



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

**PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DA ENZIMA
N- ACETILGALACTOSAMINA-6-SULFATASE (GALNS) EM
LEUCÓCITOS DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS E INDIVÍDUOS COM MPS IV A**

JAQUELINE CÉ

Orientadora

Prof^a Dr^a Janice Carneiro Coelho

Porto Alegre

2014

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

**PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DA ENZIMA
N-ACETILGALACTOSAMINA-6-SULFATASE (GALNS) EM
LEUCÓCITOS DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS E INDIVÍDUOS COM MPS IV A**

JAQUELINE CÉ

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

Orientadora

Prof^a Dr^a Janice Carneiro Coelho

Porto Alegre

2014

“Tempo abriu, tempo abriu
chuva forte foi embora...”

(Alexandre Carlo)

Agradecimentos

Quero agradecer pela compreensão e incentivo da minha orientadora Dr^a Janice Coelho em todos os momentos difíceis, pela confiança de que tudo daria certo e eu conseguiria vencer mais esse desafio. Agradeço também todos os momentos alegres, os congressos, os conselhos e força que tem me dado em todo esse tempo.

Agradeço à Ana Carolina Breier por ser minha dupla MPS, pelo apoio, amizade, por me entender, me ajudar e também por me presentear com um livro de bioquímica.

À Vanessa Daitx que me trouxe ao grupo e de volta à pesquisa com doenças lisossômicas de depósito, pela amizade, paciência e descontração.

À Jamila Mezzalira pela disposição em elucidar dúvidas, pela amizade, parceria e alegria.

Ao grupo de pesquisa do laboratório 25, Vitória Moraes, Cristina Garcia, Aline Andrade, Dácio Franco, Daniela Copetti, Mariana Chiste e Jaine Santin. Também à Francieli Rohden do laboratório 21, e aos amigos que não estão mais no grupo: Alexandre Mello, Nicole Sartori e Cristina Castilhos.

Ao meu pai que me fez perceber o quanto eu posso ser forte, e pelo tempo que posso dedicar a ele.

Agradeço ao Arthur pelo amor, por entender e sempre apoiar minhas decisões, por compartilhar minhas dúvidas e por todos os momentos de descanso e felicidade.

À minha irmã Jessica, tia Leda, prima Giovana, dinda Ana, amiga Paola e a todos que indiretamente colaboraram para essa conquista.

Ao professor relator Dr. Guilhian Leipnitz e aos membros da banca: Dr^a Caroline Dani e Dr. Charles Marques Lourenço.

E ao Programa de Pós Graduação em ciências biológicas: Bioquímica e à CAPES pelo auxílio financeiro.

ÍNDICE

<i>Parte I</i>	7
<i>Resumo</i>	8
<i>Abstract</i>	9
<i>Lista de abreviaturas</i>	10
1 INTRODUÇÃO	11
1.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO	11
1.2 LISOSSOMOS	13
1.3 DOENÇAS LISOSSÔMICAS DE DEPÓSITO	13
1.4 GLICOSAMINOGLICANOS	14
1.5 MUCOPOLISSACARIDOSES	15
1.6 MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO IV (SÍNDROME DE MORQUIO)	19
1.7 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE MUCOPOLISSACARIDOSES	21
1.8 DIAGNÓSTICO ENZIMÁTICO DE MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO IV A	24
2. OBJETIVOS	27
2.1 OBJETIVO GERAL	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
<i>Parte II</i>	28
<i>Capítulo I</i>	29
MATERIAIS E MÉTODOS	29
Delineamento	29
Local de execução	29
Coleta de amostras	29
Separação de leucócitos	30
Lise de membranas celulares	31
Armazenamento das amostras	31
ANÁLISES BIOQUÍMICAS	32
Quantificação de proteínas totais	32

Medida da atividade da GALNS em leucócitos _____	32
Determinação de Km e V _{máx} da GALNS em leucócitos de indivíduos normais _____	33
Padronização da técnica de medida da atividade da enzima GALNS utilizando menor concentração de substrato _____	34
Estudo do efeito da temperatura (termoestabilidade) sobre a atividade enzimática da GALNS em leucócitos de indivíduos normais _____	34
Medida da atividade da GALNS em SPF _____	36
Descarte de materiais _____	37
Análise estatística _____	37
Considerações éticas _____	37
Capítulo II _____	38
RESULTADOS _____	38
a) Determinação de Km e V _{máx} da GALNS em leucócitos de indivíduos normais _____	38
b) Padronização da técnica de medida da atividade da enzima GALNS utilizando menor concentração de substrato _____	40
c) Estudo do efeito da temperatura (termoestabilidade) sobre a atividade enzimática da GALNS em leucócitos de indivíduos normais _____	41
d) Determinação dos valores de referência da medida da atividade da GALNS em leucócitos de indivíduos normais e afetados com MPS IV A _____	43
e) Medida da atividade da GALNS em SPF _____	45
Parte III _____	48
DISCUSSÃO _____	49
Conclusões _____	58
Perspectivas _____	59
REFERÊNCIAS _____	60
Lista de Tabelas _____	66
Lista de Figuras _____	67

Parte I

Resumo

Mucopolissacaridoses (MPS) são erros inatos do metabolismo, fazem parte das doenças lisossômicas de depósito e ocorrem devido à deficiência na atividade de enzimas que catalisam a degradação de glicosaminoglicanos (GAGs). São doenças crônicas e progressivas causadas pelo acúmulo de um ou mais GAGs nos lisossomos das células. A MPS do tipo IV (síndrome de Morquio) ocorre pelo acúmulo de queratan sulfato e condroitin-6-sulfato, causado pela deficiência de duas diferentes enzimas, que distinguem essa MPS em dois subtipos, deficiência de N-acetilgalactosamina-6-sulfatase (MPS IV tipo A) ou de β -galactosidase (MPS IV tipo B). Na MPS IV A as características clínicas predominantes são relacionadas ao sistema esquelético e na maioria das vezes o paciente tem inteligência normal; não há uma terapia efetiva para a doença, deste modo o diagnóstico precoce direciona para o início de tratamentos paliativos. A investigação inicial dessa MPS se baseia em avaliação clínica, radiografias, quantificação e identificação de GAGs urinários e o diagnóstico definitivo pela medida da atividade enzimática da N-acetilgalactosamina-6-sulfatase (GALNS) em leucócitos ou fibroblastos. O objetivo desse trabalho foi estudar alguns parâmetros bioquímicos da enzima GALNS em leucócitos de indivíduos normais e adaptar a técnica de medida dessa atividade enzimática para sangue impregnado em papel filtro. O Km e a V_{máx} da GALNS em leucócitos de indivíduos normais foi de 7,16mM e 77,3nmol/17h/mg de proteína, respectivamente. Também adaptamos a técnica da medida da atividade enzimática dessa enzima utilizando menor concentração de substrato (3mM), esta concentração teve correlação positiva com a concentração 10 mM, que é empregada na técnica original. A partir disto, foram estabelecidos os valores de referência em leucócitos para indivíduos normais e indivíduos afetados com MPS IV A. Os mesmos foram, respectivamente: 11,0 a 101,4 e 0,1 a 0,2 nmol/17h/mg de proteína. Foi também observado que, com o passar do tempo, a temperatura de 70°C causa uma inativação gradual da atividade enzimática. Por último, apesar de várias alterações na técnica original em leucócitos, não foi possível adaptá-la para ser utilizada na medida da atividade da GALNS em sangue impregnado em papel filtro. A determinação dos parâmetros bioquímicos da GALNS é conveniente devido ao avanço nos estudos clínicos de desenvolvimento da terapia de reposição enzimática aos indivíduos afetados com MPS IV A e na distinção de indivíduos saudáveis, afetados e heterozigotos. Desenvolver técnicas fluorimétricas em amostras de sangue impregnado em papel filtro é de grande importância para serem utilizadas em triagem de recém-nascidos e populações de alto risco para MPS. Devendo ser confirmado por testes de atividade da enzima em leucócitos ou fibroblastos cultivados. A partir dos nossos protocolos, não foi possível desenvolver e padronizar uma técnica para medida da atividade da enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatase em sangue impregnado em papel filtro de modo a triarmos indivíduos com suspeita de MPS IV A.

Palavras chave: mucopolissacaridoses, MPS IV A, sangue impregnado em papel filtro, N-acetilgalactosamina-6-sulfatase.

Abstract

Mucopolysaccharidosis (MPS) are inborn errors of metabolism, are part of the lysosomal storage diseases and occur due to the deficiency in the activity of enzymes that catalyze the degradation of glycosaminoglycans (GAGs). They are chronic and progressive diseases caused by the accumulation of one or more GAGs in the lysosomes of cells. The MPS type IV (Morquio syndrome) occurs by the accumulation of keratan sulfate and chondroitin-6-sulfate, caused by two different enzyme deficiencies, which distinguish this MPS into two subtypes, deficiency of N-acetylgalactosamine-6-sulfatase (MPS IV type A) or the enzyme β -galactosidase (MPS type IV B). In MPS IVA the predominant clinical features are related to the skeletal system and in most cases the patient has normal intelligence. There is no effective therapy for the disease, so early diagnosis directs for the beginning of palliative treatments. The initial investigation of this MPS is based on clinical evaluation, radiographs, quantification and identification of urinary GAGs and the definitive diagnosis by measure of N-acetylgalactosamine-6-sulfatase (GALNS) activity in leukocytes or fibroblasts. The aim of this work was to study some biochemical parameters of the GALNS in leukocytes of normal individuals and adapt the technique of measuring this enzyme activity to blood impregnated on filter paper. The K_m and V_{max} of GALNS in leukocytes from normal subjects was 7.16 mM and 77.3 nmol/17h/mg of protein, respectively. We also adapted the technique of measuring the enzymatic activity of this enzyme using lower substrate concentration (3mM). This concentration had a positive correlation with 10 mM concentration, which is used in the original technique. From this, the reference values for normal and individuals affected with MPS IVA in leukocytes were established. They were 11.0 to 101.4 and 0.1 to 0.2 of nmol/17h/mg of protein, respectively. It was also observed that over time the temperature of 70°C causes a gradual inactivation of enzyme activity. Finally, despite several changes to the original technique in leukocytes, it has not been possible to adapt it to be used in measuring the activity of GALNS blood impregnated on filter paper. The determination of biochemical parameters of GALNS is convenient due to the advancement in clinical studies for the development of enzyme replacement therapy for individuals affected with MPS IVA and to distinguish between healthy and affected heterozygous individuals. The development of fluorometric techniques in blood impregnated on filter paper is of great importance for use in newborn screening and in high risk populations to MPS. It should be confirmed by tests of enzyme activity in leukocytes or cultured fibroblasts. Unfortunately, from our protocols, it was not possible to develop and standardize a technique for measuring the activity of the enzyme N- acetylgalactosamine-6-sulfatase in blood impregnated on filter paper for to screen individuals suspected of MPS IVA.

Keywords: Mucopolysaccharidosis, MPS IVA, blood impregnated filter paper, N-acetylgalactosamine-6-sulfatase.

Lista de abreviaturas

EIM: erros inatos do metabolismo

DLD: doenças lisossômicas de depósito

GAGS: glicosaminoglicanos

HS: heparan sulfato

DS: dermatan sulfato

CS: condroitin sulfato

C4S: condroitin-4-sulfato

C6S: condroitin-6-sulfato

QS: queratan sulfato

AH: ácido hialurônico

MPS: mucopolissacaridoses

MPS I: mucopolissacaridose tipo I

MPS II: mucopolissacaridose tipo II

MPS III: mucopolissacaridose tipo III

MPS IV: mucopolissacaridose tipo IV

MPS IV A: mucopolissacaridose tipo IV A

MPS VI: mucopolissacaridose tipo VI

MPS VII: mucopolissacaridose tipo VII

MPS IX: mucopolissacaridose tipo IX

GALNS: N-acetilgalactosamina-6-sulfatase

TRE: terapia de reposição enzimática

SPF: sangue impregnado em papel filtro

BSA: albumina de soro bovino

Km: constante de Michaelis-Menten

V_{máx}: velocidade máxima

4-MU-S: 4-metilumbeliferil-sulfato

1 INTRODUÇÃO

1.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO

Os erros inatos do metabolismo (EIM) são um grupo fenotipicamente e geneticamente heterogêneo de doenças que ocorrem devido a alterações gênicas que causam a síntese inadequada de determinada enzima ou defeitos no transporte de proteínas (Karam et al., 2001; Mak et al., 2013). A ausência ou deficiência na atividade enzimática ocasiona o bloqueio de alguma rota metabólica, o que impede ou prejudica a transformação de um substrato em produto. Esse bloqueio pode causar o acúmulo do substrato da enzima deficiente, a falta do produto da reação ou o desvio do substrato para uma rota alternativa, capaz de acumular produtos tóxicos (Karam et al., 2001; Martins et.al., 2003).

No início do século XX, Sir Archibal Garrod (1857-1936) empregou o termo “erros inatos do metabolismo” para designar um grupo de doenças que estava pesquisando (alcaptonúria, pentosúria benigna, albinismo e cistinúria). Garrod concluiu que essas doenças resultavam de uma falha em alguma etapa de uma série de reações de uma rota metabólica, o que foi então correlacionado com as leis de Mendel, pois estas alterações existiam desde o nascimento, persistiam durante a vida e membros de uma mesma família apresentavam as mesmas características (Karam et al., 2001; Clarke, 2006). Em 1941, Beadle e Tatum anunciaram o termo “um gene uma enzima” que veio a reforçar as descobertas de Garrod e dar início à genética bioquímica (Scriver, 2008).

A maioria dos EIM é de herança autossômica recessiva existindo poucos com herança recessiva ligada ao cromossomo X. Como o indivíduo necessita ao redor de 50% da atividade enzimática para que as reações ocorram, possuir um dos alelos sem alteração, como acontece nestes tipos de herança, já é suficiente para garantir um funcionamento normal do organismo. Por este motivo os indivíduos heterozigotos não são afetados (Giugliani, 1988, Karam et al., 2001).

Os EIM são classificados de diversas formas. Segundo Saudubray e Charpentier (2001) a classificação clínica é dividida em: categoria 1-envolvem apenas um órgão ou sistema funcional apresentando sintomas uniformes que permitem um diagnóstico correto mesmo quando há consequências sistêmicas e categoria 2 - afetam uma via metabólica comum a um grande número de células ou órgãos e têm uma grande diversidade de sintomas podendo envolver o sistema nervoso central; o avanço da doença desenvolve outras anormalidades que tornam o diagnóstico difícil. Fisiopatologicamente a categoria 2 é dividida em grupo 1: síntese ou catabolismo de moléculas complexas com sintomas permanentes e progressivos não relacionados com a ingestão de alimentos; grupo 2: EIM intermediário que levam a intoxicação aguda ou progressiva a partir de acúmulo de compostos tóxicos sendo um dos tratamentos o uso de dietas especiais; e grupo 3: EIM intermediário devido à deficiência na produção ou utilização de energia e acúmulo de compostos tóxicos resultante de um defeito no fígado, miocárdio, músculo ou cérebro.

Atualmente os EIM ultrapassam 1000 doenças identificadas, que individualmente são raras, porém em conjunto são significativas. Tem sido

relatado que a incidência cumulativa é de mais de 1 em 800 nascidos vivos (Mak et al., 2013).

1.2 LISOSSOMOS

Os lisossomos são organelas citoplasmáticas ligadas à membrana, que contêm uma grande variedade de enzimas hidrolíticas capazes de digerir essencialmente todos os tipos de macromoléculas biológicas (Sabatini e Adesnik, 2001). A maioria das enzimas lisossômicas tem sua atividade ótima em pH ácido (em torno de 5). Quando uma dessas enzimas tem sua atividade deficiente, a substância não é degradada e conseqüentemente é acumulada dentro do lisossomo, que aumenta de tamanho, causando o posterior aumento da célula, órgãos e tecidos (Martins et al., 2007; Lampe et al., 2013).

1.3 DOENÇAS LISOSSÔMICAS DE DEPÓSITO

As doenças lisossômicas de depósito (DLDs) são um grupo heterogêneo de mais de 50 erros inatos do metabolismo causados pela ausência ou deficiência de uma ou mais enzimas responsáveis pela degradação e reciclagem de macromoléculas (Castilhos et al., 2011; Lampe et al., 2013; Wenger et al., 2003). A maioria é de origem autossômica recessiva ou ligada ao cromossomo X e estão classificadas no grupo 1 da categoria 2 dos EIM (Saudubray e Charpentier, 2001). Resultam em acúmulo progressivo de metabólitos não degradados ou parcialmente degradados no interior dos lisossomos de várias células, tecidos e órgãos onde a substância deveria ser

normalmente catabolisada em maiores quantidades (Saudubray e Charpentier, 2001; Lampe et al., 2013).

As DLDs podem ser classificadas de diferentes modos, sendo que a classificação considerada mais útil é aquela baseada na enzima ou proteína deficiente, porém uma mesma enzima pode causar o acúmulo de substratos diferentes. Então a classificação mais comum e clinicamente aceita é em função do tipo de substrato que se acumula nos lisossomos: esfingolipidoses, mucopolissacaridoses, glicoproteinoses, mucolipidoses, oligossacaridoses, glicogenoses (Futerman e van Meer, 2004; Ballabio e Gieselmann, 2009).

1.4 GLICOSAMINOGLICANOS

Os glicosaminoglicanos (GAGs) (heparan sulfato (HS), dermatan sulfato (DS), condroitin sulfato (CS), queratan sulfato (QS) e ácido hialurônico(AH) ou hialuran) são cadeias de heteropolissacarídeos longas, lineares, de carga negativa, compostas por uma unidade de dissacarídeo que se repete (açúcar ácido- açúcar aminado)_n e são sulfatados em diferentes graus, com exceção do ácido hialurônico que não é sulfatado. Geralmente estão associados a pequenas quantidades de proteínas formando proteoglicanos (Champe et al., 2007; Frazier et al., 2008).

Devido à grande quantidade de cargas negativas essas moléculas se repelem e são cercadas por grande quantidade de moléculas de água, então adquirem uma consistência mucóide, viscosa, que tem função lubrificante e de resistência protegendo, por exemplo, mucosas e fluído sinovial (Champe et al., 2007; Martins et al., 2007), sendo considerados constituintes essenciais de

tecidos conectivos, como cartilagens e paredes de vasos (Fernandes et al., 2006).

Os GAGs (exceto o ácido hialurônico) se originam da clivagem proteolítica de proteoglicanos que existem na matriz extracelular e são direcionados aos lisossomos onde são degradados por hidrolases ácidas (enzimas que têm seu pH ótimo de atividade de aproximadamente 5). A degradação progressiva dos glicosaminoglicanos requer 11 enzimas diferentes: quatro glicosidases, cinco sulfatases, uma endoglicosidase e uma transferase não hidrolítica. Possuem uma meia-vida curta entre três dias para o ácido hialurônico e dez dias para o condroitin sulfato e dematan sulfato, apenas o queratan sulfato tem uma meia-vida maior de 120 dias (Neufeld e Muenzer, 2001; Champe et al., 2007, Coutinho et al., 2012)

Os glicosaminoglicanos eram anteriormente denominados mucopolissacarídeos o que originou o nome da doença mucopolissacaridose causada pelo acúmulo dessas moléculas nos lisossomos (Neufeld e Muenzer, 2001, Martins et al., 2007).

1.5 MUCOPOLISSACARIDOSES

As mucopolissacaridoses (MPS) são doenças lisossômicas de depósito, causadas pela deficiência na atividade de enzimas que catalisam a degradação de glicosaminoglicanos. Essas doenças são crônicas e progressivas e ocorrem por causa do bloqueio na rota de degradação de um ou mais GAGs nos lisossomos de muitas células, resultando na disfunção da célula, tecido e

consequentemente do órgão (Neufeld e Muenzer, 2001; Lehman et al., 2011; Muenzer, 2011; Clarke et al., 2012; Coutinho et al., 2012).

São conhecidas onze enzimas diferentes que resultam em sete MPS distintas, todas possuem sintomas e características clínicas em comum, porém em graus variáveis com variabilidade na idade de início e progressão da doença em cada órgão ou sistema envolvido (Neufeld e Muenzer, 2001; Auray-Blais et al., 2012; Clarke et al., 2012; Coutinho et al., 2012). Os sintomas mais evidentes nas MPS causados pelo dano progressivo do acúmulo de GAGs são organomegalias, face grosseira, rigidez nas articulações, mal formações esqueléticas e retardo no crescimento, sendo muito comum os problemas cardíacos, pulmonares, oculares e de audição; além disso, em alguns tipos ocorre comprometimento neurológico (Lehman et al., 2011; Coutinho et al., 2012)

As MPS foram classificadas em diferentes tipos de acordo com a enzima que se encontra deficiente e os graus de comprometimento clínico (que podem ser causados pela deficiência de uma mesma enzima) (Neufeld e Muenzer, 2001). Existem sete tipos, sendo que as designações V e VIII não são utilizadas e o tipo IX possui apenas um paciente descrito na literatura (Natowicz et al., 1996; Muenzer, 2004; Martin et al., 2008; Coutinho et al., 2012). O fenótipo primeiramente designado MPS V na realidade era uma forma leve de MPS I, a síndrome de Sheie e o VIII foi baseado em um dado incorreto e foi inutilizado (Coutinho et al., 2012) Os tipos III e IV possuem subtipos. Estes subtipos possuem as mesmas manifestações clínicas, mas são causados pela deficiência de diferentes enzimas (Muenzer, 2004) (Tabela 1).

Todas as MPS são doenças hereditárias de origem autossômica recessiva, exceto a MPS II que é de herança recessiva ligada ao cromossomo X e acomete principalmente pacientes do sexo masculino (Neufeld e Muenzer, 2001; Muenzer, 2011). São consideradas raras (Neufeld e Muenzer, 2001), e sua incidência conjunta é estimada em 1:25:000 recém nascidos vivos (Tomatsu et al., 2013).

As MPS atingem o organismo de modo sistêmico e progressivo, os indivíduos afetados devem ser acompanhados por uma equipe multidisciplinar a fim de proporcionar tratamentos paliativos e permitir uma melhora na qualidade de vida desses pacientes. O diagnóstico precoce pode adiar ou prevenir o desenvolvimento de patologias irreversíveis e contribuir nos resultados para as MPS que são passíveis de tratamentos (Lehman et al., 2011; Muenzer, 2011; Coppa et al., 2012).

Alguns tratamentos que permitem a restauração parcial da atividade enzimática ou inibição da síntese de GAGs já são utilizados ou estão em estudo como: terapia de reposição enzimática (disponível para MPS I, II e VI) (Martell et al., 2011; Auray-Blais et al., 2012; Tomatsu et al., 2013), transplante de medula óssea (Neufeld e Muezer, 2001), transplante de células-tronco hematopoéticas, terapia gênica e inibidores da síntese do substrato (Tomatsu et al., 2013).

Apesar desses avanços recentes, a falta de conhecimento sobre a doença, a não especificidade dos sintomas e as manifestações clínicas variáveis frequentemente impedem o diagnóstico rápido e preciso. Para pacientes com fenótipos leves, o tempo entre a identificação dos primeiros

sintomas e o diagnóstico, muitas vezes é de anos, às vezes décadas (Lehman et al., 2011).

Tabela 1: Classificação das mucopolissacaridoses

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

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

1.6 MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO IV (SÍNDROME DE MORQUIO)

A Mucopolissacaridose do tipo IV (síndrome de Morquio) é causada pela deficiência de duas diferentes enzimas levando a dois subtipos: a deficiência de N-acetilgalactosamina-6-sulfatase (MPS IV tipo A) e a de β -galactosidase (MPS IV tipo B). As características clínicas predominantes estão relacionadas ao sistema esquelético e, na maioria das vezes, o paciente tem inteligência normal (Neufeld e Muenzer, 2001; Tomatsu et al., 2005; Coutinho et al., 2012).

A MPS IV A ocorre devido à deficiência da N-acetilgalactosamina-6-sulfatase (GALNS), também denominada galactose-6-sulfatase. Trata-se de uma enzima lisossomal necessária para a degradação de queratan sulfato (QS) e condroitin-6-sulfato (C6S). Esses glicosaminoglicanos quando não degradados ou parcialmente degradados ficam acumulados nos lisossomos e em parte são excretados na urina (Kleijer et al., 2000; Tomatsu et al., 2004; Montaña et al., 2007; Khedhiri et al., 2012).

A incidência geral estimada da MPS IV A é de 1:200.000 nascidos vivos. Entre as várias populações a incidência pode variar de 1 para 40.000 a 1 para 450.000 nascidos vivos (Martell et al., 2011; Tomatsu et al., 2011; Rivera-Colón et al., 2012; Hendriksz et al., 2013).

O acúmulo de QS e C6S nos tecidos causa entre, outras manifestações, displasia esquelética, face grosseira, restrição do crescimento, hipermobilidade articular, doença cardíaca valvular, doença pulmonar, apnéia obstrutiva do sono, hepatomegalia, opacificação da córnea, perda auditiva, e dentes mal formados. As características clínicas podem ser variáveis devido a mais de 150 mutações no gene que codifica a GALNS já identificadas. Há heterogeneidade

clínica considerável variando de leve a severa com base na atividade residual da GALNS (Montaño et al., 2007; Martell et al., 2011). Os indivíduos afetados nascem sem manifestações aparentes, com o progresso da doença, os primeiros sintomas aparecem entre 1 e 3 anos de idade na forma severa da MPS IV A (Tomatsu et al., 2011; Regier et al., 2013). Estes geralmente se apresentam como retardo do crescimento, cifose, geno valgo, tronco e pescoço curto e dificuldades na marcha (Neufeld e Muenzer, 2001; Tomatsu et al., 2011; Pajares et al., 2012). Disfunções visuais, auditivas, respiratórias e cardiovasculares afetam a qualidade de vida do indivíduo com MPS IV A e podem contribuir para a diminuição do seu tempo de vida (Hendriksz et al., 2013). Pacientes com sintomatologia severa quando não tratados não sobrevivem até a segunda ou terceira década de vida, e casos mais leves podem viver até os 70 anos de idade (Alméciga-Díaz et al., 2009; Tomatsu et al., 2011).

Atualmente não existe tratamento para MPS IVA, apenas medidas paliativas para o manejo da dor, infecções, doenças respiratórias e tratamentos ortopédicos (Laradi et al., 2006; Martell et al., 2011; Harmatz et al., 2013), porém a Terapia de Reposição enzimática (TRE), onde semanalmente o paciente recebe a infusão de enzima recombinante, está em fase III de estudos clínicos (Alméciga-Díaz et al., 2009; Khaliq et al., 2011; Martell et al., 2011; Rivera-Colón et al., 2012).

O diagnóstico se baseia em avaliação clínica, radiografias, quantificação e identificação de GAGs urinários e a medida da atividade da GALNS em leucócitos ou fibroblastos (Hendriksz et al., 2013).

A enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatase (E.C.3.1.6.4) é uma sulfatase que catalisa a hidrólise de ligações éster de sulfato, removendo grupos sulfato a partir de uma N-acetilgalactosamina-6-sulfato ou galactose-6-sulfato do C6S e QS. In vitro, a maioria das sulfatases pode hidrolisar substratos sintéticos (Rivera-Colón et al., 2012), o mais utilizado para a medida da atividade dessas enzimas é o 4-metilumbeliferil-sulfato (4 -MU-S).

1.7 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE MUCOPOLISSACARIDOSES

O diagnóstico laboratorial para MPS é baseado inicialmente em análises dos GAGs urinários e ensaios de medida de atividade enzimática em sangue ou fibroblastos (Lehman et al., 2011; Hendriksz et al., 2013).

Análise urinária

A investigação bioquímica em urina consiste de testes quantitativos e qualitativos (Neufeld e Muenzer, 2001) que identificam o aumento de GAGs, pois quando não são degradados corretamente devido à deficiência de alguma enzima, uma parte fica depositada no lisossomo e outra é eliminada na urina (Martins et al., 2007).

As técnicas de quantificação de GAGs são baseadas na interação das cargas negativas dos GAGs com as cargas positivas do reagente de cor utilizado no ensaio em espectrofotômetro (De Jong et al., 1992). Diferentes métodos podem ser utilizados para esta determinação, porém o mais utilizado é a técnica colorimétrica do azul-1,9-dimetilmetileno que explora a afinidade de ligação dos GAGs com corantes azuis (Mabe, 2004).

Indivíduos normais excretam na urina C4S e C6S e uma baixa quantidade de HS, essa excreção decresce com a idade, valores mais elevados são encontrados durante os primeiros anos de vida, seguido por uma diminuição lenta que se torna constante na vida adulta. Indivíduos com MPS têm maior excreção urinária de GAGs em comparação com indivíduos normais na mesma faixa etária, no entanto, nem todos os indivíduos com MPS tem uma clara elevação da excreção total de GAGs e resultados falso-negativos podem ser encontrados em amostras diluídas ou na falta de sensibilidade da técnica utilizada (Muenzer, 2011). Uma análise precisa requer a quantificação de GAGs totais e a identificação de qual tipo está sendo excretado (Lehman et al., 2011).

A detecção dos GAGs excretados é realizada por meio de cromatografia ou eletroforese para direcionar o diagnóstico às análises enzimáticas correspondentes (Hendriksz et al., 2013).

A quantificação dos GAGs também é utilizada para monitorar a terapia de reposição enzimática pelo acompanhamento na excreção urinária do indivíduo afetado (Lehman et al., 2011).

Análise enzimática

A excreção aumentada dos GAGs pode distinguir os diferentes tipos de MPS, mas não seus subtipos. O diagnóstico definitivo das MPS é realizado por ensaios enzimáticos, que podem ser feitos em diversos tipos de células e fluídos biológicos, sendo preferenciais os leucócitos, soro e fibroblastos; correlacionando com os achados clínicos (Neufeld e Muenzer, 2001 e Muenzer, 2004).

O diagnóstico de MPS deve ser confirmado pela medida da atividade enzimática da enzima correspondente ao GAG excretado e outras doenças relacionadas devem ser descartadas, como deficiência múltipla de sulfatases e mucopolidose, por possuírem características clínicas em comum com MPS. A atividade da enzima normalmente é medida em leucócitos ou fibroblastos cultivados (Lehman et al., 2011; Muenzer, 2011; Hendriksz et al., 2013).

Análise molecular

Permite identificar mutações e sequências anormais em genes que codificam uma enzima. Devido ao grande número de mutações existentes em cada MPS não é utilizado na avaliação inicial. É utilizado na confirmação de diagnóstico e pode ter valor prognóstico se a mutação já tiver sido identificada e caracterizada, além de permitir o uso em testes pré-natais para irmãos e de portadores para os familiares (Lehman et al., 2011; Muenzer, 2011).

Outras análises

Além dos métodos citados, a espectrometria de massa em tandem e ELISA também são descritos como métodos utilizados no diagnóstico de MPS e alguns estudos buscam estabelecer possíveis biomarcadores para identificar a progressão da doença e resposta ao tratamento (Lehman et al., 2011; Martell et al., 2011; Clarke et al., 2012).

1.8 DIAGNÓSTICO ENZIMÁTICO DE MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO IV A

A medida da atividade enzimática da N-acetilgalactosamina-6-sulfatase pela técnica fluorimétrica descrita por van Diggelen et al. (1990) é a análise utilizada como diagnóstico da MPS IV A e pode ser realizada em leucócitos ou em fibroblastos. Essa metodologia utiliza um substrato artificial fluorogênico 4-metilumbeliferil- β -D-galactosídeo-6-sulfato e é realizada em duas etapas: primeiro a enzima GALNS presente na amostra remove a porção 6-sulfato do substrato e posteriormente adiciona-se enzima β -galactosidase exógena que remove a porção galactosídeo. Após, é então liberado o produto fluorescente 4-metilumbeliferona que é detectado por leitura de fluorescência (Wood et al., 2013). Resultados abaixo dos valores de referência caracterizam a deficiência dessa enzima (Hendriksz et al., 2013).

A GALNS atua em dois substratos, N - acetilgalactosamina- 6- sulfato e galactose-6-sulfato, que são componentes do condroitin-6-sulfato e do queratan sulfato, respectivamente (Khaliq et al., 2011; Wood et al., 2013).

Devido à MPS IV A acometer principalmente o sistema esquelético não há uma terapia efetiva para a doença, deste modo o diagnóstico precoce direciona para o início de tratamentos paliativos (Montaño et al., 2007).

Na MPS IV A, a triagem inicial por testes de quantificação e de identificação de glicosaminoglicanos em urina pode apresentar níveis próximos aos de normalidade, não sendo possível a distinção destes dos indivíduos normais (Whitley et al., 2002; Tomatsu et al., 2004; Hendriksz et al., 2013).

O diagnóstico definitivo da MPS IV A se dá, então, pela identificação da deficiência da GALNS pela medida da atividade enzimática em amostras de

leucócitos ou fibroblastos (Martell et al., 2011). Preferencialmente é realizado em amostras de sangue por ser um método menos invasivo e com resultados mais rápidos do que a metodologia em fibroblastos que depende de cultivo celular, requerendo um maior tempo para obtenção do resultado (Regier et al., 2013; Wood et al., 2013).

A coleta, modo de envio e transporte de sangue podem afetar os resultados da análise enzimática quando não realizados de forma adequada e podem levar a resultados inconclusivos e solicitações de novas coletas. Neste caso, o envio de amostras de sangue impregnadas em papel filtro (SPF) é conveniente em regiões onde é difícil enviar sangue ou tecido para a utilização em triagem neonatal ou de populações de alto risco, no entanto, uma coleta adequada da amostra e o transporte correto também são críticos para o sucesso dessa análise (Wood et al., 2013).

A medida da atividade da GALNS em amostras de SPF pode ser uma alternativa como triagem, mas não é um método tão específico ou eficaz quanto o realizado em fibroblastos ou leucócitos devido ao menor número de células presentes na amostra (Wood et al., 2013).

A única técnica fluorimétrica citada na literatura (Camelier et al., 2011) utilizando o substrato MU- β -Gal-6S em SPF, necessita de um tempo de incubação muito grande (48h) e quando testada não foi reprodutível. Alguns pesquisadores também já tentaram sem sucesso diminuir o tempo e reproduzir a técnica (Fujisaki et al., 2013). Sendo assim, novos esforços com o objetivo de adaptar essa técnica são necessários.

Não sendo possível desenvolver a técnica em SPF só resta aos laboratórios de pesquisa e diagnóstico utilizar a metodologia em leucócitos ou

fibroblastos. Neste caso, adaptações visando a diminuição do custo e tempo de análise, bem como o estabelecimento de parâmetros bioquímicos da enzima que possam auxiliar futuramente na distinção dos grupos normais, afetados e heterozigotos, são importantes.

Além disso, o estabelecimento dos parâmetros bioquímicos da GALNS é importante devido aos estudos clínicos em andamento sobre o desenvolvimento da terapia de reposição enzimática aos indivíduos afetados com MPS IV A.

Apesar de existir um grande número de mutações já identificadas e outras novas sendo descobertas (Hendriksz et al., 2013; Tomatsu et al., 2005; Wood et al., 2013), a análise molecular geralmente tem um custo mais elevado, além de despender mais tempo para se chegar ao diagnóstico. Levando-se em consideração o acima exposto, o estudo do comportamento bioquímico da enzima de indivíduos normais e posteriormente em afetados e heterozigotos também se torna importante.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar alguns parâmetros bioquímicos da enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatase em leucócitos de indivíduos normais e adaptar a técnica de medida dessa atividade enzimática para sangue impregnado em papel filtro.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar K_m (constante de Michaelis-Menten) e $V_{m\acute{a}x}$ (velocidade máxima) da enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatase em leucócitos de indivíduos normais;
2. Adaptar a técnica de medida da atividade enzimática em leucócitos utilizando menor concentração de substrato;
3. Estudar o efeito da temperatura na atividade da enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatase em leucócitos de indivíduos normais;
4. Estabelecer os valores de referência para indivíduos normais e indivíduos afetados com MPS IV A seguindo a técnica padronizada no objetivo número 2;
5. Adaptar a técnica da medida da atividade da enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatase em leucócitos para ser utilizada em papel filtro, visando à diminuição do uso de reagentes e materiais utilizados na análise.

Parte II

Capítulo I

MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento

Este foi um trabalho experimental de estudo da atividade da enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatase.

Local de execução

Esse estudo foi realizado no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo - Doenças Lisossômicas de Depósito (laboratório 25) do Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob orientação da Prof^a Dr^a Janice Carneiro Coelho.

Coleta de amostras

O cálculo do tamanho amostral foi realizado para comparação entre médias com variâncias diferentes, estabelecendo o nível de significância em 5% e o poder em 90% (Armitage e Berry, 1987), utilizando-se o programa estatístico MiniTab® 16. O número de indivíduos utilizados em cada estudo está especificado em cada resultado.

Foram utilizadas no estudo amostras de sangue obtidas de doadores voluntários convidados a participar da pesquisa que receberam e assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE); o recrutamento e coleta foram realizados pela mestranda. As amostras foram devidamente identificadas com números, preservando a identidade dos doadores, que não foram

informados dos resultados e não tiveram sua identidade revelada em nenhuma etapa de execução do projeto.

Foram colhidos 10 mL de sangue total com anticoagulante heparina de cada indivíduo. As amostras foram homogeneizadas e então adicionadas duas gotas de sangue uma sobre a outra, com pipeta Pasteur descartável em cada um dos cinco círculos do cartão de papel filtro Protein Saver™903™ Card (Whatman™GE Healthcare Bio-Sciences Corp., EUA). O papel foi seco à temperatura ambiente por 4h em posição horizontal. O restante do sangue foi utilizado para a separação de leucócitos.

Separação de leucócitos

Os leucócitos foram separados das amostras de sangue total heparinado segundo a técnica de Skoog e Beck (1956). As amostras de sangue total foram transferidas para tubos de vidro e adicionado em cada amostra o mesmo volume da solução de separação de leucócitos (glicose 5% + dextran 6% + ácido cítrico dextrose, dissolvidos em NaCl 0,9%), homogeneizados levemente por inversão e deixados em temperatura ambiente por 45 a 60 minutos para a sedimentação dos eritrócitos. Após transcorrido o tempo, foi realizada a retirada do máximo de sobrenadante contendo os leucócitos em suspensão, cuidando-se para não aspirar os eritrócitos. O sobrenadante foi transferido para tubos cônicos plásticos gelados (TPP, Techno Plastic Products, Suíça) e centrifugado (Himac CR22GII, Hitachi Ltd, Japão) a 2000rpm por 10min a 4°C. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram descartados e ao precipitado (leucócitos) foi adicionado NaCl 0,9%. Os leucócitos foram resuspendidos com agitador de tubos (MA-162, Marconi,

Brasil). Adicionou-se água destilada gelada e novamente foram homogeneizados com o agitador de tubos e deixados por 90 segundos no gelo. NaCl 3,6% foi adicionado e as amostras foram novamente homogeneizadas e então centrifugadas a 3000 rpm por 3 minutos a 4°C. Após a centrifugação, descartaram-se os sobrenadantes e, se ainda existissem eritrócitos no precipitado, foram repetidas as operações.

Lise de membranas celulares

Antes da quantificação de proteínas totais e medida da atividade enzimática, os precipitados de leucócitos isolados foram diluídos em água destilada e sonicados para a lise das membranas plasmáticas e lisossomais e liberação das enzimas lisossômicas. A sonicação (Sonicator Ultrasonic Processor, Hert Systems) foi realizada utilizando dois ciclos de 25 segundos intercalados por 30 segundos com intensidade de 7,5 a 10%, que representa 45 W, com as amostras mantidas em gelo.

Armazenamento das amostras

As amostras de SPF foram armazenadas a -4°C, em geladeira, em sacos plásticos individuais com dessecante guardados em pote plástico com tampa e os leucócitos foram armazenados nos tubos cônicos a -20°C. Após serem diluídos e sonicados ficaram armazenados em microtubos de fundo cônico em caixa para microtubos até o momento das análises.

ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Quantificação de proteínas totais

A quantificação de proteínas das amostras foi realizada conforme protocolo da técnica colorimétrica descrita por Lowry et al. (1951) miniaturizada com a utilização de albumina na obtenção da curva padrão nas concentrações de 2,5 a 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Em placa transparente de fundo plano com 96 poços (PE SpectraPlate™ -96TC, Perkin Elmer) foram adicionados 10 μL de cada amostra de leucócitos e 40 μL de água destilada em duplicata. O branco foi realizado com 50 μL de água destilada. Foram adicionados 150 μL de reativo alcalino de cobre e cronometrado 10 minutos, após adicionou-se 15 μL de reagente Folin-Ciocalteu (mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico) (Merck) e cronometrado mais 30 minutos e então lida a absorbância em leitor de placas SpectraMax M5 Multi-Mode Microplate Readers (Molecular Devices) a 750nm.

Medida da atividade da GALNS em leucócitos

A atividade da N-acetilgalactosamina-6-sulfatase foi medida de acordo com a técnica fluorimétrica descrita por van Diggelen et al. (1990) utilizando-se o substrato 4-metilumbeliferil- β -D-galactosídeo-6-sulfato (MU- β Gal-6S, Moscerdam Substrates) e a atividade enzimática foi expressa em nmol/17h/mg de proteína.

O ensaio foi realizado em duas etapas. Na primeira etapa foi pipetado em duplicata em placas fluorimétricas pretas de 96 poços (OptiPlate™ -96F, Perkin Elmer), 10 μL de BSA 0,2% (albumina de soro bovino inativada contendo

azida sódica) como branco da análise e 10 μ L das amostras de leucócitos diluídas em BSA 0,2% numa concentração que corresponda a 10 μ g de proteína. Após, foi adicionado 20 μ L do substrato 4-metilumbeliferil- β -D-galactosídeo-6-sulfato 10mM e incubado por 17h a 37°C em incubadora de placas a seco com agitação (CT712- Cientec).

Transcorridas 17 horas foi realizada a 2^o etapa, adicionando-se 5 μ L de tampão fosfato (fosfato dissódico 0,9M/ fosfato monossódico 0,9M pH 4,3 com azida sódica 0,02%) e 10 μ L de β -galactosidase 10U (β -D-Galactosídeo-galactohidrolase de *Aspergillus oryzae*, Sigma G5160). A placa voltou à incubadora por mais 2 horas a 37°C. Após esse tempo a reação foi parada pela adição de 200 μ L do tampão de parada (bicarbonato de sódio 0,5M/carbonato de sódio 0,5M pH 10,7 + Triton X-100 0,025%). Uma curva padrão com 4-metilumbeliferona foi preparada e a fluorescência da mesma, junto com a dos testes, foi lida em espectrofluorímetro (SpectraMax M5 Multi-Mode Microplate Readers - Molecular Devices) em comprimento de onda de 365nm de excitação e 450nm de emissão. A atividade foi expressa como nanomol de substrato clivado por 17 horas por miligrama de proteína em leucócitos.

Determinação de Km e V_{máx} da GALNS em leucócitos de indivíduos normais

Para determinação da curva de Michaelis-Mentem (curva de substrato), foram preparados soluções do substrato MU- β Gal-6S nas concentrações 1, 3, 5, 7 e 10mM diluindo-se com tampão acetato de sódio 0,1M/ácido acético 0,1M contendo cloreto de sódio 0,1M, azida sódica 0,02% e acetato de chumbo 5mM em pH 4,3. Após obtenção da curva de substrato, a linearidade foi

observada e novos pontos de concentração de substrato foram estabelecidos (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0mM) para determinação do Km e da Velocidade Máxima da reação. Estes parâmetros foram calculados utilizando o gráfico de Lineweaver e Burk.

Padronização da técnica de medida da atividade da enzima GALNS utilizando menor concentração de substrato

Devido a problemas fora da nossa capacidade de resolução, como dificuldade na importação do substrato MU- β Gal-6S fabricado somente pelo pesquisador que padronizou a técnica de medida da atividade da GALNS (van Diggelen et al., 1990), optamos por reduzir a quantidade de substrato para medida da atividade enzimática.

Após análise dos resultados obtidos na curva de substrato e segundo trabalho realizado por Fujisaki et al. (2013), resolvemos adaptar a técnica de medida da atividade da GALNS em leucócitos utilizando-se o substrato MU- β Gal-6S na concentração de 3mM. A técnica foi realizada conforme método descrito anteriormente e correlacionou-se as medidas das atividades enzimáticas de doze amostras de leucócitos de indivíduos normais obtidos com o substrato na concentração de 3mM com os resultados alcançados com substrato na concentração de 10mM (técnica original).

Estudo do efeito da temperatura (termoestabilidade) sobre a atividade enzimática da GALNS em leucócitos de indivíduos normais

Para o estudo do efeito da temperatura na atividade enzimática da GALNS foi primeiramente realizada uma curva de temperatura de inativação da

enzima. Para tanto, foram escolhidas as temperaturas 60°C, 70°C e 80°C. As amostras foram pré-incubadas nestas temperaturas durante 30 minutos. A atividade total considerada como 100% de atividade foi aquela expressa pelas amostras que ficaram aguardando a 0°C (banho de gelo) até o momento do início da reação enzimática. Estas amostras não sofreram, portanto, inativação térmica. Em seguida à pré-incubação, as amostras foram diluídas em BSA 0,2% e imediatamente acrescentado 3mM de substrato às mesmas em duplicata e a reação enzimática realizada a 37°C conforme descrição anterior da técnica.

Após a realização da curva de temperatura, escolheu-se a temperatura de 70°C cujas amostras responderam melhor à inativação para darmos seguimento aos estudos de termoestabilidade da GALNS. Para tanto, amostras foram incubadas nessa temperatura por 5, 10, 15, 20, 30 e 60 minutos. Os resultados foram comparados com as mesmas amostras incubadas a 0°C (100% de atividade).

Determinação dos valores de referência da medida da atividade da GALNS em leucócitos de indivíduos normais e afetados com MPS IV A

Para determinação do intervalo de normalidade da atividade da GALNS, foi medida a atividade enzimática de dezesseis amostras de leucócitos de indivíduos normais nas condições estabelecidas anteriormente (concentração de substrato 3mM). Foram utilizadas amostras de dois indivíduos com MPS IV A para obtermos o nível de atividade em leucócitos de indivíduos afetados.

Medida da atividade da GALNS em SPF

Foi realizada a técnica citada na literatura para a medida da GALNS em SPF (Camelier et al., 2011). É importante salientar que essa técnica utiliza uma concentração de substrato de 10 mM e incubação das amostras de 48h seguida da segunda incubação por 6h à 37°C.

Um teste com o substrato na concentração de 3mM com diluição prévia do picote de 3mm com água destilada foi realizado com uma incubação de 46h seguida da segunda incubação de 6h conforme Fujisaki et al. (2013). Nos demais testes a medida da atividade da GALNS em SPF foi adaptada da técnica em leucócitos de acordo com listado na tabela 2:

Tabela 2: Resumo da técnica de medida da atividade da GALNS

GALNS	Leucócitos	SPF 3mm	SPF1,2mm
Amostra + BSA	10µL	25µL	10µL
Substrato	20µL	50µL	20µL
Incubação I - 37°C nos tempos analisados			
Tampão Pi	5µL	12,5µL	5µL
B-gal	10µL	25µL	10µL
Incubação II -37°C 2h			
Tampão Parada	200µL	500uL	200µL

Foram feitos picotes de 3mm e 1,2mm em duplicata de cada amostra. Os ensaios das amostras de SPF de 3mm foram realizados em microtubos plásticos de 1,5mL e os picotes de 1,2mm tiveram a reação realizada diretamente em placas fluorimétricas pretas de 96 poços nos tempos de incubação da reação de 17 e 35h. Diferentes tempos de incubação foram testados nos picotes de 3mm: 14, 17, 20, 25, 30, 35 e 48h e o substrato foi utilizado na concentração de 10mM.

Descarte de materiais

As amostras biológicas processadas (sangues) foram descartadas na pia junto com hipoclorito de sódio (conforme orientação em reunião da Gestão Ambiental/UFRGS). Os rejeitos gerados das reações colorimétricas e fluorimétricas foram depositados em galões classificados conforme os reagentes em sala especial no Departamento. Todos os materiais plásticos utilizados foram descartados como lixo contaminado A1 em sacos brancos no laboratório e após levados até o ponto de coleta do Departamento (armazenamento externo), e colocados em bombonas próprias para este fim, onde são recolhidos pela empresa licitada pela Universidade, responsável pelo transporte externo, tratamento e disposição final.

Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão e os resultados obtidos foram comparados por correlação de Pearson ou ANOVA de uma via seguida de teste de Bonferroni, considerando $p < 0,05$, e analisados com auxílio do programa GraphPad Prism versão 5.03.

Considerações éticas

Os doadores voluntários receberam e assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE). As amostras não foram identificadas com o nome do paciente e os dados foram tratados com confiabilidade, de acordo com a resolução 196/96 da CONEP. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de ética e Pesquisa da UFRGS sob o número 137197.

Capítulo II

RESULTADOS

a) Determinação de K_m e $V_{máx}$ da GALNS em leucócitos de indivíduos normais

Para realização da curva de Michaelis-Menten (curva de substrato), foram utilizadas sete diferentes concentrações de substrato de 1 a 20mM. Os resultados encontram-se na figura 1. De acordo com a curva de Michaelis-Menten (figura 1), foram escolhidas as seguintes concentrações de substrato para determinação do K_m : 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0mM e $V_{máx}$ através do gráfico de Lineweaver-Burk. O K_m da GALNS em leucócitos de indivíduos normais calculado foi 7,16mM e a velocidade máxima encontrada foi de 77,3nmol/17h/mg de proteína (figura 2).

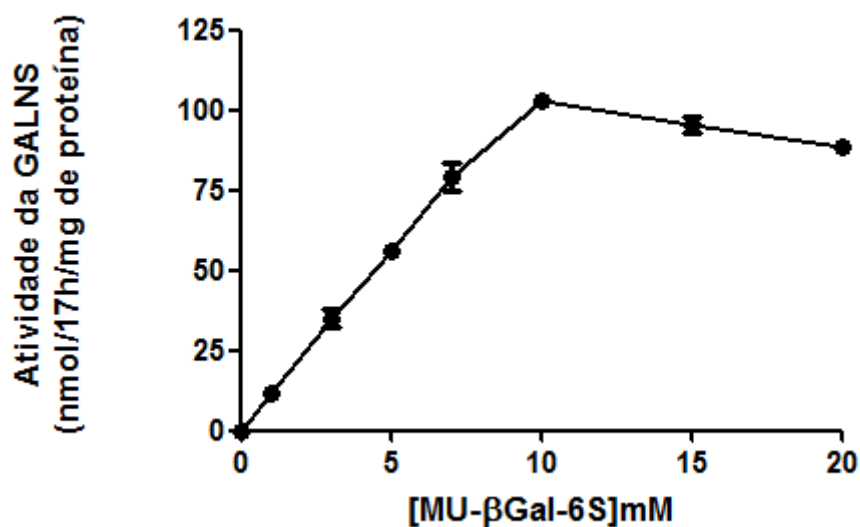


Figura 1: Curva de substrato (Michaelis-Menten) da GALNS - efeito de diferentes concentrações do substrato MU-βGal-6S sobre a média da atividade enzimática da GALNS em leucócitos de indivíduos normais (n = 3).

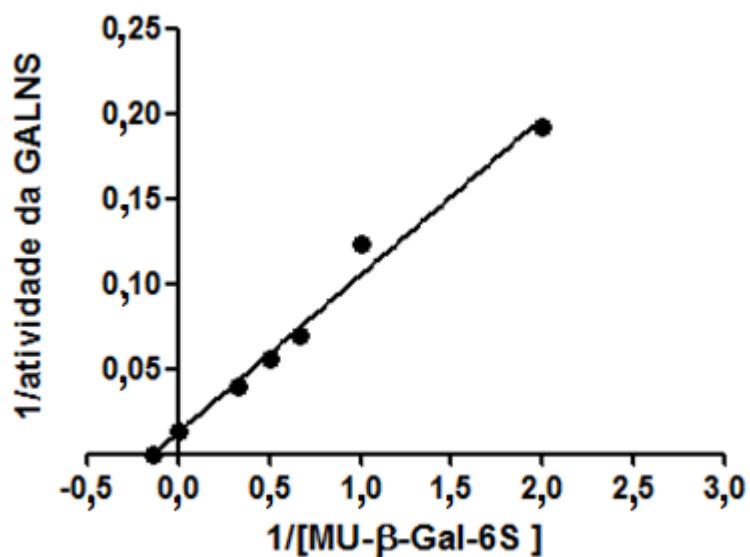


Figura 2: Determinação do Km e da Velocidade Máxima (Vmax) da GALNS em leucócitos de indivíduos normais (Lineweaver-Burk) (n=3). Atividade enzimática expressa em nmol//17h/mg de proteína e concentração de substrato em mM.

b) Padronização da técnica de medida da atividade da enzima GALNS utilizando menor concentração de substrato

Levando em consideração a curva de substrato realizada no item anterior e trabalhos de outros autores (Fujisaki et al., 2013), utilizamos a concentração de 3mM do substrato MU- β Gal-6S na medida de atividade da GALNS. Embora tenhamos testado somente a concentração de 3mM, esta foi ideal para a medida da atividade enzimática da GALNS em leucócitos.

Utilizando doze amostras de leucócitos foi observado que a média da atividade com 10mM de MU- β Gal-6S foi de $97,4 \pm 36,2$ nmol/17h/mg de proteína enquanto que a média da atividade em 3mM de MU- β Gal-6S foi de $24,0 \pm 9,36$ nmol/17h/mg de proteína, isso nos mostra que a atividade medida com substrato na concentração de 10mM é 3,92 vezes maior do que aquela em 3mM. Quando dividido 10mM por 3mM obtemos uma razão de 3,33 vezes. A correlação entre as medidas da atividade da GALNS nas duas concentrações de substrato testadas foi significativa (r de Pearson=0,9946; $p < 0,0001$ -figura 3).

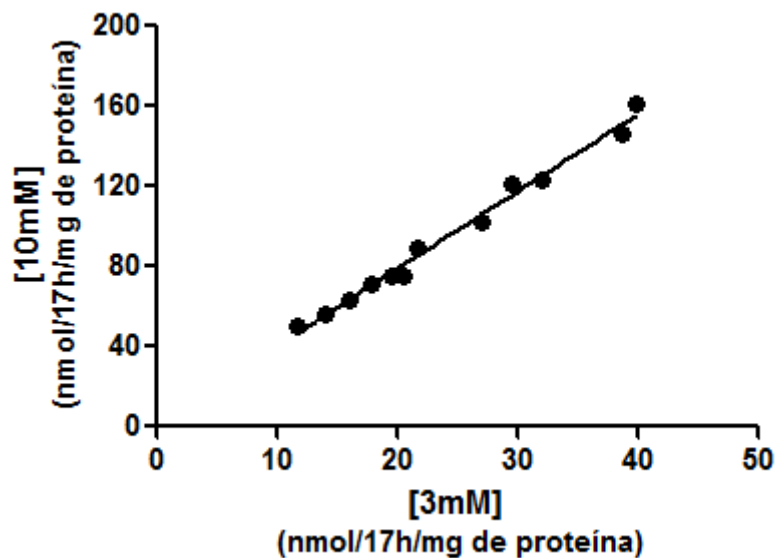


Figura 3: Correlação entre a medida da atividade enzimática da GALNS com substrato MU-βGal-6S na concentração de 3mM e 10mM.

c) Estudo do efeito da temperatura (termoestabilidade) sobre a atividade enzimática da GALNS em leucócitos de indivíduos normais

A curva de temperatura de inativação da GALNS está demonstrada na figura 4. A medida da atividade enzimática das amostras de leucócitos de indivíduos normais, utilizando substrato na concentração de 3mM, que foram submetidas a pré-incubação em banho-maria (Marconi-MA 127) por 30 minutos em 60°C, 70°C e 80°C foi de 116,3±24,4%; 43,5±22,0% e 0,37±0,17% respectivamente, quando comparados com a atividade considerada 100% (0°C na pré-incubação). A temperatura de 70°C foi considerada a ideal para o estudo da inativação pelo calor (figura 4).

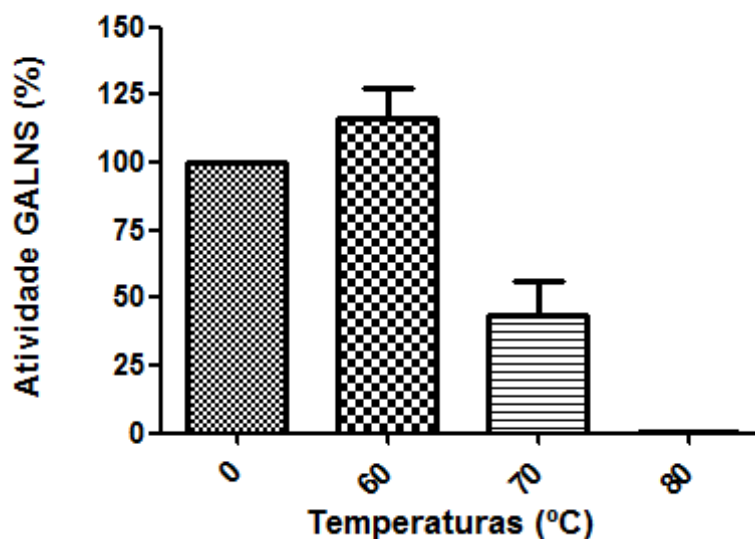


Figura 4: Curva de temperatura de inativação da enzima GALNS em leucócitos de indivíduos normais após 30 minutos de pré-incubação.

Após a realização da curva de temperatura, foi escolhida a temperatura de 70°C para a realização do estudo da termoestabilidade da GALNS pré-incubando-se em banho-maria as amostras de leucócitos de indivíduos normais durante 5, 10, 15, 20, 30 e 60 minutos antes da realização do ensaio da medida da atividade enzimática. Como 100% de atividade enzimática, ou seja, atividade total, sem inativação enzimática, foi considerado o resultado das mesmas amostras incubadas a 0°C.

As atividades residuais da GALNS em leucócitos após 5, 10, 15, 20, 30 e 60 minutos de pré-incubação, comparada com as amostras não submetidas a este tratamento térmico (100% de atividade) foram de $87,47 \pm 23,28\%$; $68,62 \pm 14,76\%$; $64,71 \pm 21,66\%$; $59,71 \pm 14,31\%$; $43,54 \pm 22,04\%$ e $24,33 \pm 4,93\%$, respectivamente (figura 5).

Os resultados obtidos por ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni (figura 5) nos permitem observar que à 70°C ocorreu uma inativação

gradual da enzima, sendo que a atividade enzimática residual a partir de 30 minutos já é significativamente menor ($p < 0,05$) que a atividade da enzima a 0°C (100% de atividade).

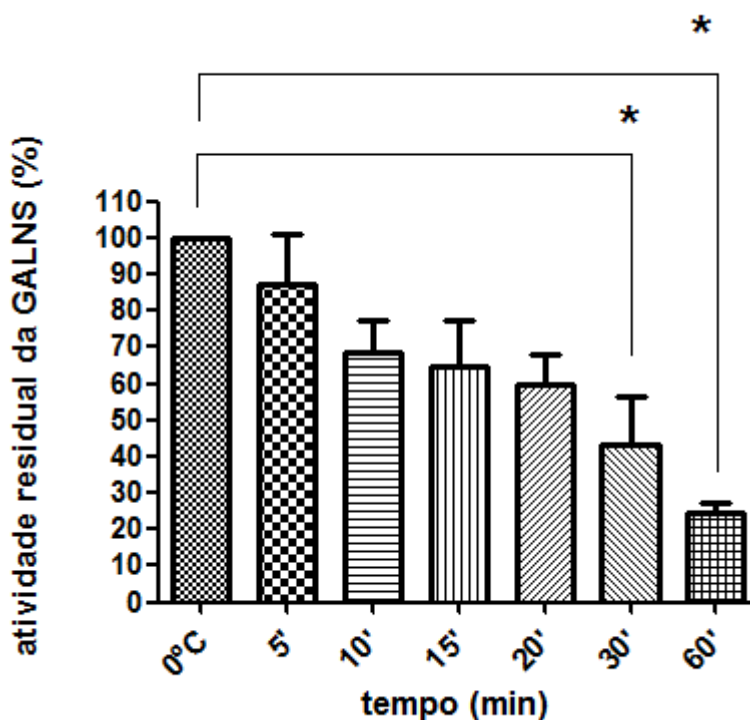


Figura 5: Termoestabilidade da enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatase em leucócitos de indivíduos normais. Atividade enzimática reportada como porcentagem da atividade residual comparada com amostras não submetidas à pré-incubação (100% atividade) * $p < 0,05$

d) Determinação dos valores de referência da medida da atividade da GALNS em leucócitos de indivíduos normais e afetados com MPS IV A

Após padronizada a técnica de medida de atividade da GALNS em leucócitos utilizando-se a concentração de substrato de 3mM, partiu-se para a determinação dos valores de referências para a atividade enzimática, tanto para indivíduos normais como para pacientes com MPS IVA.

Para tanto, foi medida a atividade enzimática de dezesseis amostras de leucócitos de indivíduos normais e de dois indivíduos com MPS IV A, a fim de observar se era possível diferenciá-los. Os indivíduos normais obtiveram uma média da atividade enzimática da GALNS de $31,0 \pm 22,0$ nmol/17h/mg de proteína e os afetados de $0,15 \pm 0,07$ nmol/17h/mg de proteína. Os valores de referência determinados para indivíduos normais e afetados foram de 11,0 a 101,4 e 0,1 a 0,2 nmol/17h/mg de proteína, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3: Atividade da enzima GALNS em leucócitos de indivíduos normais e afetados com MPS IV A utilizando a concentração de substrato de 3mM

	Indivíduos normais	Indivíduos afetados
Média	31,08	0,15
Desvio Padrão	22,02	0,07
Mínimo	11,80	0,10
Máximo	101,40	0,20
Mediana	20,70	0,15

Resultados expressos em nmo/17h/mg de proteína.

O ponto de corte entre os valores de atividade enzimática da GALNS encontrados em indivíduos normais e afetados foi estabelecido como 6,0 nmol/17h/mg de proteína, valor onde a sensibilidade e especificidade foi de 100% (Intervalo de Confiança de 95%) (Figura 6).

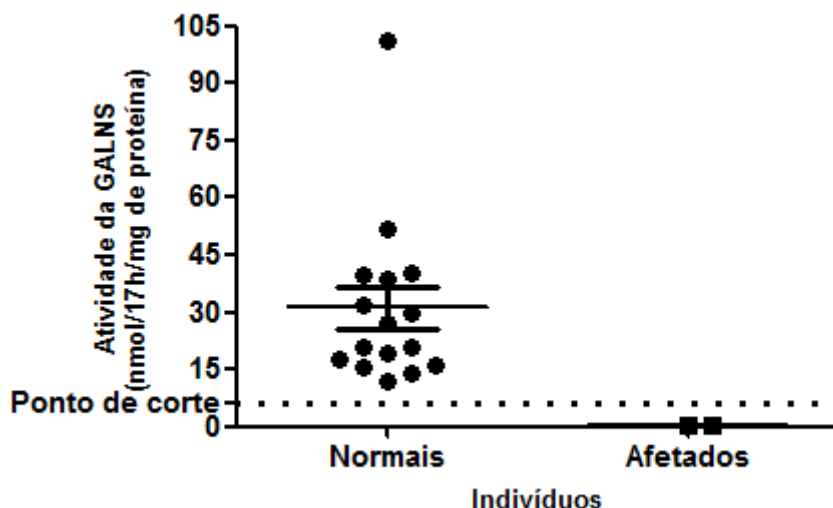


Figura 6: Atividade da GALNS em leucócitos de indivíduos normais e afetados com MPS IV A

e) Medida da atividade da GALNS em SPF

Ensaio de atividade da GALNS em picote de 3mm de SPF com incubação de 48h

Conforme citado na literatura (Camelier et al., 2011), foi testada a reação enzimática da GALNS em picotes de 3mm de SPF utilizando-se uma incubação de 48h na primeira etapa e mais 6h na segunda etapa da técnica. O procedimento foi realizado de acordo com o descrito e em nenhum dos testes foram encontrados valores de atividade acima de zero nmol/48h/mL de sangue total (Figura 7). No mesmo ensaio foram medidas as atividades enzimáticas em leucócitos das amostras como controle da técnica em SPF. As amostras em leucócitos apresentaram atividade normal ($73,33 \pm 24,87$ nmol/17h/mg de proteína).

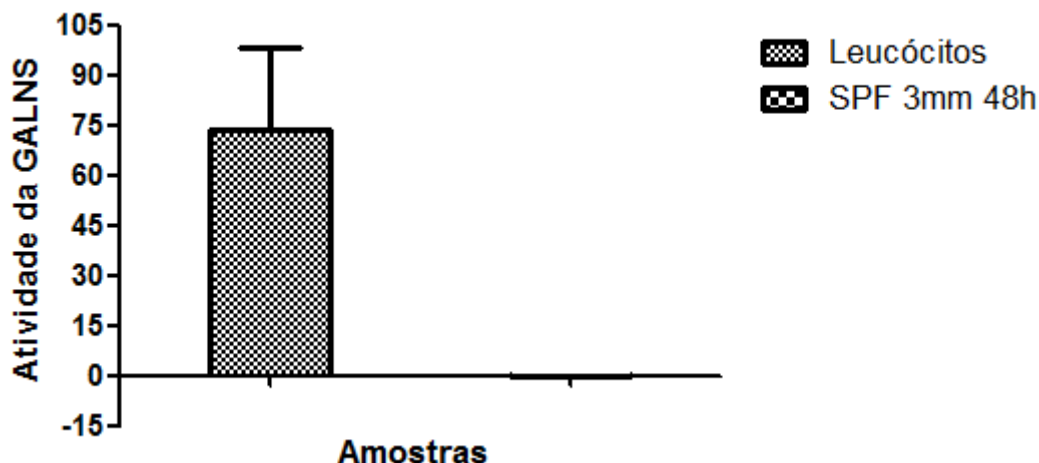


Figura 7: Atividade da GALNS em leucócitos e SPF segundo técnica de Camelier et al. (2011). Valores de atividade em leucócitos reportados como média±DP de nmol/17h/mg de proteína e em SPF como nmol/48h/ml de sangue total. (n=3)

Ensaio de atividade da GALNS em picote de 3mm de SPF previamente eluído com incubação de 46h

Seguindo o descrito por Fujisaki et al. (2013) foi realizada a análise de medida da atividade da GALNS em SPF eluindo-se previamente um picote de 3mm em 100µL de água destilada por 1h à temperatura ambiente e após realizado o ensaio enzimático utilizando-se 20 µL do sobrenadante dessa eluição e adicionando-se 40µL do substrato MU-βGal-6S. As amostras foram então incubadas por 46h a 37°C e dado seguimento a técnica. Os resultados obtidos mais uma vez foram abaixo de zero (Figura 8). No mesmo ensaio foram medidas as atividades enzimáticas em leucócitos das amostras como controle da técnica em SPF. As amostras em leucócitos apresentaram atividade normal em relação ao tempo de 46h ($2,4 \pm 0,1$ nmol/46h/mg de proteína).

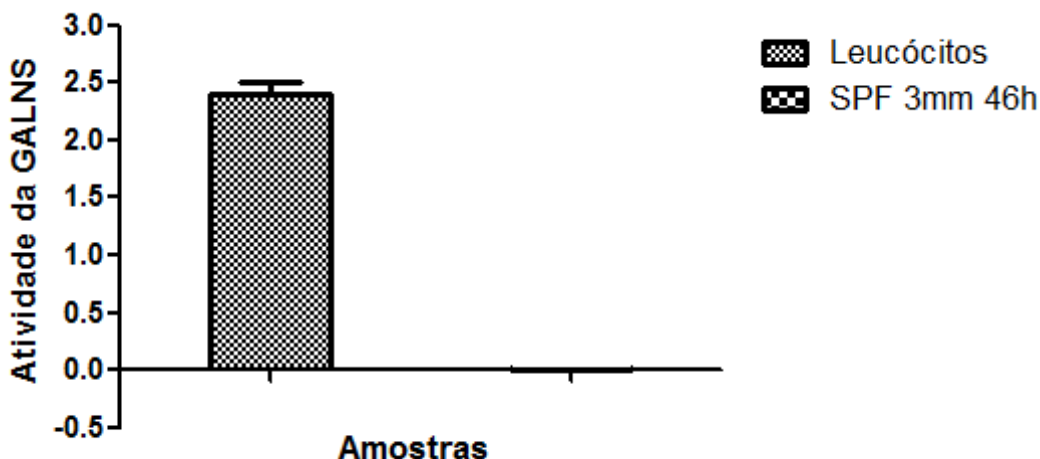


Figura 8: Atividade da GALNS em leucócitos e SPF segundo técnica de Fujisaki et al. (2013). Valores de atividade em leucócitos reportados como média \pm DP de nmol/46h/mg de proteína e em SPF como nmol/46h/ml de sangue total. (n=3)

Ensaio de curva de tempo de incubação da técnica em SPF com picotes de 3 e 1,2mm

Como as duas técnicas anteriores não tiveram sucesso na medida da atividade da enzima, a medida da atividade da GALNS em picotes de SPF adaptada da técnica em leucócitos foi testada em diferentes tempos de incubação a fim de investigar se a técnica seria reproduzível. Os testes foram realizados nos tempos de incubação de 14, 17, 20, 25, 30 e 35h para picotes de 3mm e nos tempos de 1 e 35h para picotes de 1,2mm, utilizando-se o substrato na concentração de 10mM.

Não foi obtido nenhum resultado acima de zero nmol/tempo testado/mL de sangue de total em nenhum dos tempos testados. Como a técnica em leucócitos necessita uma incubação a 37°C por 17h, somente utilizamos leucócitos de indivíduos saudáveis com o objetivo de comparação entre as técnicas neste tempo. A atividade média em dez leucócitos em 17h de incubação foi de 115,3 \pm 68,23 nmol/17h/mg de proteína.

Parte III

DISCUSSÃO

Nesse trabalho foram estudados alguns parâmetros bioquímicos da enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatase em leucócitos de indivíduos normais e houve a tentativa de adaptar a técnica de medida dessa atividade enzimática para sangue impregnado em papel filtro.

A determinação dos parâmetros bioquímicos da N-acetilgalactosamina-6-sulfatase em leucócitos de indivíduos normais é conveniente devido ao avanço nos estudos clínicos de desenvolvimento da terapia de reposição enzimática (Lampe et al., 2013) aos indivíduos afetados com Mucopolissacaridose IV A, que até o momento são tratados paliativamente (Montaño et al., 2007). Essa determinação também se torna importante na distinção dos grupos de: indivíduos saudáveis, afetados e heterozigotos para MPS IV A, principalmente quando esta diferenciação exige o uso de estudos de biologia molecular da GALNS. O custo da análise molecular e o grande número de mutações a serem pesquisadas (Harmatz et al., 2013) inviabiliza a investigação do ponto de vista familiar e laboratorial, pois, na maioria das vezes, o diagnóstico da doença deve ser rápido e simples para o direcionamento ao início do tratamento.

Todas as nossas análises foram realizadas utilizando-se o substrato em pH 4,3 como indicado no protocolo desenvolvido por van Diggelen et al. (2013). Outros autores também justificam o uso de pHs similares em estudos com a GALNS: Khaliq et al. (2011) para espectrometria de massa em Tandem em SPF e Glossl et al. (1981) para experimento radioativo em fibroblastos. Mantivemos este pH, uma vez que a GALNS é uma hidrolase ácida e por

alguns autores ressaltarem que com o aumento do pH ocorre o decaimento da atividade dessa enzima (Bielicki e Hopwood, 1991; Masue et al., 1991).

Na determinação dos parâmetros de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ da GALNS realizada em amostras de leucócitos de indivíduos normais, o valor de K_m encontrado através do gráfico de Lineweaver-Burk foi de 7,16mM e a velocidade máxima de 77,3nmol/17h/mg de proteína. Nossos resultados são inéditos, não há dados na literatura para compará-los. São apresentados somente valores de K_m de GALNS purificada de placenta humana (8 μ M – Masue et al., 1991), amniócitos e vilosidade coriônica (5mM - Kleijer et al., 2000) e fibroblastos (5mM - Kleijer et al., 2000; 15 μ M - Glossl et al., 1981). Rivera-Cólon et al. (2012) em seus estudos da estrutura e propriedades da GALNS purificada de *Trichoplusia ni* encontrou, com o uso de substratos sintéticos, resultados de K_m com 4-MU-Gal-6S de 13 \pm 2mM e com 4-MU-S de 2,1 \pm 0,6mM e cita que o K_m de substratos naturais é de 0,05mM para QS e 0,01mM para C6S. Embora sejam células diferentes, o K_m encontrado em nosso trabalho aproxima-se daquele encontrado em amniócitos, vilosidades coriônicas e fibroblastos por Kleijer et al. (2000).

A técnica mais utilizada nos dias atuais e considerada como padrão ouro no diagnóstico para MPS IV A é aquela padronizada por van Diggelen et al. (1990) em leucócitos ou fibroblastos. Estes autores desenvolveram a técnica utilizando um substrato artificial fluorogênico com um radical metilumbeliferil que mimetiza o açúcar terminal sulfatado encontrado em substratos naturais facilitando a medida da fluorescência do produto (Rivera-Cólon et al., 2012). O grupo do Dr. van Diggelen, originário da Holanda (Department of Clinical Genetics, Erasmus University Medical Center, Rotterdam) purificam e

comercializam este substrato. Como se trata de uma purificação em pequena escala é difícil sua aquisição além do alto custo e dificuldades na importação.

De modo a diminuirmos a quantidade de substrato a ser utilizada nos ensaios, utilizamos uma concentração alternativa de acordo com a curva de substrato para a GALNS que estabelecemos e conforme relatos de outros autores (Fujisaki et al., 2013). A padronização da técnica de medida da atividade da enzima GALNS utilizando o substrato MU- β Gal-6S na concentração de 3mM teve correlação significativa com os resultados em 10mM. A concentração de 10mM foi 3,92 vezes maior do que aquela de 3mM e correspondeu à diminuição da concentração do substrato. van Diggelen et al. (1990) propõe que deve ser levado em consideração a economia do uso do substrato sem a perda de sensibilidade na técnica, e isto foi aqui demonstrado.

Uma concentração menor de substrato já foi utilizada no trabalho de Kleijer et al. (2000) no diagnóstico pré-natal de MPS IV A utilizando amostras de amniócitos e vilosidade coriônica. O substrato estava na concentração de 1,3mM abaixo do Km de 5mM citado no estudo. Porém esses autores relatam que para diferenciar heterozigotos com níveis baixos de atividade da GALNS nessas amostras, o substrato deve estar na concentração próxima de 5 a 10mM. Quando utilizado o substrato na concentração de 6,6mM obtiveram um acréscimo de 3 a 4 vezes no nível de atividade da enzima. Conforme Wood et al. (2013) utilizar maior concentração de substrato aumenta a sensibilidade da técnica. A técnica original descrita em 1990 por van Diggelen et al. utilizava o substrato na concentração de apenas 1mM e posteriormente foi adaptada para a determinação do protocolo do substrato por eles sintetizado para 10mM (van Diggelen et al, 2013).

A partir dos resultados obtidos com a concentração de substrato de 3mM, nossos demais experimentos seguiram com esta concentração.

O teste de termoestabilidade da GALNS em leucócitos de indivíduos normais realizada com pré-incubação em banho-maria por 30 minutos em 60°C, 70°C e 80°C nos mostrou que a temperatura de 60°C não inativou a atividade enzimática e a temperatura de 80°C inativou completamente quando comparados com a atividade considerada 100% (0°C de incubação).

A temperatura de 70°C foi escolhida para o estudo do efeito da temperatura. Nos tempos de 5, 10, 15, 20, 30 e 60 minutos de pré-incubação nesta temperatura foi possível acompanhar o decaimento da atividade enzimática com a inativação gradual da enzima. Comparando-se as atividades residuais da GALNS em leucócitos com a atividade da enzima a 0°C (100% de atividade) podemos observar que a mesma diminui a partir de 10 minutos, porém a atividade enzimática residual apenas foi significativamente menor a partir de 30 minutos de pré-incubação. Esta enzima parece ter uma termoestabilidade intermediária ou mais estável que outras hidrolases lisossômicas. O comportamento enzimático frente ao calor já foi descrito para outras enzimas em indivíduos normais. A beta-glicosidase (Michelin et al., 2005), a alfa-iduronidase (Mandelli et al., 2002) e a beta-galactosidase (Sopelsa et al., 2000) em leucócitos e a quitotriosidase em plasma (Wajner et al., 2004) já foram testadas e as atividades das enzimas de indivíduos normais decaem significativamente em momentos diferentes (1 minuto a 60°C, 15 minutos a 50°C, 20 minutos a 42°C e 25 minutos a 60°C, respectivamente).

É importante definir o comportamento da enzima em leucócitos de indivíduos saudáveis pelo estudo da termoestabilidade para comparar com

amostras de indivíduos afetados e heterozigotos que talvez não se comportem da mesma maneira. Como heterozigotos para a doença podem ter a atividade sobreposta à de indivíduos normais (Fukuda et al., 1992), este seria um bom parâmetro de distinção. Isto já foi demonstrado por outros autores para MPS I (Mandelli et al., 2002), GM1 (Coelho et al., 1999; Sopelsa et al., 2000) e doença de Gaucher (Wajner et al., 2004; Michelin et al., 2005).

Os valores de referências determinados para a atividade enzimática da GALNS de indivíduos normais e afetados com MPS IVA em leucócitos utilizando-se a concentração de substrato de 3mM foram de 11,0 a 101,4 e 0,1 a 0,2 nmol/17h/mg de proteína, respectivamente com um ponto de corte de 6,0 nmol/17h/mg de proteína. Não ocorreu sobreposição do valor das atividades entre indivíduos normais e afetados, demonstrando que é possível distingui-los com o uso da técnica em leucócitos utilizando o substrato na concentração de 3mM.

Resultados acima do ponto de corte são considerados normais, abaixo do ponto de corte são considerados indivíduos com deficiência enzimática da GALNS que devem ser investigados e abaixo de 0,2nmol/17h/mg de proteína pode-se considerar um individuo com MPS IV A. No protocolo desenvolvido pela Moscerdam substrates (van Diggelen et al., 2013) os valores de referência para amostras de leucócitos dos controles é de 40–70nmol/17h/mg (n=38) e dos pacientes com MPS IV A de 0–0,8nmol/17h/mg (n=7). Os resultados encontrados nesse estudo estão de acordo com a técnica original.

Um estudo de Laradi et al. (2006) demonstrou que pacientes com MPS IV A obtiveram resultado de 0,005 a 0,06nmol/h/mg de proteína de atividade em leucócitos, menos que 1% da média dos normais que foi de 1,2 a

4,6nmol/h/mg de proteína. Isso está de acordo com nossos resultados, pois aqui demonstramos que pacientes com MPS IV A apresentaram 0,5% da média dos normais variando de 1,3 a 0,15% do valor mínimo e máximo desses indivíduos.

Devido às diferenças encontradas nos tipos de amostras utilizadas e das adaptações de concentração de substrato e procedimento da técnica de medida da atividade da GALNS nos laboratórios, é importante que cada local de análise estabeleça seus próprios valores de referência com amostras de indivíduos saudáveis e afetados com MPS IV A.

A adaptação da técnica da medida da atividade enzimática da GALNS em leucócitos para SPF tem como finalidade à utilização deste material na triagem de indivíduos com suspeita de MPS IV A. Assim, o diagnóstico definitivo seria realizado somente naqueles indivíduos cuja atividade em SPF fosse abaixo da normalidade, pelo envio de sangue total para a separação de leucócitos. Isto poderia proporcionar o diagnóstico precoce da doença e direcionar os indivíduos afetados ao tratamento.

Outras MPS já têm sido triadas com técnicas fluorimétricas e uso de SPF: MPS I, II, IIIB, VI e VII (Chamoles et al., 2001; Civallero et al., 2006; Castilhos et al., 2014) com ótimos resultados.

Em nosso trabalho testamos a técnica fluorimétrica da medida de atividade enzimática da GALNS em picotes de 3mm de SPF com incubação de 48 horas proposta por Camelier et al. (2011). Esta técnica não pode ser reproduzida. Utilizando amostras de SPF de indivíduos normais, não foi obtido nenhum resultado de atividade enzimática acima de zero. Além disso, o tempo elevado para que a reação ocorra, quando comparada a outras técnicas para

doenças lisossômicas de depósito realizadas em amostras de SPF (Civallero et al., 2006; Castilhos et al., 2014) e à técnica original em leucócitos (van Diggelen et al., 1990) é uma desvantagem do método.

Como não foi possível realizar a técnica acima citada, resolvemos testar a atividade da GALNS em picote de 3mm de SPF previamente eluído incubando-se por 46h conforme Fujisaki et al. (2013). Os resultados obtidos foram mais uma vez abaixo de zero, porém amostras de leucócitos utilizadas como controle do ensaio obtiveram resultado de atividade enzimática normal. Isso nos mostra que o procedimento foi realizado corretamente e o substrato estava em perfeitas condições de uso.

Na tentativa de padronizar a técnica em SPF, modificamos as condições de tempo de incubação a partir da técnica original em leucócitos (van Diggelen et al., 1990). Os ensaios para a técnica em SPF, adaptada da técnica em leucócitos, foram realizados nos tempos da primeira incubação de 14, 17, 20, 25, 30, 35 e 48h para picotes de 3mm e nos tempos de 17 e 35h para picotes de 1,2mm. Em nenhum dos tempos testados ocorreu atividade enzimática suficiente para ser detectada.

O insucesso na adaptação da técnica de leucócitos para SPF pode ter sido causado pela menor quantidade de células presentes nesse tipo de amostra (Wood et al., 2013). Porém, Khaliq et al. (2011) e Duffey et al. (2010) obtiveram êxito quando outros substratos sintéticos para a medida da atividade da GALNS em SPF por espectrometria de massa em Tandem. Já Parkinson-Lawrence et al. (2007) obtiveram uma diferenciação clara de afetados e normais em ensaios de imunoquantificação da GALNS utilizando SPF.

Khaliq et al. (2011) utilizando um outro substrato, umbeliferil- β -D-galactose com um sulfato na posição 6, observaram no seu estudo que a atividade em SPF foi menor que o nível encontrado em amostras de sangue, e que a enzima foi estável em papel filtro por até um ano a -20°C , porém a 37°C a atividade diminuía em 50% após 3 dias. Nossos experimentos sempre foram realizados com amostras recém-coletadas, descartando a possível interferência da temperatura de armazenagem das amostras. Demais estudos devem ser realizados quanto a esse parâmetro.

Nos estudos de Chamoles et al. (2001) com enzimas lisossomais em SPF é relatado que não foi possível adaptar técnicas fluorimétricas para MPS III tipo A, B, C e D, e MPS IV A.

. Desenvolver técnicas fluorimétricas de diagnóstico de doenças lisossomais em amostras de SPF é de grande importância por se tratar de um método prático, de fácil execução e de baixo custo e o uso de amostras de SPF pode proporcionar a análise de mais de uma doença em um mesmo ensaio.

Amostras de SPF oferecem vantagens em relação a amostras de sangue total, como facilidade de transporte e armazenamento (uma vez que para investigação de deficiência de enzimas estáveis podem ser enviadas à temperatura ambiente), necessidade de volumes menores de reagentes utilizados na reação (levando a menos custos na análise), é uma metodologia adequada de coleta de amostras de recém-nascidos e pode ser utilizado na possível análise múltipla de testes de atividade enzimática em um único SPF (Chamoles et al., 2001; Castilhos et al., 2011; Lehman et al., 2011; Reuser et al. 2011; Daitx et al., 2012).

Técnicas em SPF não são realizadas para fins de diagnóstico, mas para orientá-lo, recomenda-se que um resultado positivo seja confirmado por testes de atividade da enzima em leucócitos ou fibroblastos cultivados (Lehman et al., 2011; Uribe e Giugliani, 2013). A utilização de sangue impregnado em papel filtro em triagem de recém-nascidos e populações de alto risco para MPS é útil por oferecer a identificação da doença e proporcionar o diagnóstico, intervenção e tratamento dos indivíduos afetados antes do surgimento de manifestações irreversíveis da doença (Coutinho et al., 2012; Lehman et al., 2011).

Infelizmente, a partir dos nossos protocolos, não foi possível desenvolver e padronizar uma técnica para medida da atividade da enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatase em SPF de modo a triarmos indivíduos com suspeita de MPS IV A.

Conclusões

1. Foi determinado o valor de K_m de 7,16mM e $V_{m\acute{a}x}$ de 77,3nmol/17h/mg de proteína da enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatase em leucócitos de indivíduos normais;
2. A técnica de medida da atividade enzimática da GALNS em leucócitos de indivíduos normais utilizando menor concentração de substrato foi adaptada utilizando-se MU- β Gal-6S 3mM obtendo uma correlação significativa com a técnica com substrato a 10mM;
3. A temperatura de 70°C causa a inativação gradual da atividade da GALNS em leucócitos de indivíduos normais com o passar do tempo;
4. Foram estabelecidos os valores de referência em leucócitos para indivíduos normais e indivíduos afetados com MPS IV A utilizando-se a técnica com substrato a 3mM de 11,0 a 101,4 e 0,1 a 0,2 nmol/17h/mg de proteína, respectivamente, com um ponto de corte de 6,0 nmol/17h/mg de proteína.
5. Não foi possível adaptar a técnica da medida da atividade da enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatase em leucócitos para ser utilizada em sangue impregnado em papel filtro.

Perspectivas

- Determinar K_m e $V_{m\acute{a}x}$ da enzima GALNS em amostras de leucócitos de indivíduos afetados com MPS IV A
- Aumentar o número de indivíduos afetados com MPS IV A na determinação dos valores de referência
- Realizar estudo de pH ótimo da enzima
- Desenvolver estudos de termoestabilidade em amostras de indivíduos heterozigotos e indivíduos afetados com MPS IV A
- Outras tentativas de análise em SPF

REFERÊNCIAS

ALMÉCIGA-DÍAZ, C. J.; RUEDA-PARAMO, M. A.; ESPEJO, A. J.; et al. Effect of elongation factor 1 α promoter and SUMF1 over in vitro expression of N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase. **Molecular biology reports**, v. 36, n. 7, p. 1863–1870, 2009.

ARMITAGE, P.; BERRY, G. **The planning of statistical investigations**. 2 ed. Oxford: Blackwell, 1987.

AURAY-BLAIS, C.; LAVOIE, P.; ZHANG, H.; et al. An improved method for glycosaminoglycan analysis by LC-MS/MS of urine samples collected on filter paper. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v.413, n.7-8, p.771–8, 2012.

BALLABIO, A.; GIESELMANN, V. Biochimica et Biophysica Acta Lysosomal disorders : From storage to cellular damage. **BBA - Molecular Cell Research**, v.1793, n.4, p.684–696, 2009.

BIELICKI, J.; HOPWOOD, J. J. Human liver N-acetylgalactosamine 6-sulphatase. Purification and characterization. **The Biochemical journal**, v. 279 p. 515–20, 1991.

CAMELIER, M. V; BURIN, M. G.; MARI, J. DE; et al. Practical and reliable enzyme test for the detection of mucopolysaccharidosis IVA (Morquio Syndrome type A) in dried blood samples. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 412, n. 19-20, p. 1805–8, 2011.

CASTILHOS, C. D. DE; MEZZALIRA, J.; GOLDIM, M. P. S.; COELHO, J. C. Influence of pre-analytical factors on α -galactosidase A, arylsulfatase B and α -glucosidase activities measured on dried blood spots on filter paper. **Clinical Biochemistry**, v. 44, n. 10–11, p. 922–926, 2011.

CASTILHOS, C. D.; MEZZALIRA, J.; GOLDIM, M. P. S.; et al. Determination of the lysosomal hydrolase activity in blood collected on filter paper, an alternative to screen high risk populations. **Gene**, v. 536, n. 2, p. 344–347, 2014.

CHAMOLES, N. A; BLANCO, M. B.; GAGGIOLI, D.; CASENTINI, C. Hurler-like phenotype: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. **Clinical chemistry**, v. 47, n. 12, p. 2098–102, 2001.

CHAMPE, Pamela C.; HARVEY Richard A.; FERRIER Denise R. **Bioquímica ilustrada**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. 534p. p. 155-162.

CIVALLERO, G.; MICHELIN, K.; MARI, J. DE; et al. Twelve different enzyme assays on dried-blood filter paper samples for detection of patients with selected inherited lysosomal storage diseases. **Clinica chimica acta**, v. 372, p. 98–102, 2006.

CLARKE, Joe T. R. **A clinical guide to inherited metabolic diseases**. Cambridge: Cambridge University Press: 3ªed. 2006. 338p. p. 1-13.

CLARKE, L. A; WINCHESTER, B.; GIUGLIANI, R.; TYLKI-SZYMAŃSKA, A.; AMARTINO, H. Biomarkers for the mucopolysaccharidoses: discovery and clinical utility. **Molecular genetics and metabolism**, v. 106, n. 4, p. 395–402, 2012.

COELHO, J. C.; SOPELSA, A. M. I.; TOBO, P. R.; et al. Biochemical studies on leukocyte and fibroblast human β -galactosidase. **Clinical Biochemistry**, v. 32, n. 3, p. 167–170, 1999.

COPPA, G. V.; BUZZEGA, D.; ZAMPINI, L.; et al. Agarose-gel electrophoresis for the diagnosis of mucopolysaccharidoses. **Clinical chemistry and laboratory medicine**, v. 50, n. 3, p. 589–92, 2012.

COUTINHO, M. F.; LACERDA, L.; ALVES, S. Glycosaminoglycan storage disorders: a review. **Biochemistry research international**, v. 2012, p. 471325, 2012.

DAITX, V. V.; MEZZALIRA, J.; GOLDIM, M. P. D. S.; COELHO, J. C. Comparison between alpha-galactosidase A activity in blood samples collected on filter paper, leukocytes and plasma. **Clinical biochemistry**, v. 45, n. 15, p. 1233–8, 2012. The Canadian Society of Clinical Chemists.

DE JONG, J. G. N.; WEVERS, R. A.; SAMBEEK, R. L. Measuring urinary glycosaminoglycans in the presence of protein: an improved screening procedure for mucopolysaccharidoses based on dimethylmethylene blue. **Clinical chemistry**, v.38, n.6 p. 803-807, 1992.

DUFFEY, T. A.; KHALIQ, T.; SCOTT, C. R.; TURECEK, F.; GELB, M. H. Design and synthesis of substrates for newborn screening of Maroteaux–Lamy and Morquio A syndromes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 20, p. 5994–5996, 2010.

FERNANDES, John et al. **Inborn metabolic diseases: diagnosis and treatment**. 4^a ed. Nova Iorque: Springer-Verlag, 2006, 561 p. 5-6 e 496.

FRAZIER, S.; ROODHOUSE, K. The quantification of glycosaminoglycans: a comparison of HPLC, carbazole, and alcian blue methods. **Open Glycoscience** p. 31–39, 2008.

FUJISAKI, M.; TAKAMURA, A.; DAIRAKU T.; OHASHI T.; IDA H.; ETO Y. Enzymatic screening in dried blood spots and gene analysis of Mucopolysaccharidosis IV A (MPS IV A) in Japanese. **Journal of Inherited Metabolic Disease** 12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, 2013, Barcelona, Spain. v.36 p.S261

FUTERMAN, Anthony H.; van MEER Gerrit. The cell biology of lysosomal storage disorders. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, p. 554-565, 2004.

FUKUDA, S.; TOMATSU, S.; MASUE, M.; et al. Mucopolysaccharidosis type IVA. N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase exonic point mutations in classical Morquio and mild cases. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 90, n. 3, p. 1049–1053, 1992.

GIUGLIANI, Roberto. Erros inatos do metabolismo: uma visão panorâmica. **Pediatria Moderna**, Porto Alegre, v.23 n.1 p. 29-40, fev. 1988.

GLOSSL, J.; MAROTEAUX, P.; NATALE, P. DI; et al. Different Properties of Residual N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase in fibroblasts from patients with mild and severe forms of Morquio disease type A. **Pediat Res.**, v. 15, p. 976–978, 1981.

HARMATZ, P.; MENGEL, K. E.; GIUGLIANI, R.; et al. The Morquio A Clinical Assessment Program: baseline results illustrating progressive, multisystemic clinical impairments in Morquio A subjects. **Molecular genetics and metabolism**, v. 109, n. 1, p. 54–61, 2013.

HENDRIKSZ, C. J.; HARMATZ, P.; BECK, M.; et al. Review of clinical presentation and diagnosis of mucopolysaccharidosis IVA. **Molecular genetics and metabolism**, v. 110, n. 1-2, p. 54–64, 2013.

KARAM, Simone de Menezes; SCHWARTZ, Ida Vanessa. D.; GIUGLIANI, Roberto, Introdução e aspectos clínicos. In: CARAKUSHANSKY, Gerson (Org). **Doenças genéticas em pediatria**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap 14, p.155-158.

KHALIQ, T.; SADILEK, M.; SCOTT, C. . R.; TURECEK, F.; GELB, M. H. Tandem mass spectrometry for the direct assay of lysosomal enzymes in dried blood spots: application to screening newborns for mucopolysaccharidosis I. **Clinical**, v. 57:1, p. 128–131, 2011.

KHEDHIRI, S.; CHKIOUA, L.; BOUZIDI, H.; et al. Mucopolysaccharidosis IVA within Tunisian patients: Confirmation of the two novel GALNS gene mutations. **Pathologie-biologie**, v. 60, n. 3, p. 190–2, 2012.

KLEIJER, W. J.; GEILEN, G. C.; GARRITSEN, V.; et al. First-trimester diagnosis of Morquio disease type A. **Prenatal diagnosis**, v. 20, n. 3, p. 183–5, 2000.

LAMPE, C.; BELLETTATO, C. M.; KARABUL, N.; SCARPA, M. Mucopolysaccharidoses and other lysosomal storage diseases. **Rheumatic diseases clinics of North America**, v. 39, n. 2, p. 431–55, 2013.

LARADI, S.; TUKEL, T.; KHEDIRI, S.; et al. Mucopolysaccharidosis type IV: N-acetylgalactosamine-6-sulfatase mutations in Tunisian patients. **Molecular genetics and metabolism**, v. 87, n. 3, p. 213–8, 2006.

LEHMAN, T. J. A; MILLER, N.; NORQUIST, B.; UNDERHILL, L.; KEUTZER, J. Diagnosis of the mucopolysaccharidoses. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 50 Suppl 5, p. v41–8, 2011.

LOWRY, Oliver H. et al. J, Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 193, p.265-275, 1951.

MABE, Paulina et al. Evaluation of reliability for urine mucopolysaccharidosis screening by dimethylmethylene blue and Berry spot tests. **Clinica Chimica Acta**, n. 345, p. 135-140, 2004.

MAK, Chloe Miu; LEE, Han-Chich Hencher, CHAN, Albert Yan-Wo Chan; LAM, Ching-Wan Inborn errors of metabolism and expanded newborn screening: review and update. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences** V.50, p.142-162, 2013.

MANDELLI, J.; WAJNER, A.; PIRES, R. F.; GIUGLIANI, R.; COELHO, J. C. Detection of Mucopolysaccharidosis Type I Heterozygotes Based on the Biochemical Characteristics of Leukocyte α -L-Iduronidase. **Archives of medical research**, 1. Jan. 2002.

MARTELL, L.; LAU, K.; MEI, M.; et al. Biomarker analysis of Morquio syndrome: identification of disease state and drug responsive markers. **Orphanet journal of rare diseases**, v. 6, n. 1, p. 84, 2011.

MARTIN, D. C.; ATMURI, V.; HEMMING, R. J.; et al. A mouse model of human mucopolysaccharidosis IX exhibits osteoarthritis. **Human molecular genetics**, v. 17, n. 13, p. 1904–15, 2008.

MARTINS, Ana Maria; MICHELETTI Cecília, D'ALMEIDA Vânia, FRANGIPANI Beatriz Jurkiewicz. Erros inatos do metabolismo: abordagem clínica. 2ª ed. São Paulo: **Informativo da Support - Advanced Medical Nutrition**, 2003. 35p.

MARTINS, Ana Maria et al. Mucopolissacaridoses. 2ª ed. São Paulo: **Instituto de genética e erros inatos do metabolismo**, 23p. p.3, 2007.

MASUE, M.; SUKEGAWA, K.; ORII, T.; HASHIMOTO, T. N-Acetylgalactosamine-6-Sulfate Purification and Characteristics1 Sulfatase in Human Placenta: N-Acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase activity is defective in patients with mucopolysac charidosis IV A (Morquio disease) Patients usually excr. **J Biochem**, v. 110, n. 6, p. 965–970, 1991.

MICHELIN, K.; WAJNER, A.; BOCK, H.; et al. Biochemical properties of β -glucosidase in leukocytes from patients and obligated heterozygotes for Gaucher disease carriers. **Clinica Chimica Acta**, v. 362, n. 1–2, p. 101–109, 2005.

MONTAÑO, A. M.; TOMATSU, S.; GOTTESMAN, G. S.; SMITH, M.; ORII, T. International Morquio A Registry: clinical manifestation and natural course of Morquio A disease. **Journal of inherited metabolic disease**, v. 30, n. 2, p. 165–174, 2007.

MUENZER, J. Overview of the mucopolysaccharidoses. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 50 Suppl 5, p. v4–12, 2011.

MUENZER, Joseph. The mucopolysaccharidoses: a heterogeneous group of disorders with variable pediatric presentations. **The journal of pediatrics**, North Carolina, n. 144, p. S27- S34, 2004.

NATOWICZ, M. R., Short, M. P., Wang, Y., Dickersin, G. R., Gebhardt, M. C., Rosenthal, D. I., Sims, K. B., Rosenberg, A. E. **Clinical and biochemical manifestations of hyaluronidase deficiency**. New Eng. J. Med. 335: 1029-1033, 1996.

NEUFELD, Elizabeth F.; MUENZER, Joseph. The mucopolysaccharidoses. In: SCRIVER, Charles R. et al. **The metabolic e molecular bases of inherited disease** 8ªed., 2001.

PAJARES, S.; ALCALDE, C.; COUCE, M. L.; et al. Molecular analysis of mucopolysaccharidosis IVA (Morquio A) in Spain. **Molecular genetics and metabolism**, v. 106, n. 2, p. 196–201, 2012.

PARKINSON-LAWRENCE, E. J.; MULLER, V. J.; HOPWOOD, J. J.; BROOKS, D. A. N-acetylgalactosamine-6-sulfatase protein detection in MPS IVA patient and unaffected control samples. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 377, n. 1-2, p. 88–91, 2007.

REGIER, D.; OETGEN, M.; TANPAIBOON, P. Mucopolysaccharidosis Type IVA. **Gene Reviews**, p. 1–21, 2013.

REUSER, Arnold J.; FRANS W. Verheijen; DEEKSHA Bali et al. The Use of Dried Blood Spot Samples in the Diagnosis of Lysosomal Storage Disorders — Current Status and Perspectives. **Molecular Genetics and Metabolism** v. 104 p.144–48. 2011.

RIVERA-COLÓN, Y.; SCHUTSKY, E. K.; KITA, A. Z.; GARMAN, S. C. The structure of human GALNS reveals the molecular basis for mucopolysaccharidosis IV A. **Journal of molecular biology**, v. 423, n. 5, p. 736–51, 2012.

SABATINI, David D.; ADESNIK, Milton B.; The Biogenesis of Membranes and Organelles Contributors In Scriver Charles R., Beaudet AL, Sly WS, Valle D (Eds.). **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**. 8^o ed. Montreal: MC Graw Hill, 2001. Cap.66 p. 3421-3452.

SCRIVER, C. R. Garrod's Croonian Lectures (1908) and the charter "Inborn Errors of Metabolism": albinism, alkaptonuria, cystinuria, and pentosuria at age 100 in 2008. **Journal of inherited metabolic disease**, v. 31, n. 5, p. 580–598, 2008.

SKOOG, W. A., BECK W.S. Studies on the fibrinogen, dextran and phytohemagglutinin methods of isolating leukocytes. **Blood**. Vol.11(5) p. 436-54. 1956.

SOPELSA, A. M. I.; SEVERINI, M. H. A.; SILVA, C. M. D. DA; et al. Characterization of β -galactosidase in leukocytes and fibroblasts of GM1 gangliosidosis heterozygotes compared to normal subjects. **Clinical Biochemistry**, v. 33, n. 2, p. 125–129, 2000.

SAUDUBRAY Jean-Marie and CHARPENTIER, Christiane; - Clinical Phenotypes: Diagnosis/Algorithms. In: Scriver Charles R., Beaudet AL, Sly WS, Valle D (Eds.). **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**. 8^o ed. Montreal: MC Graw Hill, 2001. Cap.66 p. 3421-3452.

TOMATSU, S.; OKAMURA, K.; TAKETANI, T.; et al. Development and testing of new screening method for keratan sulfate in mucopolysaccharidosis IVA. **Pediatric research**, v. 55, n. 4, p. 592–7, 2004.

TOMATSU, S.; GUTIERREZ, M.; NISHIOKA, T.; et al. Development of MPS IVA mouse (Galntm(hC79S.mC76S)slu) tolerant to human N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase. **Human molecular genetics**, v. 14, n. 22, p. 3321–35, 2005.

TOMATSU, S.; MONTAÑO, A. M.; OIKAWA, H.; et al. Mucopolysaccharidosis Type IVA (Morquio A Disease): Clinical Review and Current Treatment: A Special Review. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, p. 931–945, 2011.

TOMATSU, S.; FUJII, T.; FUKUSHI, M.; et al. Newborn screening and diagnosis of mucopolysaccharidoses. **Molecular genetics and metabolism**, v. 110, n. 1-2, p. 42–53, 2013.

URIBE, A.; GIUGLIANI, R. Selective Screening for Lysosomal Storage Diseases with Dried Blood Spots Collected on Filter Paper in 4 , 700 High-Risk Colombian Subjects. **Journal of Inherited Metabolic Disease** n. 18, 2013.

VAN DIGGELEN, O. P.; ZHAO, H.; KLEIJER, W. J.; et al. A fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of Morquio disease type A (MPS IV A). **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 187, n. 2, p. 131–9, 1990.

VAN DIGGELEN, O.P. et al. Laboratory Protocol for enzyme analysis for Morquio A disease (MPS IV A) M4A, Moscerdam Substrates, (Department of Clinical Genetics, Erasmus University Medical Center, Rotterdam) Holanda, 2013.

WAJNER, A.; MICHELIN, K.; BURIN, M. G.; et al. Biochemical characterization of chitotriosidase enzyme: comparison between normal individuals and patients with Gaucher and with Niemann-Pick diseases. **Clinical biochemistry**, v. 37, n. 10, p. 893–7, 2004.

WENGER D.A; COPPOLA L. S; Insights Into the Diagnosis and Treatment of Lysosomal Storage Diseases. **Archives of Neurology**. v.60 p.322-328, 2003.

WHITLEY, C. B.; SPIELMANN, R. C.; HERRO, G.; TERAGAWA, S. S. Urinary glycosaminoglycan excretion quantified by an automated semimicro method in specimens conveniently transported from around the globe. **Molecular genetics and metabolism**, v. 75, n. 1, p. 56–64, 2002.

WOOD, T. C.; HARVEY, K.; BECK, M.; et al. Diagnosing mucopolysaccharidosis IVA. **Journal of inherited metabolic disease**, v. 36, n. 2, p. 293–307, 2013.

Lista de Tabelas

Tabela 1: Classificação das Mucopolissacaridoses.....18

Tabela 2: Resumo da técnica de medida da atividade da GALNS.....36

Tabela 3: Atividade da enzima GALNS em leucócitos de indivíduos normais e afetados com MPS IV A utilizando a concentração de substrato de 3mM.....44

Lista de Figuras

- Figura 1: Curva de substrato (Michaelis-Menten) da GALNS: efeito de diferentes concentrações do substrato MU- β Gal-6S.....39
- Figura 2: Determinação do Km e da Velocidade Máxima ($V_{m\acute{a}x}$) da GALNS em leucócitos de indivíduos normais (Lieneweaver-Burk).....39
- Figura 3: Correlação entre a medida da atividade enzimática da GALNS com substrato MU- β Gal-6S na concentração de 3mM e 10mM.....41
- Figura 4: Curva de temperatura de inativação da enzima GALNS em leucócitos de indivíduos normais após 30 minutos de pré-incubação.....42
- Figura 5: Termoestabilidade da enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatase em leucócitos de indivíduos normais.....43
- Figura 6: Atividade da GALNS em leucócitos de indivíduos normais e afetados com MPS IV A.....45
- Figura 7: Atividade da GALNS em leucócitos e SPF segundo técnica de Camelier et al. (2011).....46
- Figura 8: Atividade da GALNS em leucócitos e SPF segundo técnica de Fujisaki et al. (2013).....47