010. Laboratory and genetic evaluation of Gaucher disease. *Wiener medizinische Wochenschrift (1946)* 160: 600-4.
- Boot, RG, Renkema, GH, Verhoek, M, Strijland, A, Blik, J, de Meulemeester, TMAMO, Mannens, MMAM, Aerts, JMFG, Chem, JMFG. 1998. The Human Chitotriosidase Gene: nature of inherited enzyme deficiency. *The Journal of biological chemistry* 273: 25680-25685.
- Burrow, T a, Grabowski, G a. 2011. Velaglucerase alfa in the treatment of Gaucher disease type 1. *Clinical investigation* 1: 285-293.
- de Castilhos, CD, Mezzalira, J, Goldim, MPS, Coelho, JC. 2011a. Influence of pre-analytical factors on  $\alpha$ -galactosidase A, arylsulfatase B and  $\alpha$ -glucosidase activities measured on dried blood spots on filter paper. *Clinical biochemistry* 44: 922-6.
- de Castilhos, CD, Mezzalira, J, Goldim, MPS, Werlang, FG, Coelho, JC. 2011b. Effect of sample collection, temperature and time of storage on  $\beta$ -galactosidase and total hexosaminidase activities in dried blood collected on filter paper. *Clinical chemistry and laboratory medicine* : CCLM / FESCC 49: 1299-302.
- Chace, DH, Kalas, TA, Naylor, EW. 2003. Use of Tandem Mass Spectrometry for Multianalyte Screening of Dried Blood Specimens from Newborns. *Clinical Chemistry* 49: 1797-1817.

- Chamoles, N a, Blanco, M, Gaggioli, D, Casentini, C. 2002. Gaucher and Niemann-Pick diseases--enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper: retrospective diagnoses in newborn-screening cards. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 317: 191-7.
- Charrow, J. 2004. Ashkenazi Jewish genetic disorders. *Familial cancer* 3: 201-6.
- Charrow, J, Andersson, HC, Kaplan, P, Kolodny, EH, Mistry, P, Pastores, G, Rosenbloom, BE, Scott, CR, Wappner, RS, Zimran, A. 2000. The Gaucher Registry. *Archives of Internal Medicine* 160: 2835-2843.
- Chaves, RG, Coelho, JC, Michelin-Tirelli, K, Maurício, TF, Chaves, EDMF, de Almeida, PC, Maurício, RF, Cavalcanti Jr, GB. 2011. Successful Screening for Gaucher Disease in a High-Prevalence Population in Tabuleiro do Norte ( Northeastern Brazil ): A Cross-Sectional Study. *Journal of inherited metabolic disease* 19: 73-78.
- Chien, Y-H, Lee, N-C, Tsai, F-J, Chao, M-C, Hwu, W-L. 2010. Reduction in imiglucerase dosage causes immediate rise of chitotriosidase activity in patients with Gaucher disease. *Molecular genetics and metabolism* 101: 90-1.
- 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; international journal of clinical chemistry* 372: 98-102.
- Clague, A, Thomas, A. 2002. Neonatal biochemical screening for disease. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 315: 99-110.
- Cox, T, Lachmann, R, Hollak, C, Aerts, J, Weely, SV, Hrebíček, M, Platt, F, Butters, T, Dwek, R, Moyses, C, Gow, I, Elstein, D, Zimran, A. 2000. Novel oral treatment of Gaucher ' s disease with N-butyldeoxynojirimycin ( OGT 918 ) to decrease substrate biosynthesis. *Lancet* 355: 1481-1485.
- Desnick, RJ. 2004. Enzyme replacement and enhancement therapies for lysosomal diseases. *Journal of inherited metabolic disease* 27: 385-410.
- Elbin, CS, Olivova, P, Marashio, C a, Cooper, SK, Cullen, E, Keutzer, JM, Zhang, XK. 2011. The effect of preparation, storage and shipping of dried blood spots on the activity of five lysosomal enzymes. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 412: 1207-12.
- Ficicioglu, C. 2008. Review of miglustat for clinical management in Gaucher disease type 1. *Therapeutics and clinical risk management* 4: 425-31.
- Fletcher, J, Wilcken, B. 2011. Neonatal screening for lysosomal storage disorders. *Lancet* 6736: 11-12.

- de Fost, M, Aerts, JMFG, Hollak, CEM. 2003. Gaucher disease: from fundamental research to effective therapeutic interventions. *The Netherlands journal of medicine* 61: 3-8.
- Gasparotto, N, Tomanin, R, Frigo, AC, Niizawa, G, Pasquini, E, Blanco, M, Donati, MA, Keutzer, J, Zacchello, F, Scarpa, M. 2009. Rapid diagnostic testing procedures for lysosomal storage disorders: alpha-glucosidase and beta-galactosidase assays on dried blood spots. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 402: 38-41.
- Goldstein, JL, Young, SP, Changela, M, Dickerson, GH, Zhang, H, Dai, J, Peterson, D, Millington, DS, Kishnani, PS, Bali, DS. 2009. Screening for Pompe disease using a rapid dried blood spot method: experience of a clinical diagnostic laboratory. *Muscle & nerve* 40: 32-6.
- Hobbs, JR, Hugh-Jones, K, Barrett, AJ, Byrom, N, Chambers, D, Henry, K, James, DC, Lucas, CF, Rogers, TR, Benson, PF, Tansley, LR, Patrick, AD, Mossman, J, Young, EP. 1981. Reversal of clinical features of Hurler's disease and biochemical improvement after treatment by bone-marrow transplantation. *Lancet* 2: 709-12.
- Hollak, CE, Van Weely, S, Van Oers, MH, Aerts, JM. 1994. Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease. *Journal of Clinical Investigation* 93: 1288-1292.
- Hruska, KS, LaMarca, ME, Scott, CR, Sidransky, E. 2008. Gaucher disease: mutation and polymorphism spectrum in the glucocerebrosidase gene (GBA). *Human mutation* 29: 567-83.
- De Jesus, VR, Zhang, XK, Keutzer, J, Bodamer, O a, Mühl, A, Orsini, JJ, Caggana, M, Vogt, RF, Hannon, WH. 2009. Development and evaluation of quality control dried blood spot materials in newborn screening for lysosomal storage disorders. *Clinical chemistry* 55: 158-64.
- Jmoudiak, M, Futerman, AH. 2005. Gaucher disease: pathological mechanisms and modern management. *British journal of haematology* 129: 178-88.
- Kaplan, P, Andersson, HC, Kacena, K a, Yee, JD. 2006. The clinical and demographic characteristics of nonneuronopathic Gaucher disease in 887 children at diagnosis. *Archives of pediatrics & adolescent medicine* 160: 603-8.
- Keutzer, J, Yee, J. 2008. Enzyme replacement therapy for lysosomal storage disorders. *Human gene therapy* 19: 857; author reply 858.
- Kornfeld, S. 1992. Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors. *Annual review of biochemistry* 61: 307-30.

- Kwapiszewski, R, Czartoryska, B, Ziolkowska, K, Chudy, M, Dybko, A, Brzozka, Z. 2011. Substrate inhibition of lysosomal hydrolases:  $\alpha$ -Galactosidase A and  $\beta$ -glucocerebrosidase. *Clinical biochemistry* 44: 941-3.
- Labadaridis, I, Dimitriou, E, Theodorakis, M, Kafalidis, G, Velegaki, a, Michelakakis, H. 2005. Chitotriosidase in neonates with fungal and bacterial infections. *Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition* 90: F531-2.
- Labadaridis, J, Dimitriou, E, Costalos, C, Aerts, J, Weely, S van, Donker-Koopman, WE, Michelakakis, H. 1998. Serial chitotriosidase activity estimations in neonatal systemic candidiasis Serum malondialdehyde levels in preterm and fullterm infants undergoing phototherapy. *Acta Paediatrica* 87: 605.
- Lee, J-Y, Lee, BH, Kim, G-H, Jung, C-W, Lee, J, Choi, J-H, Yoo, H-W. 2012. Clinical and genetic characteristics of Gaucher disease according to phenotypic subgroups. *Korean journal of pediatrics* 55: 48-53.
- Li, Y, Scott, CR, Chamoles, N a, Ghavami, A, Pinto, BM, Turecek, F, Gelb, MH. 2004. Direct multiplex assay of lysosomal enzymes in dried blood spots for newborn screening. *Clinical chemistry* 50: 1785-96.
- Lim-Melia, ER, Kronn, DF. 2009. Current enzyme replacement therapy for the treatment of lysosomal storage diseases. *Pediatric annals* 38: 448-55.
- Lo, SM, McNamara, J, Seashore, MR, Mistry, PK. 2010. Misdiagnosis of Niemann-Pick disease type C as Gaucher disease. *Journal of inherited metabolic disease*.
- Lowry, OH, Rosebrough, NJ, Farr, AL, Randall, RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- Lukacs, Z, Keil, a, Peters, V, Kohlschütter, a, Hoffmann, GF, Cantz, M, Kopitz, J. 2003. Towards quality assurance in the determination of lysosomal enzymes: a two-centre study. *Journal of inherited metabolic disease* 26: 571-81.
- Lukacs, Z, Nieves Cobos, P, Keil, A, Hartung, R, Mengel, E, Beck, M, Deschauer, M, Hanisch, F, Santer, R. 2011. Dried blood spots in the diagnosis of lysosomal storage disorders--possibilities for newborn screening and high-risk population screening. *Clinical biochemistry* 44: 476.
- Létuvé, S, Kozhich, A, Humbles, A, Brewah, Y, Dombret, M-C, Grandsaigne, M, Adle, H, Kolbeck, R, Aubier, M, Coyle, AJ, Pretolani, M. 2010. Lung chitinolytic activity and chitotriosidase are elevated in chronic obstructive pulmonary disease and contribute to lung inflammation. *The American journal of pathology* 176: 638-49.

- Mehta, A. 2006. Clinical experience with substrate reduction therapy. *European journal of internal medicine* 17 Suppl: S13-5.
- Mei, JV, Alexander, JR, Adam, BW, Hannon, WH. 2001. Use of Filter Paper for the Collection and Analysis of Human Whole Blood Specimens 1. *The Journal of Nutrition* 131: 1631S-1636S.
- Michelin, K, Wajner, A, de Souza, FTS, de Mello, AS, Burin, MG, Pereira, MLS, Pires, RF, Giugliani, R, Coelho, JC. 2005. Application of a comprehensive protocol for the identification of Gaucher disease in Brazil. *American journal of medical genetics. Part A* 136: 58-62.
- Müller, KB, Rodrigues, MD, Pereira, VG, Martins, AM, D'Almeida, V. 2010. Reference values for lysosomal enzymes activities using dried blood spots samples - a Brazilian experience. *Diagnostic pathology* 5: 65.
- Olivova, P, Cullen, E, Titlow, M, Kallwass, H, Barranger, J, Zhang, K, Keutzer, J. 2008. An improved high-throughput dried blood spot screening method for Gaucher disease. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 398: 163-4.
- Peters, SP, Coyle, P, Glew, RH. 1976. Differentiation of beta-glucocerebrosidase from beta-glucosidase in human tissues using sodium taurocholate. *Archives of biochemistry and biophysics* 175: 569-82.
- Reuser, AJ, Verheijen, FW, Bali, D, van Diggelen, OP, Germain, DP, Hwu, W-L, Lukacs, Z, Mühl, A, Olivova, P, Piraud, M, Wuyts, B, Zhang, K, Keutzer, J. 2011. The use of dried blood spot samples in the diagnosis of lysosomal storage disorders - Current status and perspectives. *Molecular genetics and metabolism* 104: 144-8.
- Rodrigues, MDB, de Oliveira, AC, Müller, KB, Martins, AM, D'Almeida, V. 2009. Chitotriosidase determination in plasma and in dried blood spots: a comparison using two different substrates in a microplate assay. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 406: 86-8.
- Scott, SA, Edelman, L, Liu, L, Luo, M, Desnick, RJ, Kornreich, R. 2010. Experience with Carrier Screening and Prenatal Diagnosis for Sixteen Ashkenazi Jewish Genetic Diseases. *Human Mutation* 31: 1240-1250.
- Scriver, CR, Scriver, C, Beaudet, AL, Sly, WS, Valle, D, Childs, B, Kinzler, KW, Vogelstein, B. 2000. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 4 Volume Set. McGraw-Hill.
- Shaaltiel, Y, Bartfeld, D, Hashmueli, S, Baum, G, Brill-Almon, E, Galili, G, Dym, O, Boldin-Adamsky, S a, Silman, I, Sussman, JL, Futerman, AH, Aviezer, D. 2007. Production of glucocerebrosidase with terminal mannose glycans for enzyme replacement therapy of Gaucher's disease using a plant cell system. *Plant biotechnology journal* 5: 579-90.

- Skoog, W a, Beck, WS. 1956. Studies on the fibrinogen, dextran and phytohemagglutinin methods of isolating leukocytes. *Blood* 11: 436-54.
- Sopelsa, a M, Severini, MH, Da Silva, CM, Tobo, PR, Giugliani, R, Coelho, JC. 2000. Characterization of beta-galactosidase in leukocytes and fibroblasts of GM1 gangliosidosis heterozygotes compared to normal subjects. *Clinical biochemistry* 33: 125-9.
- Staretz-Chacham, O, Lang, TC, LaMarca, ME, Krasnewich, D, Sidransky, E. 2009. Lysosomal Storage Disorders in the Newborn. *Pediatrics* 123: 1191-1207.
- Suzuki, K, Suzuki, Y. 1970. Globoid cell leucodystrophy (Krabbe's disease): deficiency of galactocerebroside beta-galactosidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 66: 302-309.
- Wajner, A, Michelin, K, Burin, MG, Pires, RF, Pereira, MLS, Giugliani, R, Coelho, JC. 2004. Biochemical characterization of chitotriosidase enzyme: comparison between normal individuals and patients with Gaucher and with Niemann-Pick diseases. *Clinical biochemistry* 37: 893-7.
- Wajner, A, Michelin, K, Burin, MG, Pires, RF, Pereira, MLS, Giugliani, R, Coelho, JC. 2007. Comparison between the biochemical properties of plasma chitotriosidase from normal individuals and from patients with Gaucher disease, GM1-gangliosidosis, Krabbe disease and heterozygotes for Gaucher disease. *Clinical biochemistry* 40: 365-9.
- Wenger, D a, Coppola, S, Liu, S-L. 2003. Insights into the diagnosis and treatment of lysosomal storage diseases. *Archives of neurology* 60: 322-8.
- Wu, AC, Lasky-Su, J, Rogers, C a, Klanderman, BJ, Litonjua, A a. 2010. Fungal exposure modulates the effect of polymorphisms of chitinases on emergency department visits and hospitalizations. *American journal of respiratory and critical care medicine* 182: 884-9.
- Zschocke, J, Hoffmann, GF. 2004. *Vademecum Metabolicum*. Schattauer Verlag.

## Lista de tabelas

Tabela 1. Sintomas encontrados em pacientes com Doença de Gaucher com os subtipos I, II e III (adaptado de ZSCHOCKE e HOFFMANN, 2004). .....	13
Tabela 2. Protocolos de medida da atividade da GBA e da GLB para leucócitos, técnicas padrão e miniaturizada. ....	27
Tabela 3. Protocolos de medida da atividade enzimática da GBA e da QT para SPF, técnica padrão de 3 mm (Civallero et al, 2006) e 1,2 mm (miniaturizada). ....	30
Tabela 4. Valores de referência estabelecidos para a medida da GBA e GLB em leucócitos. ....	36
Tabela 5. Valores de referência estabelecidos para a medida da GBA e QT em SPF. ....	38
Tabela 6. Valores de referência estabelecidos para a medida da QT em plasma. ....	39
Tabela 7. Distribuição regional das amostras enviadas para triagem da DG em população de alto risco no Brasil. ....	42
Tabela 8. Sintomas clínicos e achados laboratoriais observados pelos indivíduos com suspeita de DG (n=165). ....	43
Tabela 9. Atividade total da GBA em SPF com incubação de eluição de 10 minutos a 37°C. ....	51
Tabela 10. Atividade específica da GBA em SPF. ....	52
Tabela 11. Atividade total da QT em SPF com incubação de eluição de 10 minutos a 37°C. ....	54
Tabela 12. Atividade específica da QT em SPF. ....	56
Tabela 13. Correlação entre a técnica padrão ouro miniaturizada, leucócitos para GBA e plasma para QT, e a atividade específica em SPF eluído com TU. ....	57

## Lista de figuras

- Figura 1. Esquema mostrando a conversão de glicosilceramidas (glicocerebrosídeos) em lactosilceramida realizada pela beta-glicosidase ácida. .... 11
- Figura 2. Cartão Whatman 903 utilizado para amostras em sangue impregnado em papel filtro. No segundo círculo, esquerda para direita, foram feitos picotes de 3 mm e nos círculos seguintes picotes de 1,2 mm. .... 29
- Figura 3. Cartão Whatman 903 com sangue impregnado mostrando como foram feitos os picotes de 3 mm centrais (C) e periféricos (P) para testar se o local do picote influenciaria a atividade enzimática com TU. .... 34
- Figura 4. Fluxograma do diagnóstico dos pacientes com doença de Gaucher diagnosticados pelo LEIM-DLD. .... 41
- Figura 5. Atividade da QT em indivíduos, cuja amostra foi enviada antes e durante o tratamento por reposição enzimática. Decaimento da atividade significativo nas técnicas em SPF miniaturizado (A) e plasma (B): \* $p < 0,05$ . Média + desvio padrão. .... 45
- Figura 6. Efeito da temperatura e do tempo de eluição do SPF com o TU sobre a atividade enzimática total da GBA (A) e QT (B). Foram testadas oito alternativas de eluição sendo duas temperaturas (30°C e 37°C) e quatro tempos (10, 20, 30 e 60 minutos) de eluição,  $n=15$ . Diferença significativa entre as temperaturas: \* $p=0,005$  para GBA e \* $p=0,019$  para QT por ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni. Média + desvio padrão. .... 47
- Figura 7. Efeito da temperatura e do tempo de eluição do SPF com o TU sobre a quantificação de proteínas totais. Foram testadas oito alternativas de eluição sendo duas temperaturas (30°C e 37°C) e quatro tempos (10, 20, 30 e 60 minutos) de eluição,  $n=15$ . Diferença significativa entre as temperaturas: \* $p < 0,0001$  por ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni. Média + desvio padrão. .... 48
- Figura 8. Efeito da temperatura e do tempo de eluição do SPF com o TU sobre a atividade enzimática específica da GBA (A) e QT (B). Foram testadas oito alternativas de eluição sendo duas temperaturas (30°C e 37°C) e quatro tempos (10, 20, 30 e 60 minutos) de eluição,  $n=15$ . Diferença significativa entre as temperaturas: \* $p=0,0005$  para GBA e \* $p < 0,0001$  para QT por ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni. Média + desvio padrão. .... 49
- Figura 9. Atividade total da GBA em SPF com incubação de eluição de 10 minutos a 37°C. Diferença significativa entre os grupos por ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni: CS e G e, HT e G ( $p < 0,0001$ ). Média (linhas maiores)  $\pm$  desvio padrão (linhas menores). CS: controles saudáveis,  $n=15$ ; HT: heterozigotos obrigatórios,  $n=4$ ; G: pacientes com Doença de Gaucher,  $n=9$ . 51
- Figura 10. Atividade específica da GBA. Diferença significativa entre os grupos por ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni: CS e G ( $p < 0,001$ ) e, HT e G ( $p < 0,05$ ). Linha pontilhada indica o ponto de corte estabelecido de 0,68 nmol/h/mg de proteína. Média (linhas maiores)  $\pm$  desvio padrão (linhas menores). CS: controles saudáveis,  $n=15$ ; HT: heterozigotos obrigatórios,  $n=4$ ; G: pacientes com Doença de Gaucher,  $n=9$ . .... 53

- Figura 11. Atividade total da QT em SPF com incubação de eluição de 10 minutos a 37°C. Foi possível diferenciar significativamente os grupos CS de G ( $p < 0,0001$ ), CS de TG ( $p < 0,0001$ ), e HT de G ( $p < 0,01$ ). Média (linhas maiores)  $\pm$  desvio padrão (linhas menores). CS: controles saudáveis,  $n=15$ ; HT: heterozigotos obrigatórios,  $n=4$ ; G: pacientes com Doença de Gaucher,  $n=9$ ; TG: pacientes com Doença de Gaucher em tratamento,  $n=15$ . ..... 55
- Figura 12. Diferenciação em SPF da atividade específica da QT. Diferença significativa entre os grupos: CS e G ( $p < 0,001$ ), CS e TG, e HT e G ( $p < 0,01$ ). Linha pontilhada indica o ponto de corte estabelecido de 34,4 nmol/h/mg de proteína. Média (linhas maiores)  $\pm$  desvio padrão (linhas menores). CS: controles saudáveis,  $n=15$ ; HT: heterozigotos obrigatórios,  $n=4$ ; G: pacientes com Doença de Gaucher,  $n=9$ ; TG: pacientes com Doença de Gaucher em tratamento,  $n=15$ . ..... 56
- Figura 13. Atividade da GBA (A) e da QT (B) em duas alíquotas da mesma eluição da amostra (SPF) com TU. Foram utilizadas oito amostras para o estabelecimento do coeficiente de variação intraensaio. Pareamento significativo, teste  $t$ , para ambas enzimas:  $r > 0,90$ . Média (linhas maiores)  $\pm$  desvio padrão (linhas menores). ..... 59
- Figura 14. Atividade da GBA (A) e da QT (B) em três picotes da mesma amostra (SPF) eluídos com TU. Foram utilizadas oito amostras diferentes para o estabelecimento do coeficiente de variação intra-ensaio. Pareamento significativo para ambas enzimas:  $r > 0,80$ . Média (linhas maiores)  $\pm$  desvio padrão (linhas menores). ..... 60
- Figura 15. Atividade da GBA (A) e da QT (B) em 3 reações enzimáticas diferentes da mesma amostra (SPF) eluída com TU. Foram utilizadas oito amostras diferentes para o estabelecimento do coeficiente de variação intrerensaio. Média (linhas maiores)  $\pm$  desvio padrão (linhas menores). ..... 62
- Figura 16. Atividade da GBA (A) e da QT (B) nas mesmas amostras (SPF) eluídas com TU, realizada por dois profissionais diferentes. Foram utilizadas oito amostras diferentes para o estabelecimento do coeficiente de variação intreressoal. Pareamento significativo, teste  $t$ , somente para a QT:  $r = 0,84$ . Média (linhas maiores)  $\pm$  desvio padrão (linhas menores). ..... 64
- Figura 17. Atividade da GBA (A) e QT (B) em dois locais diferentes do picote da mesma amostra de SPF, central ou periférico. Foram utilizadas oito amostras diferentes. Média (linhas maiores)  $\pm$  desvio padrão (linhas menores). ..... 66
- Figura 18. Atividade da GBA (A) e QT (B) após 21 dias de coleta da amostra (SPF). Foram analisadas 8 amostras armazenadas a 4°C. Decaimento significativo para a GBA:  $p < 0,001$ . Média (linhas maiores)  $\pm$  desvio padrão (linhas menores). ..... 68

## **Apêndice A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Você está sendo convidado a participar do trabalho cujo objetivo é implantar técnicas de diagnóstico de doenças lisossômicas de depósito adaptadas para amostras de sangue impregnado em papel filtro, dentro do projeto “Correção da atividade de hidrolases lisossômicas em função da quantidade de amostra de sangue em papel filtro”.

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

Pelo presente, declaro que fui devidamente informado sobre o projeto de pesquisa de forma clara e detalhada, da liberdade de não participar do estudo e tive minhas dúvidas esclarecidas.

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

Indivíduo: \_\_\_\_\_

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

*Pesquisadora responsável: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Janice Coelho (fone 33085549)*

*Pesquisadora: Mariana Pereira de Souza Goldim*

## Apêndice B – Artigo submetido a revista *Molecular Genetics and Metabolism*

Elsevier Editorial System(tm) for Molecular Genetics and Metabolism  
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Miniaturized  $\beta$ -glucosidase and Chitotriosidase Techniques: an Alternative in Screening of High-Risk Gaucher Disease Patients Using Dried Blood Spots on Filter Paper

Article Type: Original Article

Keywords:  $\beta$ -glucosidase; chitotriosidase; dried blood sample on filter paper; enzyme activity; lysosomal storage diseases.

Corresponding Author: Dr. Janice Carneiro Coelho, PhD

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

First Author: Mariana P Goldim, MSc student

Order of Authors: Mariana P Goldim, MSc student; Cristina S Garcia, Student; Cristina D Castilhos, PhD; Vanessa V Daitx, MSc student; Jamila Mezzalira, MSc student; Ana Carolina Breier, MSc; Jaqueline Cé, MSc student; Alexandre S Mello, PhD; Carla V Andrade, MSc student; Nicole S Ribeiro, Student; Janice Carneiro Coelho, PhD

**Abstract:** Gaucher disease (GD) is a lysosomal storage disease caused by deficiency of the enzyme  $\beta$ -glucosidase (GBA, EC 3.2.1.45). Diagnosis is carried out based on GBA activity using leukocytes and chitotriosidase (CT) activity in plasma. This study investigates the miniaturization of the screening technique using dried blood spots on filter paper (DBS) to measure GBA and CT activities, and the miniaturization of the confirmation technique measuring GBA and  $\beta$ -galactosidase activities in leukocytes. In total, 274 DBS collected from individuals with high risk of GD were screened. Enzyme activity indicating GD was observed in 34.3% of samples. Of these, leukocytes were collected to confirm GD, with 55.2% of confirmation, accounting for 13.5% of positive GD results for the initial sample. The miniaturization of the DBS and leukocyte techniques was efficient concerning the detection of GD in high-risk populations, affording to reduce costs and sample size appropriate for a reliable diagnosis.

**Miniaturized  $\beta$ -glucosidase and Chitotriosidase Techniques: an Alternative in Screening of High-Risk Gaucher Disease Patients Using Dried Blood Spots on Filter Paper**

Mariana Pereira de Souza Goldim<sup>1,2</sup>, Cristina da Silva Garcia<sup>1</sup>, Cristina Dickie de Castilhos<sup>1</sup>, Vanessa Vitcoski Daitx<sup>1</sup>, Jamila Mezzalira<sup>1</sup>, Ana Carolina Breier<sup>1,2</sup>, Jaqueline Cé<sup>1</sup>, Alexandre Mello<sup>1</sup>, Carla Vieira Andrade<sup>1,2</sup>, Nicole Sartori<sup>1</sup>, Janice Carneiro Coelho<sup>1,2\*</sup>

*<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica e <sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS – Brasil*

\* Corresponding Author

Address Correspondence to:

Prof<sup>a</sup> Dra. Janice Carneiro Coelho

Departamento de Bioquímica

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rua Ramiro Barcelos, 2600 anexo

90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil.

Telephone: +55 51 33085546

Fax: +55 51 33085535

E-mail: janice.coelho@ufrgs.br

**ABSTRACT**

Gaucher disease (GD) is a lysosomal storage disease caused by deficiency of the enzyme  $\beta$ -glucosidase (GBA, EC 3.2.1.45). Diagnosis is carried out based on GBA activity using leukocytes and chitotriosidase (CT) activity in plasma. This study investigates the miniaturization of the screening technique using dried blood spots on filter paper (DBS) to measure GBA and CT activities, and the miniaturization of the confirmation technique measuring GBA and  $\beta$ -galactosidase activities in leukocytes. In total, 274 DBS collected from individuals with high risk of GD were screened. Enzyme activity indicating GD was observed in 34.3% of samples. Of these, leukocytes were collected to confirm GD, with 55.2% of confirmation, accounting for 13.5% of positive GD results for the initial sample. The miniaturization of the DBS and leukocyte techniques was efficient concerning the detection of GD in high-risk populations, affording to reduce costs and sample size appropriate for a reliable diagnosis.

**KEYWORDS:**  $\beta$ -glucosidase; chitotriosidase; dried blood sample on filter paper; enzyme activity; lysosomal storage diseases.

## 1. INTRODUCTION

Gaucher Disease (GD; MIM 230800) is the most common lysosomal storage disease (LSD), with one case in every 50,000 individuals [1], though in the Jewish Ashkenazi population this prevalence reaches one in every 900 people [2]. Gaucher Disease is a recessive autosomal disease caused by deficiency of the enzyme  $\beta$ -glucosidase (GBA, EC 3.2.1.45), leading to the storage of glucosylceramides (glucocerebrosides) in lysosomes [3]. Glucosylceramides storage is observed mainly in the liver, spleen, bone marrow and lungs, though other organs are also affected, but less intensely. Signs of GD include hepatosplenomegaly, peripheral cytopenia and osteopenia [4]. A considerable number of patients, between 80 and 90%, have GD type I, a condition that does not affect the nervous system [1]. Subtypes II and III lead to neuropathies, and prevalence is of one in every 100,000 individuals [5].

Another enzyme associated to GD is chitotriosidase (CT; EC 3.2.1.14). Increased CT activity is a marker of GD. This increase may reach 1,000 times the normal values in DG patients [6]. The enzyme is widely used as a GD marker, and it is known that enzyme replacement reduces CT levels [7].

To diagnose GD, apart from clinical history, GBA activity measurements are required using leukocytes, while CT activity is assessed using plasma [8,9]. Nowadays, dried blood spots collected on filter paper (DBS) are widely used to screen high-risk populations. The technique is inexpensive, safe in terms of sample handling and easy concerning transportation issues [10,11,12].

The present study reports the findings obtained in the screening of patients with high risk of GD in Brazil, using miniaturized DBS and leukocyte techniques to diagnose the disease. Also, correlations of GBA and CT activities, between DBS and leukocytes as well as between DBS and plasma are presented.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 *Screening of high-risk patients*

In total, 274 DBS (Whatman 903, Whatman Inc. USA) samples collected from suspected GD patients were sent to the Laboratory of Inborn Metabolism Errors and Lysosomal Storage Diseases, Department of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Sul, southern Brazil. Samples were collected between April 2010 and September 2011. Then, GBA and CT activities were measured using the miniaturized techniques described below. After screening, individuals with reduced GBA activity and increased CT activity were referred to collect 9-mL blood samples in heparinized syringes, for biochemical confirmation of GBA activity in leukocytes according to the miniaturized technique described below and CT activity in plasma, as described previously [13]. Plasma separation was carried out by centrifugation (2,500 rpm, 10 min), while leukocytes were isolated according to an established technique [14]. Also,  $\beta$ -galactosidase (GLB) activity was assessed using the miniaturized technique to control sample conservation. When low activities were observed, a new blood sample was required. Reference values were established assessing blood samples provided by donors visiting the blood bank of Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

### 2.2 *Miniaturization of leukocyte measurements*

The technique usually employed to measure GBA activity in leukocytes was miniaturized using 96-well plates so as to avoid biological material transportation and reduce sample volumes. Apart from GBA measurements, used to diagnose GD, GLB activity, a marker of sample conservation, was also miniaturized. Techniques were miniaturized by a factor of 10 to analyze GBA and by a factor of 4 to analyze GLB, adapted from the techniques described by Peters et al. [15] and by Suzuki et al. [16]. These adaptations afforded to reduce sample to 10  $\mu$ L to analyze leukocytes. Reactions

were carried out using an artificial substrate, 4-methylumbelliperyl-b-D-glucoside and 4-methylumbelliperyl-b-D-galactoside (Sigma, St Louis, MO, USA) in dilution buffer (citrate-phosphate 0.54 M and pH 5.5 for GBA, and citrate-phosphate 0.1 M and pH 4.0 for GLB). Reactions were stopped using glycine-NaOH buffer 0.5 M, pH 10.3. Enzyme activity was corrected by quantifying total proteins according to the technique proposed by Lowry [17].

Standard measurements were carried out in glass test tubes. After incubation, 200- $\mu$ L aliquots of the material were transferred to black 96-well fluorometry plates (Perkin-Elmer, 96F) for fluorescence readings. Miniaturized reactions were carried out and read in the 96-well plates. All incubations were carried out in duplicates at 37°C in dry plates under shaking (Marconi MA-127). Fluorescence readings were conducted in a 96-well plate reader at 365 nm (excitation) and 450 nm (emission) (SpectraMax M5, Molecular Devices).

### *2.3 Miniaturization of the DBS technique*

Activity of GBA and CT was measured according to the miniaturization protocol described by Civallero et al. [12], in which reactions originally use a 3-mm punch of DBS. The miniaturization approach adopted in the present study afforded to reduce to a 1.2-mm punch and reaction volume by 2.5 times, enabling analysis and reading in 96-well plates. Additionally, analysis using 3 mm DBS were carried out in 1.5 mL plastic tubes (Eppendorf). After the end of reaction, contents were transferred (200  $\mu$ L) to 96-well black fluorimetric plates for readings at 365 nm (excitation) and 450 nm (emission). Both incubations were carried out at 37°C in a dry plate incubator under shaking. Reactions were carried out using artificial substrate, 4-methylumbelliperyl-b-D-glucoside and 4-methylumbelliperyl-N,N',N''-triacetyl-b-chitotriside (Sigma, St. Louis, MO, USA) and stopped using a buffer of glycine-NaOH buffer 0.5 M, pH 10.3

and ethylenediamine 0.13 M, pH 11.3 for GBA and CT, respectively. Proportions between reactants were observed and reactions were carried out in duplicate.

#### *2.4 Statistical analysis*

Data were expressed as means  $\pm$  standard deviation. Miniaturized techniques were compared to standard techniques using the Pearson correlation. Reference values were established using a ROC curve. Comparison between healthy controls and DG patients was carried out by the Student's *t* test ( $p < 0.05$ ). All procedures were conducted using the GraphPad Prism 5 software.

### **3. RESULTS**

#### *3.1 Miniaturization of the techniques using leukocytes*

A positive correlation was observed in enzyme activities measured using miniaturized techniques in 96-well plates and standard protocol in test tube ( $r = 0.74$  for GBA and  $0.95$  for GLB). This afforded to establish new reference values for GD diagnosis (Table I).

In healthy controls, GLB activity using the miniaturized technique varied between 73.2 and 250.6 nmol/h/mg protein ( $157.9 \pm 69.3$ ; Table I). Therefore, samples with activity below 70 nmol/h/mg protein GLB were excluded, and a new material was collected.

The significant correlation between the standard technique (which uses larger sample volumes) and the miniaturized technique validated the miniaturization protocol adopted in the present study. Therefore, the miniaturized technique was used to carry out all measurements subsequently.

#### *3.2 Miniaturization of the DBS technique*

The measurements using the 1.2-mm DBS punch in 96-well plates correlated positively

with the results obtained in the analysis of 3-mm punch carried out in test tubes ( $r = 0.98$  for CT and  $0.77$  for GBA). This afforded to establish new reference values for screening of GD (Table II).

The significant correlation between the standard technique (which uses larger sample volumes) and the miniaturized technique using DBS validated the miniaturization protocol adopted in the present study. Therefore, the miniaturized technique was used to carry out all measurements subsequently.

### *3.3 Activity of CT in plasma*

Activity of CT in plasma was assessed according to the technique described by Hollak et al. [13]. However, new reference values were established, as shown in Table III.

### *3.4 Screening of high-risk patients*

Screening of DBS samples was carried out based on the measurement of GBA and CT activities. When values measured were below  $2.77$  nmol/h/mL for GBA and higher than  $46.10$  nmol/h/mL for CT (Table II), subjects were referred to collection of additional 9-mL blood samples. Definitive GD diagnosis was established for samples with values under  $6.52$  nmol/h/mg protein, for GBA (Table I) in leukocytes, and values above  $190.3$  nmol/h/mL CT in plasma (Table III). Additionally, when activity of GLB (the enzyme used as internal control) was under  $70$  nmol/h/mg protein, such samples were excluded and a new collection was again requested.

Initial screening using DBS revealed that GBA activity was low and CT activity was high in 94 samples (34.3%) (Figure 1). For these patients, a new collection was requested (9 mL blood), to confirm the diagnosis conducted using leukocytes (GBA) and plasma (CT) according to biochemical protocols. However, of these 94 individuals, only 72 provided heparinized blood samples (76.5%). Of these, GD was confirmed in 37 patients, accounting for 55.2% of the samples actually received (Figure 1). Five

samples were not able to confirm the diagnosis because the activity of GLB was under the acceptable. Therefore, considering all samples initially suspected of GD, positive results were obtained for 13.5%, across the 5 regions of Brazil (Table IV).

Gaucher disease was diagnosed in 16 female (43.2%) and 21 male (56.7%) subjects. Patient age as of diagnosis varied from 6 months to 64 years. Most patients diagnosed with GD were older than 18 (59.6%), though a considerable number (24.3%) was between 2 and 13 years of age.

Clinical changes presents in some of the individuals analyzed are shown in Table V. Some doctors did not send in their reports clinical changes in their patients.

Of the 165 individuals with reported clinical changes 44 (60%) had a previous case of GD in the family (26.6%), and 12 (7.2%) had parental consanguinity.

Apart from the 274 samples initially analyzed, other 84 samples collected on DBS and provided by patients under enzyme replacement therapy was also analyzed as a control to measure CT activity. Of these, 51% were samples collected from males, and patient age varied from 6 months to 81 years. Most of the patients under treatment (56 subjects, 67%) were adults over 18 years of age, followed by 10 teenagers between 14 and 18 years (12%), nine children between 2 and 13 years (11%) and one 6-month-old baby (1%). No age was informed by 8 participants (10%). Most subjects under enzyme replacement therapy (n = 57, 68%) lived in southeast Brazil, followed by 30% native to the northeast and 2% of the midwest regions of the country.

#### **4. DISCUSSION**

Diagnosis of GD is carried out based on the measurement of GBA activity in leukocytes, assisted by the measurement of chitotriosidase in plasma. Recent studies have reported the usefulness of DBS as a screening technique, reducing costs to a

definitive diagnosis [11,12,18,19].

In the present study, we compared miniaturized techniques to measure GBA and CT activities in leukocytes and DBS. GLB technique in leukocytes also was miniaturized, as it is used as a marker of sample quality.

The miniaturization of the techniques using DBS and leukocytes proved efficient and valid. This afforded to cut volumes used in DBS enzyme measurements down to 37.5% of the volumes used in the standard technique. Also, it was possible to reduce the size of punch, from 3 mm to 1.2 mm in diameter. This enabled to produce a larger number of punches per drop of dried blood. Measurements using leukocytes were also satisfactory. GBA was reduced to 25% of the original volume and GLB was reduced to 10% of the original volume, a significant reduction in reactants and sample volumes. Therefore, this means a reduction in costs concerning GD diagnosis. Similar results had been reported by our research group for other enzymes ( $\alpha$ -galactosidase A,  $\alpha$ -glucosidase and arylsulphatase B) [19].

Reference values established for the miniaturized techniques differed from the values defined for techniques that use larger sample volumes. Cutoff values for GBA using DBS were higher (2.77 nmol/h/mL) as compared to other screenings of high-risk populations: 1.78 nmol/h/mL [12] and 2.19 nmol/h/mL [18]. Cutoff values for GBA activity using leukocytes was also higher than the values reported in other studies: 4.1 nmol/h/ mg protein [18] and 5.9 nmol/h/mg protein [9]. In turn, cutoff values established for CT varied considerably across different studies investigating the use of DBS in GD screening: from 86.59 nmol/h/mL [12] to 16.95 nmol/h/mL [11]. In the present study, the value measured was 46.10 nmol/h/mL. In plasma, the cutoff value observed in the present study was 190 nmol/h/mL, higher than the value reported by Michelin et al. [9]: 132 nmol/h/mL. These differences underline the need for specific

reference values in each laboratory.

In the present study, 13.5% of the samples analyzed were positive for GD. In a study carried out to screen GD in the population of Tabuleiro do Norte, a town in the state of Ceará, northeast Brazil, with high prevalence of the disease, 2.3% of the people tested were positive for GD — though families with previously diagnosed cases were excluded. Another study proposed a protocol to identify patients with GD in a reference center for the diagnosis of the disease in Brazil. It was observed that 42 (15.2%) patients were positive for the disease, in a sample consisting of 2,710 people.

Here, most of the samples analyzed for the control of the treatment of GD patients (68%) and a considerable part of samples positive for GD (32.4%) were from subjects living in southeast Brazil. According to the last census in Brazil, the southeast is the country's most populous region, with 41% of the population [20]. Also, it is in this region that the reference centers for the clinical diagnosis of GD are found. The second region in terms of number of patients being treated for GD (30%) and with the highest number of patients that have been diagnosed with the disease (40.5%) is the northeast. This has been reported in recent studies, which detected a higher prevalence of GD in the state of Ceará, specifically in the city of Tabuleiro do Norte [18] and because the region is the second most populous in the country [20].

The decrease in sample and reaction volumes represents a reduction in costs to diagnose GD. Additionally, the use of 96-well plates and the reading of enzyme activity in specific equipment was efficient and afforded to reduce sample manipulation and increasing handling safety. Screening in DBS and subsequent confirmation in leukocytes and plasma was efficient, with 55.2% of confirmation diagnoses. The diagnosis of 37 patients in a 1.5-year period is considered a very high number.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful CAPES and CNPq for financial support, and to HCPA Blood Bank (Clarisse Arisio Juckowsky, M.D. and Sandra Regina Costa Machado).

## REFERENCES

- [1] M. de Fost, J.M. Aerts, C.E. Hollak, Gaucher's disease: from fundamental research to effective therapeutic interventions, *Neth J Med* 61 (2003) 3-8.
- [2] J. Charrow, Ashkenazi Jewish genetic disorders, *Fam Cancer*. 3 (2004) 201-206.
- [3] E. Beutler, G. Grabowski, Gaucher Disease, in: C. Scriver, A. Beaudet, W. Sly, D. Valle (Eds.), *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, McGraw-Hill, New York, 2001, pp. 3635-3668.
- [4] P. Kaplan, H.C. Andersson, K.A. Kacena, J.D. Yee, The clinical and demographic characteristics of nonneuronopathic Gaucher disease in 887 children at diagnosis, *Arch Pediatr Adolesc Med* 160 (2006) 603-8.
- [5] E.R. Lim-Melia, D.F. Kronn, Current enzyme replacement therapy for the treatment of lysosomal storage diseases, *Pediatr Ann* 38 (2009) 448-55.
- [6] A. Wajner, K. Michelin, M.G. Burin, R.F. Pires, M.L. Pereira, R. Giugliani, J.C. Coelho, Comparison between the biochemical properties of plasma chitotriosidase from normal individuals and from patients with Gaucher disease, GM1-gangliosidosis, Krabbe disease and heterozygotes for Gaucher disease, *Clin Biochem* 40 (2007) 365-369.
- [7] R.G. Boot, C.E. Hollak, M. Verhoek, C. Alberts, R.E. Jonkers, J.M. Aerts, Marked elevation of the chemokine CCL18/PARC in Gaucher disease: a novel surrogate marker for assessing therapeutic intervention, *Blood* 1 (2004) 33-39.

- [8] J. Kreutzer, J. Yee, An improved high-throughput dried blood spot screening method for Gaucher disease, *Clin Chim Acta* 398 (2008) 63-164.
- [9] K. Michelin, A. Wajner, F.T. de Souza, A.S. de Mello, M.G. Burin, M.L. Pereira, R.F. Pires, R. Giugliani, J.C. Coelho, Application of a Comprehensive Protocol for the Identification of Gaucher Disease in Brazil. *Am J Med Genet* 136 (2005) 58-62.
- [10] W. Li, F.L.S. Tse, Dried blood spot sampling in combination with LC-MS/MS for quantitative analysis of small molecules, *Biomed Chromatogr* 24 (2010) 49-65.
- [11] M.D.B. Rodrigues, A.C. de Oliveira, K.B. Müller, A.M. Martins, V. D'Almeida, Chitotriosidase determination in plasma and in dried blood spot: a comparison using two different substrates in a microplate assay. *Clin Chim Acta* 406 (2009) 86-88.
- [12] G. Civallero, K. Michelin, J. de Mari, M. Viapiana, M. Burin, J.C. Coelho, R. Giugliani, Twelve different enzyme assays on dried-blood filter paper samples for detection of patients with selected inherited lysosomal storage diseases, *Clin Chim Acta* 372 (2006) 98-102.
- [13] C.E.M. Hollak, S. van Weely, M.H.J. van Oers, J.M.F.G. Aerts, Marked elevation of plasma chitriosidase activity: a novel hallmark of Gaucher disease. *J Clin Invest* 93 (1994) 1288-1292.
- [14] W.A. Skoog, W.S. Beck, Studies on the Fibrinogen, Dextran and Phytohemagglutinin Methods of Isolating Leukocytes. *Blood* 11 (1956) 436-454.
- [15] S.P. Peters, P. Coyle, R.H. Glew, Differentiation of beta-glucocerebrosidase from beta-glucosidase in human tissues using sodium taurocholate. *Arch Biochem Biophys* 175 (1976) 569-571.
- [16] K. Suzuki, Globoid cell leukodystrophy (Krabbe disease) and GM1 gangliosidosis, in: R.H. Glew, S.P. Peters (Eds.), *Practical enzymology of sphingolipidosis*, Alan R

Liss, New York, 1977, pp. 101–36.

[17] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193 (1951) 265–275.

[18] R.G. Chaves, J.C. Coelho, K. Michelin-Tirelli, T.F. Maurício, E.F.M. Chaves, P.C. de Almeida, C.R.F. Maurício, G.B. Cavalcanti Jr, Successful Screening for Gaucher Disease in a High-Prevalence Population in Tabuleiro do Norte (Northeastern Brazil): A Cross-Sectional Study. *JIMD Reports* 19 (2011) 73-8.

[19] C.D. de Castilhos, J. Mezzalira, M.P. Goldim, J.C. Coelho, Influence of pre-analytical factors on  $\alpha$ -galactosidase A, arylsulfatase B and  $\alpha$ -glucosidase activities measured on dried blood spots on filter paper. *Clin Biochem* 44 (2011) 922-6.

[20] IBGE, 2010, <http://www.ibge.gov.br>.

Figure 1. Diagnosis flowchart of patients with GD diagnosed in Laboratory of Inborn Metabolism Errors and Lysosomal Storage Diseases.

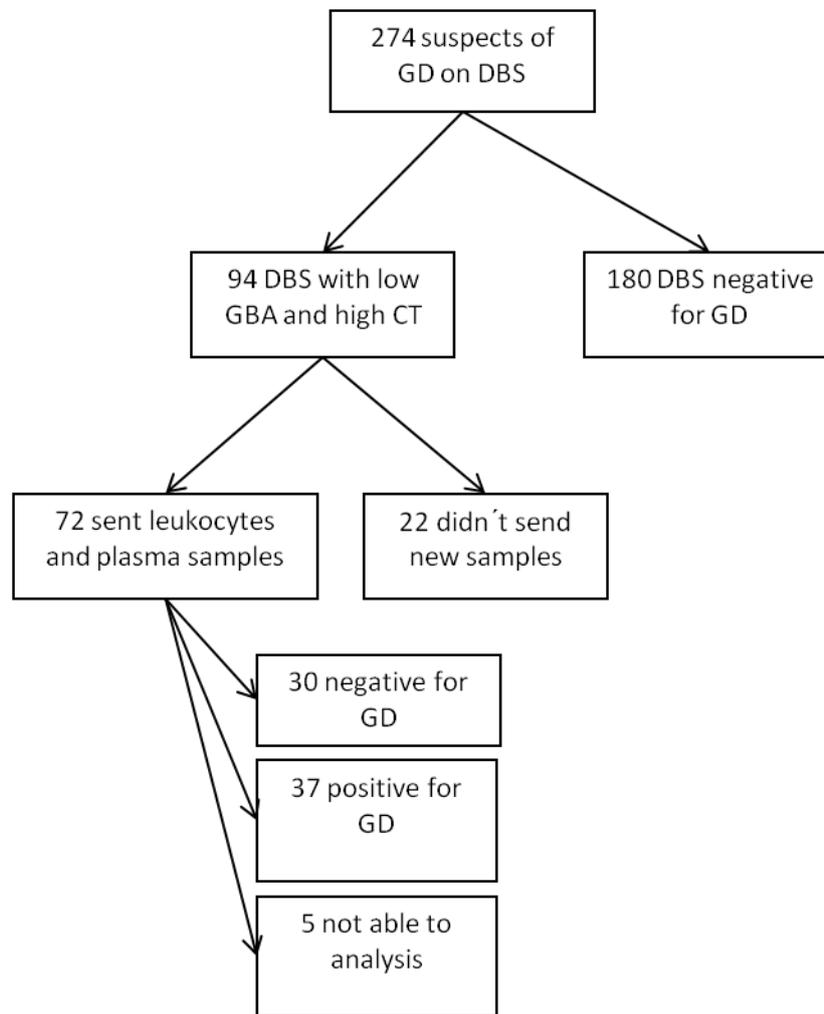


Table I. Enzyme activities in leukocytes.

Enzyme	n	Activities (nmol/h/mg of protein)*	Cutoff value
<i>GBA</i>			
GD patients	30	ND-5.03 (1.38 ± 1.60)	6.52
Healthy volunteers	36	8.01-35.63 (16.15 ± 6.65)	
<i>GLB</i>			
Healthy volunteers	36	73.2 to 250.6 (157.9 ± 69.3)	70.00

ND = not detectable; \* range (mean ± SD)

Table II. Enzyme activities of GD screening on DBS.

Enzyme	n	Activities (nmol/h/mL) *	Cutoff value
<i>GBA</i>			
GD patients	27	ND-2.50 (1.06 ± 0.67)	2.77
Healthy volunteers	21	3.04-7.09 (4.60 ± 1.08)	
<i>CT</i>			
GD patients	22	38.04-2,249 (552 ± 619)	46.10
Healthy volunteers	36	ND-44.51 (17.61 ± 11.66)	

ND = not detectable; \* range (mean ± SD)

Table III. Enzyme activities in plasma.

Enzyme	n	Activities (nmol/h/mL) *	Cutoff value
CT			
GD patients	28	130.70-53.991 (14.951 ± 16.477)	190.30
Healthy volunteers	33	1.74-175.70 (68.75 ± 45.27)	

\* range (mean ± SD)

Table IV. Distribution of GD screening and diagnoses for Brazilian regions.

Regions of Brazil	DBS sent	Low GBA and high CT results in DBS	Positive results for GD in leukocytes and plasma
Northeast	115	39	15
Southeast	81	26	12
North	38	12	3
South	22	9	5
Midwest	18	8	2
<b>TOTAL</b>	<b>274</b>	<b>94 (34.3%)</b>	<b>37 (13.5%)</b>

Table V. Clinical and laboratorial findings presented by individuals suspected of having Gaucher Disease (n=165).

Clinical and laboratorial findings	%
Hepatosplenomegaly	41%
Blood changes	19%
Neurological changes	7%
Hepatic changes	4%
Gaucher cells in bone marrow	4%
Gastrointestinal changes	3%
Bone pain	2%
Hypotonia	2%
Heart conditions	1%
Respiratory changes	1%
Skeletal changes	1%
Renal changes	1%
Ocular changes	1%
Other	13%