

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

**ESTUDO DAS PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS DA ENZIMA ALFA-
GLICOSIDASE ÁCIDA DE PACIENTES COM DOENÇA DE POMPE EM
DIFERENTES AMOSTRAS BIOLÓGICAS: COMPARAÇÃO COM A ENZIMA DE
INDIVÍDUOS NORMAIS**

JAMILA MEZZALIRA

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

**ESTUDO DAS PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS DA ENZIMA ALFA-
GLICOSIDASE ÁCIDA DE PACIENTES COM DOENÇA DE POMPE EM
DIFERENTES AMOSTRAS BIOLÓGICAS: COMPARAÇÃO COM A ENZIMA DE
INDIVÍDUOS NORMAIS**

JAMILA MEZZALIRA

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

Orientadora
Prof^a Dr^a Janice Carneiro Coelho

Porto Alegre
2014

CIP - Catalogação na Publicação

Mezzalira, Jamila

Estudo das propriedades bioquímicas da enzima alfa-glicosidase ácida de pacientes com Doença de Pompe em diferentes amostras biológicas: comparação com a enzima de indivíduos normais / Jamila Mezzalira. -- 2014.

96 f.

Orientadora: Janice Carneiro Coelho.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Doença de Pompe. 2. Alfa-glicosidase ácida. 3. Sangue Impregnado em Papel Filtro. 4. Leucócitos. 5. Caracterização Bioquímica. I. Carneiro Coelho, Janice, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Clovis e Clari, e à minha irmã, Alessandra, pela confiança, apoio, compreensão e incentivo. Por acreditarem no meu potencial e oportunizarem meu crescimento pessoal e profissional.

À Janice, minha orientadora, pela amizade, dedicação, compreensão, apoio e ensinamentos transmitidos neste trabalho. Pelo exemplo como pesquisadora, professora e amiga em quaisquer que sejam as circunstâncias e tornar tudo mais simples e prático.

À Vanessa Daitx, minha grande amiga, pela ajuda, apoio, disponibilidade em todas as etapas da realização deste trabalho; dos estudos para a prova de seleção, idas ao banco de sangue, discussões dos resultados. Pelo companheirismo e exemplo de dedicação e amizade.

Às minhas amigas-colegas, Ana Carolina Breier e Jaqueline Cé, pela constante ajuda, disponibilidade, amizade, compreensão e companheirismo. Por tornarem o dia-a-dia mais divertido.

Aos bolsistas IC, Dácio e Vitória, pela disponibilidade e ajuda; e aos demais colegas do Grupo DLD-Lab25 pela amizade, pelos “chimas” diários e momentos de descontração.

Aos membros da banca, Dr. Alexandre Silva de Mello, Dra. Fernanda Scalco e Dra. Regina Guaragna, por aceitarem o convite para avaliação deste trabalho.

Ao Serviço de Hemoterapia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, à Associação Carioca dos Portadores de Distrofia Muscular (ACADIM), médicos e outros profissionais da saúde pela colaboração e fornecimento das amostras utilizadas no presente estudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, ao Departamento de Bioquímica e a Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

PARTE I _____	6
RESUMO _____	6
ABSTRACT _____	7
LISTA DE ABREVIATURAS _____	8
1. INTRODUÇÃO _____	9
1.1 Erros Inatos do Metabolismo _____	9
1.2 Lisossomos e Hidrolases Lisossômicas _____	10
1.3 Doenças Lisossômicas de Depósito _____	11
1.3.1 Diagnóstico das Doenças Lisossômicas de Depósito _____	12
1.3.2 Tratamento Doenças Lisossômicas de Depósito _____	14
1.4 Doenças de Armazenamento do Glicogênio _____	14
1.5 Doença de Pompe _____	15
1.5.1 Diagnóstico da Doença de Pompe _____	17
1.5.2 Tratamento Doença de Pompe _____	18
1.5.3 Acarbose _____	19
2. OBJETIVOS _____	20
2.1 Objetivo Geral _____	20
2.2 Objetivos Específicos _____	20
PARTE II _____	21
3. RESULTADOS _____	21
3.1 CAPÍTULO I – Artigo Científico I _____	21
3.2 CAPÍTULO II – Artigo Científico II _____	48
PARTE III _____	73
4. DISCUSSÃO _____	73
5. CONCLUSÕES _____	84
6. REFERÊNCIAS _____	85
7. ANEXOS _____	92
7.1 Parecer Consubstanciado Emitido pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul _____	92
7.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Único _____	93
7.3 Termo de Concordância Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) _____	95
7.4 Termo de Concordância Associação Carioca dos Portadores de Distrofia Muscular (ACADIM) _____	96

PARTE I

RESUMO

A Doença de Pompe (DP), também conhecida como Doença de Armazenamento do Glicogênio Tipo II, é uma doença lisossômica de depósito (DLD) causada pela deficiência da enzima α -glicosidase ácida (GAA). A GAA catalisa a clivagem das ligações glicosídicas α -1,4 e α -1,6 da molécula de glicogênio, e sua deficiência gera um acúmulo intralissossomal de glicogênio em vários tecidos. Esse acúmulo é expressivo no tecido muscular, e com isso surge o aparecimento dos sintomas clínicos. Clinicamente, a DP manifesta-se através de um amplo espectro de fenótipos, que apresentam em comum a ocorrência de fraqueza muscular progressiva. O diagnóstico da DP é realizado através da medida da atividade enzimática em células sanguíneas e tecidos ou por análise da mutação gênica. O padrão-ouro para o diagnóstico é a medida da atividade da GAA em amostras de fibroblastos e, embora este tipo de diagnóstico seja definitivo, amostras de sangue também estão sendo utilizadas. A medida da atividade das enzimas lisossomais vem sendo atualmente realizada em amostras de sangue impregnado em papel filtro (SPF) como método de triagem neonatal e de populações de alto risco. Sabendo que a Terapia de Reposição Enzimática para DP já está disponível e melhora a sobrevida dos pacientes, o diagnóstico precoce da DP é essencial, deve ser adequado e de fácil acesso para que o tratamento inicie cedo e seja mais eficaz. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar algumas características bioquímicas e cinéticas da enzima em amostras de leucócitos totais e SPF de modo a observar as diferenças quanto ao seu comportamento, entre controles e pacientes, estabelecer valores de coeficientes de variação para as técnicas e observar o efeito do uso de diferentes concentrações do inibidor acarbose. A GAA de pacientes com DP mostrou um comportamento diferente do observado em controles saudáveis em termos dos parâmetros analisados (K_m , V_{max} , estabilidade térmica), em leucócitos totais. Em SPF, GAA mostrou um comportamento diferente do observado nos controles saudáveis em termos de pH ótimo e estabilidade térmica; e valores de K_m e V_{max} para GAA foram estabelecidos somente em SPF de controles saudáveis. O uso do inibidor acarbose é essencial para a análise enzimática da GAA em amostras de leucócitos totais e SPF por inibir seletivamente a isoenzima MGA e assim, garantir o diagnóstico da DP. Os valores de coeficiente de variação estabelecidos para as técnicas em leucócitos e SPF estão dentro do aceitável e expressam boa precisão e reprodutibilidade das técnicas. A técnica fluorimétrica usando o substrato 4-Metilumbeliferil- α -D-glicopiranosídeo em leucócitos é confiável podendo ser utilizada para diagnóstico definitivo e padrão da Doença de Pompe; em SPF, pode contribuir para melhorar a triagem desta doença, diferenciando pacientes com DP de indivíduos normais, tornando o processo de investigação e diagnóstico mais preciso e confiável.

ABSTRACT

Pompe disease (PD), also known as Glycogen Storage Disease Type II, is a lysosomal storage disorder (LSD) caused by the deficiency of the acid α -glucosidase enzyme (GAA). GAA catalyzes the cleavage of the glycosidic bonds α -1,4 and α -1,6 of the glycogen molecule, and when GAA activity is deficient glycogen accumulates intralysosomally in several tissues. This accumulation is significant in muscle tissue, which leads to the onset of clinical symptoms. Clinically, PD is manifested through a wide espectro phenotypes, which have in common the occurrence of progressive muscle weakness. PD is diagnosed by measuring GAA activity in blood cells and tissues or by gene mutation analysis. The gold standard for diagnosis is the measurement of GAA activity in fibroblast samples and although this diagnosis is definitive, blood samples are also being used. Lysosomal enzyme activity currently has been measured in dried blood spot (DBS) samples as a method for screening newborns and high-risk populations. Since enzyme replacement therapy is already available for PD and improves patient life expectancy, the early PD diagnosis is crucial and must be appropriate and easily available so that the treatment can be initiated early and be more effective. Thus, this study aimed to evaluate some biochemical and kinetic characteristics of the enzyme in samples of total leukocytes and DBS in order to observe the differences in behavior between controls and patients, establish values of coefficients of variation for the techniques and observe the effect of using different concentrations of inhibitor acarbose. GAA from PD patients showed a different behavior from that observed in healthy controls in terms of the analyzed parameters (K_m , V_{max} , thermal stability) in total leukocytes. In DBS, GAA showed a different behavior from that observed in healthy controls in terms of optimum pH and thermal stability. K_m and V_{max} values for GAA were established only in DBS healthy controls. The use of acarbose inhibitor is essential for enzymatic analysis of GAA in total leukocyte and DBS samples for selectively inhibiting MGA isozyme and thereby secures the diagnosis of PD. The coefficients of variation values established for techniques in leukocytes and DBS are acceptable, precise, and can be appropriately reproduced. The fluorimetric technique using 4-methylumbelliferyl- α -D-glucopyranoside substrate in leukocytes is reliable and can be used for definitive diagnosis of Pompe disease; in DBS, can help to improve the screening of this disease, differentiating PD patients from normal individuals, making the research process and more accurate and reliable diagnosis.

LISTA DE ABREVIATURAS

CV – Coeficiente de Variação

DLDs – Doenças Lisossômicas de Depósito

DP – Doença de Pompe

EIM – Erros Inatos do Metabolismo

FDA – Food and Drug Administration

GAA – Alfa Glicosidase ácida

GSD II – Doença de Armazenamento do Glicogênio Tipo II

Km – Constante de Michaelis

MGA – Maltase Glico Amilase

MUG - Methylumbelliferyl- α -D-glucoopyranoside

SPF – Sangue Impregnado em Papel Filtro

TC – Timidina Cinase

TRE – Terapia de Reposição Enzimática

V_{máx} – Velocidade Máxima

1. INTRODUÇÃO

1.1 Erros Inatos do Metabolismo

Os Erros Inatos do Metabolismo (EIM) compreendem um grupo fenotipicamente e genotipicamente heterogêneo de doenças hereditárias, causadas por um defeito/alteração em uma via metabólica. Essas alterações ocorrem devido à deficiência ou falta da atividade de uma ou mais enzimas específicas ou do defeito de uma proteína de transporte, e resultam em um bloqueio das vias metabólicas, ocorrendo um acúmulo de substratos ou desvios para uma rota alternativa - podendo acumular produtos tóxicos (Ellaway *et al.*, 2002; Mak *et al.*, 2013).

Inicialmente, os EIM foram descritos por Sir Archibald Garrod quando estudava quatro doenças: alcaptonúria, cistinúria, pentosúria e albinismo. Eram considerados desordens que refletiam uma herança Mendelina na população humana e exemplos de individualidade bioquímica. Em 1902, Garrod não utilizou o termo “erro inato” para essas doenças, mas preferiu “alternativa metabólica”, as quais foram definidas como uma variação bioquímica rara, hereditária, recessiva e vitalícia. Todas elas ocorrendo devido a um bloqueio numa via enzimática, secundária à perda da atividade de uma enzima. (Childs *et al.*, 2013)

Do ponto de vista fisiopatológico, os EIM podem ser classificados em três grupos: (1) desordens que levam a intoxicação – incluem EIM intermediário que levam a intoxicação aguda ou progressiva pelo acúmulo de compostos tóxicos próximos ao bloqueio metabólico; (2) desordens do metabolismo energético – desordens com sintomas decorrentes à produção de energia ou na sua utilização por diversos órgãos, podendo ser dividido em defeitos energéticos citoplasmáticos e mitocondriais; e, (3) desordens envolvendo moléculas complexas – incluem doenças

que alteram a síntese ou o catabolismo de moléculas complexas (todas as desordens lisossomais pertencem a este grupo) (Saudubray *et al.*, 2006).

Os EIM são individualmente raros, mas coletivamente numerosos. A maioria dos EIM apresenta um padrão de herança autossômica recessiva ou recessiva ligada ao cromossomo X e, raramente tem herança autossômica dominante ou mitocondrial (Ellaway *et al.*, 2002).

Atualmente, mais de 1000 EIM já foram identificados e a incidência estimada demonstra ser mais de 1 em 800 indivíduos (Mak *et al.*, 2013).

1.2 Lisossomos e Hidrolases Lisossômicas

Os lisossomos são organelas intracelulares de digestão cercados por uma única membrana que impede a liberação de suas enzimas digestivas para o citosol. A função do lisossomo é importante para a degradação de macromoléculas e homeostase da célula, mas esta organela também tem um papel nos processos de fagocitose e apresentação de antígeno, que são necessárias para a regulação da inflamação e do controle da auto-imunidade. O sistema lisossomo-endossomo está intimamente envolvido na regulação da autofagia, apoptose e morte celular via transdução de sinal e exocitose, assim como na reciclagem de receptores para a regulação da neurotransmissão (Boustany *et al.*, 2013; Lieberman *et al.*, 2013).

O acúmulo de material de depósito lisossômico, não só altera a sua funcionalidade, mas também tem um impacto em toda a funcionalidade da célula. A disfunção resultante provoca deterioração progressiva multissistêmica física e/ou neurológica e, se não diagnosticada e tratada pode levar à morte (Lampe *et al.*, 2013).

Os lisossomos contêm cerca de 40 enzimas hidrolíticas, incluindo proteases nucleases, glicosidases, lípases, fosfolípases, fosfatases e sulfatases. Estas

enzimas são todas hidrolases ácidas, enzimas que clivam ligações através da adição de água. Muitos dos produtos de digestão lisossomal retornam para o citosol. Portanto, os lisossomos são envolvidos em reciclagem de compostos (Lieberman *et al.*, 2013; Alberts *et al.*, 2010).

Para uma ótima atividade, as hidrolases precisam ser ativadas por clivagem proteolítica e requerem um ambiente ácido, o qual é fornecido pelos lisossomos que mantêm um pH em torno de 4,5 a 5,0 em seu interior, principalmente pelo bombeamento de prótons através de ATPases vesiculares (Lieberman *et al.*, 2013; Alberts *et al.*, 2010).

1.3 Doenças Lisossômicas de Depósito

As Doenças Lisossômicas de Depósito (DLDs) são um grupo heterogêneo de mais de 50 EIM causados por mutações em genes que codificam enzimas ou outras proteínas envolvidas na degradação lisossomal de metabólitos intermediários, acarretando ausência ou deficiência de uma ou mais enzimas responsáveis pela degradação ou reciclagem de macromoléculas. O acúmulo progressivo destas moléculas no interior dos lisossomos pode levar à destruição celular e causar disfunção do tecido ou órgão, provocando deterioração física multissistêmica progressiva e neurológica. Se não diagnosticada e tratada pode levar a óbito (Boustany *et al.*, 2013; Brand *et al.*, 2013; Lampe *et al.*, 2013).

Geralmente, as DLDs apresentam uma expressão variável de fenótipos dependendo da macromolécula (substrato) específico acumulado, do local de produção e degradação de metabólitos específicos, da expressão enzimática residual e da genética do paciente. Todas as DLDs mostram um amplo espectro de heterogeneidade, sem correlação entre genótipo e fenótipo ou curso da doença e atividade enzimática residual. A gravidade está relacionada ao aparecimento da

doença e, em geral, três fenótipos são conhecidos: severo (principalmente infantil), intermediário e atenuado (jovens e adultos) (Lampe *et al.*, 2013).

As manifestações clínicas, nestas doenças, podem variar de leve a grave e os sintomas podem aparecer de forma precoce e progredir de forma rápida (Adam *et al.*, 2011). Os sinais e sintomas de cada DLD devem-se ao tipo de substrato acumulado nos lisossomos, ao órgão afetado e à resposta do organismo (Nakamura *et al.*, 2011). Dentre os sintomas, tem-se um amplo espectro de anormalidades esqueléticas, comprometimento do sistema nervoso, disfunções orgânicas e acúmulo de lipídios complexos nos tecidos (Scriver, 2001). Também outros fatores podem impedir ou diminuir a atividade dessas enzimas, como deficiências de proteínas ativadoras, proteínas de transporte ou outra enzima necessária para o correto processamento do substrato acumulado (Wenger *et al.*, 2003).

Na sua maioria, são de herança autossômica recessiva, com exceção de algumas que são ligadas ao cromossomo X, como a Doença de Fabry, Doença de Danon e da Doença de Hunter (Mucopolissacaridose Tipo II). As DLDs possuem uma prevalência combinada de 1:7000~1:8000 nascidos vivos (Wilcox *et al.*, 2004; Boustany *et al.*, 2013; Brand *et al.*, 2013).

As DLDs são classificadas de acordo com o material de depósito acumulado, com a proteína deficiente ou ambos (Wilcox *et al.*, 2004). De acordo com a principal substância acumulada, as DLDs dividem-se em cinco grupos: esfingolipidoses, mucopolissacaridoses, glicoproteinosos, glicolipidoses e outras DLDs. A Doença de Pompe pertence ao grupo das glicogenoses (Castilhos, 2011a).

1.3.1 Diagnóstico das Doenças Lisossômicas de Depósito

Inicialmente, para o diagnóstico de uma DLD, deve ter-se a suspeita da doença levando-se em consideração os sintomas clínicos do paciente. A partir disto,

o diagnóstico específico pode ser confirmado através de testes bioquímicos e/ou moleculares (Pastores *et al.*, 2013). A grande variedade de sintomas e a semelhança destes entre as diferentes DLDs fazem com que o diagnóstico de uma DLD seja demorado necessitando o acompanhamento de um médico especializado (Staretz-Chacham *et al.*, 2009).

O diagnóstico das DLDs pode ser estabelecido através de análises bioquímicas e moleculares. As análises bioquímicas iniciam buscando identificar metabólitos em excesso e posteriormente, a identificação de enzimas deficientes. A medida da atividade enzimática é a forma de diagnóstico bioquímico específico das DLDs e pode ser realizado em amostras de plasma, leucócitos e/ou fibroblastos. Para análise molecular, é necessário buscar mutações específicas, quando presentes ou mesmo realizar todo o sequenciamento do gene (Staretz-Chacham *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011; Castilhos, 2011a).

Amostras de sangue impregnado em papel filtro (SPF) estão sendo utilizadas como método de triagem para DLDs conforme demonstrado por alguns pesquisadores (Chamoles *et al.*, 2004; Civallero *et al.*, 2006; Gasparotto *et al.*, 2009; Goldim *et al.*, 2012; Castilhos *et al.*, 2014), mas não como diagnóstico final pois seus resultados são baseados na medida da atividade enzimática total e não na medida da atividade enzimática específica (que leva em conta a concentração da amostra) como é realizado para amostras de leucócitos e fibroblastos.

O uso do SPF como método de triagem possui algumas vantagens quando comparado a outros materiais biológicos, como: facilidade no transporte das amostras, podendo ser enviado via correio em envelope convencional, sem necessidade de refrigeração (Rodrigues *et al.*, 2009); fácil armazenagem das amostras, com atividade preservada até seis meses a temperatura ambiente e

durante dois anos a 4°C (Gasparotto *et al.*, 2009; Castilhos *et al.*, 2011b, 2011c); menor volume de reação, economizando reagentes e quantidade de amostra, se tornando mais barato que o uso de leucócitos, plasma ou fibroblastos (Civallero *et al.*, 2006); e, segurança na manipulação das amostras, pois se trabalha com material seco e não líquido, diminuindo a contaminação por agentes patogênicos como HIV e Hepatite B (Rodrigues *et al.*, 2009).

1.3.2 Tratamento Doenças Lisossômicas de Depósito

Devido à grande abrangência médica e psicossocial, o tratamento das DLDs deve ser acompanhado por uma equipe multiprofissional. Quando o diagnóstico é estabelecido, o aconselhamento genético é essencial e deve ser oferecido às famílias e pacientes para melhor compreensão da doença, identificar riscos em outros membros da família e discutir riscos de recorrência. Grupos de apoio, de pais e pacientes, são fontes essenciais de apoio emocional (Pastores *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2011).

Além de tratamento médico convencional (paliativo) para alívio dos sintomas, existem tratamentos específicos para cada DLD, como transplante de medula óssea, inibidores da síntese de substrato, terapia com chaperonas, terapia gênica e terapia de reposição enzimática (TRE) (Pastores *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2011; Wenger *et al.*, 2003).

1.4 Doenças de Armazenamento do Glicogênio

A glicose é a fonte primária de energia para a maioria das células de mamíferos. Assim, é vantagem para o indivíduo ser capaz de tirar o excesso de glicose da corrente sanguínea e armazená-la na forma de macromoléculas para uso futuro. O glicogênio é a forma de armazenamento da glicose em praticamente todas

as células animais e, é mais abundante no fígado e no músculo (Nelson e Cox, 2011; Chen *et al.*, 2013).

As doenças de armazenamento de glicogênio são deficiências genéticas, que afetam o metabolismo do glicogênio e resultam no armazenamento de quantidades e/ou formas anormais do mesmo. Algumas deficiências afetam apenas um tecido, outros podem afetar vários tecidos (Chen *et al.*, 2013).

As doenças de armazenamento de glicogênio, que afetam principalmente o músculo, podem ser divididas em dois grupos. O primeiro grupo é caracterizado por fraqueza muscular e atrofia progressiva e/ou cardiomiopatia, e é representado por uma deficiência da enzima lisossômica α -glicosidase ácida: doença de armazenamento de glicogênio tipo II (Doença de Pompe). O segundo grupo é um distúrbio músculo-energia, caracterizado por dor muscular, intolerância ao exercício, mioglobiúria, e suscetibilidade à fadiga. Este grupo inclui a deficiência de miofosforilase (Doença de McArdle Tipo IV) e deficiências na fosfofrutocinase (tipo VII), lactado desidrogenase, entre outras (Chen *et al.*, 2013).

As diferentes formas de doença de armazenamento de glicogênio foram classificadas por número de acordo com a ordem cronológica em que foram identificados esses defeitos enzimáticos (Chen *et al.*, 2013).

1.5 Doença de Pompe

A Doença de Pompe (DP), também conhecida como Doença de Armazenamento de Glicogênio Tipo II (GSDII), é uma DLD de herança autossômica recessiva causada pela deficiência da enzima α -glicosidase ácida (GAA). A GAA (EC 3.2.1.20) é uma hidrolase lisossômica que catalisa a clivagem das ligações glicosídicas α -1,4 e α -1,6 da molécula de glicogênio. O gene que codifica a GAA

está localizado na porção terminal do braço longo do cromossomo 17 (17q25.2-q25.3) e está ligado ao locus da timidina cinase (TC). Quando sua atividade é deficiente, devido a mutações presentes no gene que codifica essa enzima, ocorre um acúmulo de glicogênio nos lisossomos de vários tecidos. Esse acúmulo é expressivo no tecido muscular, e com isso surge o aparecimento dos sintomas clínicos (Hirschhorn e Reuser, 2013; Raben *et al.*, 2002).

A incidência da DP é variável de acordo com a etnia e a região geográfica. É estimada em 1:40.000 nascidos vivos e apresenta um amplo espectro de fenótipos clínicos. São conhecidas mais de 200 mutações no gene da GAA que influenciam os fenótipos da doença (Winchester *et al.*, 2008, Lukacs *et al.*, 2010; Chien *et al.*, 2013).

Clinicamente, a Doença de Pompe manifesta-se através de um amplo espectro de fenótipos, que apresentam em comum a ocorrência de fraqueza muscular progressiva. Além do músculo esquelético, outros tecidos e órgãos podem ser acometidos, como coração, fígado e musculatura lisa. Os fenótipos são classificados de acordo com a idade de início dos sintomas (Chien *et al.*, 2013; Hirschhorn e Reuser, 2013; American Association of Neuromuscular & Eletrodiagnostic Medicine, 2009; Kishnani *et al.*, 2006).

Historicamente, os pacientes tem sido classificados com base na idade de início dos sintomas, na extensão de envolvimento dos órgãos e taxa de progressão para a morte, em vários subtipos: início clássico infantil, não-clássico infantil, infanto-juvenil e adulto. No entanto, como o espectro da doença apresenta superposição entre os subtipos, a mesma deve ser melhor caracterizada com base na idade do início dos primeiros sintomas e pela presença ou ausência de cardiomiopatia, em: forma de início precoce, manifestando-se nos primeiros meses

de vida e, forma tardia, que se inicia a qualquer momento após o primeiro ano de vida (Hirschhorn e Reuser, 2013; Weida *et al.*, 2012; Kishnani *et al.*, 2006).

A forma de início precoce manifesta-se através de fraqueza muscular progressiva, hipotonia, insuficiência ventilatória, cardiomiopatia hipertrófica entre outras organomegalias. É caracterizada por um curso rapidamente progressivo e fatal. Nesses pacientes a atividade da GAA está virtualmente ausente (Hirschhorn e Reuser, 2013; Winchester *et al.*, 2008; Kishnani *et al.*, 2006)..

A forma de início tardio manifesta-se através de fraqueza muscular progressiva, com pouco ou nenhum envolvimento cardíaco. Nesses pacientes, a evolução é mais heterogênea, com variação na clínica e progressão da doença, e apresenta atividade residual da GAA (Hirschhorn e Reuser, 2013; Winchester *et al.*, 2008; Kishnani *et al.*, 2006).

1.5.1 Diagnóstico da Doença de Pompe

O diagnóstico para DP é realizado através da medida da atividade da GAA usando o substrato sintético fluorimétrico 4-metilumbeliferil- α -D-glicopiranosídeo (4-MUG) em células sanguíneas e tecidos ou, por análise da mutação gênica. No entanto, outras isoenzimas da alfa-glicosidase, presentes nas células sanguíneas, principalmente a maltase glicoamilase (MGA) podem contribuir para um aumento da atividade residual observada (Hirschhorn e Reuser, 2013; Chien *et al.*, 2013; Weida *et al.*, 2012; Kallwass *et al.*, 2007; Chamoles *et al.*, 2004).

Para minimizar essa atividade residual e medir a atividade da GAA com precisão, uma separação de linfócitos adequada, o uso de fibroblastos, anticorpos imobilizadores e inibidores da MGA podem ser utilizados. O uso de leucócitos totais vem sendo proposto como “padrão ouro” para o diagnóstico, com o uso da acarbose como inibidor da MGA (Chien *et al.*, 2013; Chamoles *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004).

Fibroblastos não contém a enzima MGA (Chamoles *et al.*, 2004) e, por isso, são usados como diagnóstico confirmatório para DP e considerados “padrão ouro” para a determinação da atividade residual da GAA (Hirschhorn e Reuser, 2013; Kallwass *et al.*, 2007).

Embora o diagnóstico seja baseado em técnicas específicas, a medida da atividade das enzimas lisossomais é realizada de forma direta em amostras de sangue impregnado em papel filtro, como método de triagem para DP (Chamoles *et al.* 2004; Civallero *et al.*, 2006; Shigueto *et al.*, 2011; Chiang *et al.*, 2012; Spada *et al.*, 2013).

O diagnóstico precoce da DP é essencial para que os tratamentos em desenvolvimento sejam mais eficazes, visto que a Terapia de Reposição Enzimática (TRE) já está disponível (Myozyme® e Lumizyme®; Genzyme Corporation, Cambridge, MA, EUA) (Winchester *et al.*, 2008; Shigueto *et al.*, 2011; Chien *et al.*, 2013).

1.5.2 Tratamento Doença de Pompe

O tratamento disponível para a deficiência enzimática encontrada na Doença de Pompe é a Terapia de Reposição Enzimática usando GAA recombinante. A proteína GAA recombinante tem sido desenvolvida por diversos grupos, usando GAA purificada de leite de coelho (Miozyme®) ou métodos de expressão de proteínas com células CHO (Lumizyme®) (Chien *et al.*, 2013).

O FDA (US Food and Drug Administration) aprovou o uso do Miozyme® (alglucosidase alfa) em 2006 e do Lumizyme® em 2010 (Chien *et al.*, 2013).

Outros métodos terapêuticos, como uso de chaperonas, terapia gênica e terapia celular estão sendo estudadas para uso no tratamento da DP (Chien *et al.*, 2013).

1.5.3 Acarbose

Acarbose é um pseudo-carboidrato que inibe competitivamente as enzimas α -glicosidases, localizadas na borda em escova dos enterócitos, que hidrolisam oligossacarídeos não absorvíveis e polissacarídeos em monossacarídeos absorvíveis. É um pseudotetrassacarídeo obtido a partir de processos de fermentação do microrganismo *Actinoplanes utahensis*. É mais eficaz contra glicoamilase, seguido pela sacarase, maltase, e dextranase (Derosa, 2012).

A acarbose foi isolada em 1975 a partir de estirpes de *Actinoplanes sp.*, actinomicetos encontrado em culturas contendo glicose e maltose. Foi sintetizada em laboratório, em 1988 (Sneider, 2005).

Atualmente, é utilizada no tratamento de diabetes, pois interfere na digestão de açúcares da dieta, retardando a digestão de polissacarídeos, e assim, a elevação dos níveis de glicose no plasma após as refeições. (Sneider, 2005).

Além disso, é utilizada como um inibidor potente e seletivo da isoenzima maltase glicoamilase (MGA) nas técnicas que utilizam células sanguíneas para diagnóstico da Doença de Pompe. A MGA está presente nos neutrófilos e com isso pode apresentar uma atividade residual que se sobrepõe a atividade da GAA, se não for inibida, acarretando um resultado falso-negativo (Chien *et al.*, 2013; Kallwass *et al.*, 2007; Okumiya *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2004).

A concentração de acarbose utilizada é variável conforme o tipo de amostra (derivada de células sanguíneas) utilizada e sua forma de preparo. Alguns grupos utilizam concentrações abaixo de 10 μ M (Okumiya *et al.*, 2006; Winchester *et al.*, 2008), outros utilizam concentrações de 80 μ M (Li *et al.*, 2004; Labrousse *et al.*, 2010), demonstrando ou não alterações significativas na atividade da MGA ou GAA.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar bioquimicamente, através da determinação de parâmetros bioquímicos e cinéticos, a enzima alfa-glicosidase ácida de modo à melhor diferenciação entre controles saudáveis e pacientes com DP nas diferentes amostras.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Observar o efeito do inibidor acarbose sobre a MGA na medida da atividade da GAA.
- b) Estabelecer valores de coeficiente de variação para técnicas em sangue impregnado em papel filtro e leucócitos, para DP.
- c) Caracterizar bioquimicamente a enzima alfa-glicosidase ácida através da determinação dos parâmetros cinéticos: Km, Velocidade máxima, pH ideal e termoestabilidade em amostras de sangue impregnado em papel filtro e leucócitos de controles saudáveis e pacientes com Doença de Pompe;
- d) Comparar os parâmetros bioquímicos da enzima alfa-glicosidase ácida em controles saudáveis e pacientes com Doença de Pompe;
- e) Correlacionar a atividade da enzima alfa-glicosidase ácida amostras de sangue impregnado em papel filtro e leucócitos de modo a observar se a medida da atividade da enzima em leucócitos pode ser utilizada como diagnóstico definitivo da DP.

PARTE II

3. RESULTADOS

Os resultados desta dissertação serão apresentados na forma de artigos científicos.

3.1 CAPÍTULO I – Artigo Científico I

Leukocyte α -glucosidase from Healthy Individuals and Pompe Disease Patients

Jamila Mezzalira, Vanessa V. Daitx, Vitória C. Moraes, Dácio F. W. Piloti, Ana Carolina Breier, Jaqueline Cé, Janice C. Coelho.

Periódico: Muscle & Nerve

Status: Submetido

Leukocyte α -glucosidase from Healthy Individuals and Pompe Disease Patients

Jamila Mezzalira, MSc,^{1,2} Vanessa V. Daitx, MSc, ^{1,2} Vitória C. Moraes, Student,²
Dácio F. W. Piloti, Student,² Ana Carolina Breier, PhD,^{1,2} Jaqueline Cé, MSc,^{1,2}
Janice C. Coelho, PhD,^{1,2*}.

Affiliations:¹Posgraduate Program in Biological Sciences: Biochemistry, ²Department of Biochemistry. Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

Acknowledgements: The authors thank CNPq and FAPERGS for the financial support and the Hemotherapy Service of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) and the Associação Carioca dos Portadores de Distrofia Muscular (ACDIM) for providing the samples used in this study.

*Correspondence to: Prof^a Dra. Janice C Coelho

Departamento de Bioquímica
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Rua Ramiro Barcelos, 2600, anexo
Porto Alegre – RS – Brazil
90035-003
Phone: 55 51 33085550
Fax: 55 51 33085535
E-mail: janice.coelho@ufrgs.br

Running Title: α -glucosidase characterization

ABSTRACT

Introduction: Acid alpha-glucosidase enzyme (GAA) is a lysosomal hydrolase that degrades glycogen molecules. When GAA activity is deficient, glycogen accumulates intralysosomally in several tissues and associated to clinical signs deriving from the glycogen deposit, characterizes Pompe disease (PD).

Methods: GAA activity in leukocytes was compared between health individuals and PD patients and its biochemical behavior was characterized. Moreover, the effect of the concentration of the acarbose was shown and values of the coefficient of variation were established.

Results: The results showed significant differences in the behavior of GAA in leukocyte samples from the two groups. In addition, the importance of using acarbose was shown and the values of coefficients of variation below 10% were established for measuring GAA.

Conclusion: The present results show that the parameters analyzed may be useful in differentiating healthy individuals from Pompe disease patients, especially when measuring GAA activity alone is not a reliable diagnosis method.

Keywords: Leukocytes, Pompe Disease, Acid alpha-glucosidase, Biochemical Characterization, Acarbose.

ABBREVIATIONS

ERT – Enzyme Replacement Therapy

GAA – Acid Alpha-glucosidase

MGA – Maltase Glucoamilase

MUG – Methylumbelliferyl- α -D-glucopyranoside

PD – Pompe Disease

INTRODUCTION

Acid alpha-glucosidase enzyme (GAA, EC 3.2.1.20) is a lysosomal hydrolase that catalyzes the cleavage of the glycosidic bonds α -1,4 and α -1,6 of the glycogen molecule. The gene modifying GAA is located in the terminal portion of the long arm of chromosome 17 (17q25.2-q25.3) and is bound to the locus of thymidine kinase (TK). When GAA activity is deficient due to mutations in the gene that codes such enzyme, glycogen accumulates intralysosomally in various tissues. This accumulation is significant in cardiac and skeletal muscles and in liver tissues of children with the disease widespread. GAA deficiency, associated to clinical signs deriving from the glycogen deposit, characterizes Pompe disease (PD), also known as Glycogen Storage Disease Type II (GSDII), which is an autosomal recessive inborn error of metabolism.^{1,2}

PD incidence varies according to ethnic group and geography, affecting an estimated 1:40.000 births and is associated with a broad range of clinical phenotypes. Over 200 mutations of the GAA gene are known that are correlated with the disease's phenotypes.^{3,4,5}

The disease onset greatly varies and may present in children, juveniles, or adults. The infant form is considered the most severe due to hypertrophic and hypotonic cardiomyopathy, which can lead to death at around 1 year of age. The later forms are milder, mainly characterized by muscular weakness and by not involving the heart.^{1,3,4,5,6}

PD is diagnosed by measuring GAA activity using the fluorometric synthetic substrate 4-methylumbelliferyl- α -D-glucopyranoside (4-MUG) in blood cells and tissues or by gene mutation analysis. However, other alpha-glucosidase isoenzymes

present in blood cells, mainly maltase-glucoamylase (MGA), may contribute to an increase in the residual activity observed.^{1,5,6,7,8}

In order to minimize residual activity and accurately measure GAA activity, lymphocytes appropriately separated, skin fibroblasts, immobilizing antibodies, and MGA inhibitors may be used. The use of total leukocytes has been proposed for the diagnostic along with using acarbose as a GAA inhibitor.^{5,6,9}

Fibroblasts do not contain MGA enzyme⁶, hence they are used to confirm PD diagnostic and are considered the gold standard in determining GAA residual activity.^{1,7}

Diagnosing PD early is essential for the treatments under development to be more effective, considering that enzyme replacement therapy (ERT) is already available for PD (Myozyme® and Lumizyme®; Genzyme Corporation, Cambridge, MA, EUA).^{3,5,10}

Given how early PD diagnostic leads to a more effective treatment and better quality of life for patients,^{3,4} and how important and difficult the biochemical PD diagnosis is, this study aimed to characterize the biochemical and kinetic properties of the acid alpha-glucosidase enzyme in leukocyte samples so as to observe its behavior and differences in healthy controls and adult PD patients. Furthermore, the study sought to observe the inhibiting effect of acarbose and determine how precise the technique is through the coefficients of variation.

METHODOLOGY

This study was approved by the Research Ethics Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul in accordance with the Declaration of

Helsinki of the World Medical Association for ethical principles involving clinical research in humans.

Samples

The blood samples used as healthy adult controls (n=12) were collected from anonymous volunteer donors from the Blood Bank of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) and were obtained from 9 mL of blood collected directly into heparinized tubes (Vacutainer tubes, Bectonand Dickinson - São Paulo, SP, Brazil, www.bd.com/brasil). Nine milliliters (9mL) blood samples in heparin were also obtained from adult patients previously diagnosed with Pompe disease (n=12) through the measure of their enzymatic activity in fibroblasts or by molecular analysis.

All samples were properly identified with numbers so as to preserve the donors' identity. After collection, the tubes were homogenized several times by inversion and the samples were processed to separate the leukocytes according to the technique described by Skoog and Beck (1956)¹¹. At the end of the process, a leukocyte pellet was obtained, which was then diluted in distilled water. The leukocyte membranes were ruptured with ultrasound (SonicatorUltrasonic Processor XL – Heat Systems). Next, the total proteins were dosed through the miniaturized colorimetric technique of Lowry et al. (1951)¹² using clear 96-well flat-bottomed plates (Techno PlasticProducts AG-TTP, Switzerland). The samples were stored at -40 °C until the analyses.

Enzyme activity measure

Acid alpha-glucosidase enzyme activity was measured through fluorometric assays based on the techniques described by Li et al. (2004)⁹ and Kallwass et al.

(2007)⁷. All assays used the substrate artificially produced with 4-methylumbelliferyl radical (fluorescent), called 4-methylumbelliferyl- α -D-glucopyranoside (Sigma - St. Louis, MO, USA, www.sigma.com) and the inhibitor acarbose (Sigma - St. Louis, MO, USA, www.sigma.com) as maltase glucoamylase inhibitor. The assay contained a mix of 20 μ L leukocytes and 40 μ L assay solution (120 μ L 10mM substrate solution, 30 μ L 8mM acarbose solution, and 2.9mL 0.2M citrate-phosphate buffer, pH 4, containing triton-x100 0.6g/L). The leukocytes were incubated for 2h at 37°C in an agitated incubator (CT712 – Cientec). The reaction was interrupted by adding 1mL of glycine-NaOH buffer, pH 10.3, and the fluorescence was read in a microplate reader fluorometer (SpectraMax Gemini XPS – Molecular Devices—M5) with 365nm excitation and 450nm emission.

The inhibiting effect was verified through an inhibitor concentration curve ranging from 0 to 120 μ M at its final concentration.

Citrate-phosphate buffer, with pH between 3.6 and 4.8, was used to determine the optimal pH for preparing the substrate.

The Michaelis-Menten curve (substrate curve) was constructed using artificial substrate concentrations from 2mM to 15mM. After linearity was determined, substrate concentrations from 1 to 3.5mM for controls and 0.5 to 2mM for patients were to determine K_m and V_{max} according to the Lineweaver-Burk plot (1934).¹³

In order to determine GAA's thermal stability, inactivation temperature was verified from a temperature curve (40 to 70°C) in which the samples were pre-incubated for 20 min without the substrate. 60°C was chosen as the best temperature for enzyme inactivation. Next, the samples were pre-incubated at 60°C for 5, 10, 20, 30, and 60min. Then, 40 μ L of the assay solution were added and the reaction was incubated for 2h at 37°C.

GAA's enzyme activity was expressed as a percentage of the residual activity and compared to the samples that were not pre-incubated, which remained at 0°C and did not undergo inactivation (100% activity).

Validation Parameters

For the validation and precision of the specific activity measurement techniques in leukocytes, the intra-assay, inter-assay, and interpersonal coefficients of variation (CV) were determined. For the intra-assay analysis, the samples' enzyme activity was determined in a single enzymatic assay in triplicate. In order to establish the inter-assay CV, enzymatic reactions were performed on three different days using the same biological samples. For the interpersonal CV, enzyme reactions were simultaneously performed for three days by two trained researchers.

Statistical Analysis

The analyzes were developed with the software GraphPad Prism 5. The data were expressed as means±standard deviation and Student's T-test was applied to compare two groups of independent samples or one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test (when the differences were significant) to compare more than two groups. For the thermal stability analysis, the results for each pre-incubation time were analyzed by two-way ANOVA followed by Bonferroni test (when the differences were significant). $p < 0.05$ was used as the criterion for statistical significance.

RESULTS

Effect of the acarbose inhibitor concentration on leukocyte GAA activity

The effect of the inhibitor concentration on leukocyte GAA activity is shown in Figure 1. It can be seen that GAA activity is significantly higher in the absence of the inhibitor both in the samples from healthy controls and from patients when compared to the activity in the presence of the inhibitor ($p < 0.001$). A significant difference between both groups is seen at all inhibitor concentrations used ($p < 0.05$). However, the different inhibitor concentrations used did not cause a significant difference in enzyme activity within the same group. Hence, the concentration of the original technique,⁹ i.e., $80\mu\text{M}$, was maintained.

Determining optimal pH of leukocyte GAA from healthy individuals and Pompe disease patients

The effect of pH on leukocyte GAA activity is shown in Figure 2. The determination did not obtain a single optimal pH for leukocyte GAA activity from healthy controls and Pompe disease patients since the difference in GAA activity at adjacent pHs was not significant. The highest average activity was observed at pH 4.0 in controls and at pH 4.4 in PD patients. To perform other enzymatic assays of this work, the pH with average of GAA activity higher in samples from healthy controls was chosen, since there was not significant difference between the two groups.

Determining K_m and V_{max} of leukocyte GAA from healthy individuals and Pompe disease patients

The effects of the substrate concentration were observed in total leukocyte samples. After the Michaelis-Menten curve was plotted (Figure 3), linearity was determined and, after new experiments, the Lineweaver-Burk curve was plotted to determine K_m and V_{max} (Figure 4). K_m and V_{max} (Table 1) obtained from healthy

controls were 5.6mM and 11.4nmol/h/mg prot, respectively. For PD patients, Km of 1.5mM and Vmax of 0.4nmol/h/mg prot (Table 1) were established. As shown, patients have significantly lower GAA Km ($p<0.01$) and Vmax ($p<0.001$).

Thermal stability of leukocyte GAA from healthy individuals and Pompe disease patients

For the study of thermal stability, the samples were pre-incubated at 60 °C for 5, 10, 20, 30, and 60min. Enzyme activity was expressed as a percentage of residual activity, compared to the samples that were not pre-incubated (100% activity). Figure 5 shows the residual GAA activity pre-incubated at 60°C in the control and patient groups.

The GAA enzyme was thermally inactivated during the pre-incubation at 60°C in both groups. It can be seen that, starting at 5min of pre-incubation, the enzyme inactivation process is already under way in samples from health controls ($p<0.05$), which is still true after 60min. At 60 min of pre-incubation, control GAA residual activity was significantly lower ($p<0.001$) at 21% of the initial activity.

In the leukocyte samples from PD patients, inactivation begins at 10min of pre-incubation at 60°C ($p<0.001$) and gradually decreases up until 60min. At 60min of pre-incubation, patient GAA residual activity was significantly lower ($p<0.001$) at 7.1% of the initial activity.

When the residual activity is compared between groups, no significant difference is found at the pre-incubation times analyzed, although at 60min the percentage of residual enzyme activity in patient samples is apparently lower than in control samples.

Validation parameters of the GAA measuring technique in leukocytes

Multiple assays with the same samples were carried out to validate and determine the precision of this technique. In addition, six samples were analyzed in triplicate by two operators for three days. The same reagents were used, but in separate reactions. The GAA intra-assay, inter-assay, and interpersonal CV of leukocyte samples from healthy individuals were calculated and the values of 5%, 9%, and 7%, respectively, were found.

GAA activity between patients and healthy individuals

Finally, after determining the optimum conditions (pH 4.0, 80 μ M inhibitor, 10mM substrate), GAA activity in healthy controls was compared to that in Pompe disease patients from the leukocyte samples (Table 2). As it can be seen, the patients have a significantly lower GAA activity when compared to healthy individuals ($p < 0.05$).

DISCUSSION

Pompe disease is characterized by the intralysosomal glycogen accumulation leading to lesions and clinical symptoms due to GAA deficiency.^{4,7,14} Given that the average diagnostic age is around 5 months, that the symptoms appear at around 2 months of age, and that the disease may lead to death at around 9 months of age if untreated,^{4,5} the early PD diagnostic becomes paramount not only for treatment effectiveness, but also to improve the patient's quality of life.^{7,15}

Although the GAA assay in cultured skin fibroblasts has been the gold standard, it is rapidly being replaced by blood sample assays, which can now be considered the method of choice for the enzymatic diagnosis of Pompe disease since they are less invasive, reliable, quicker, and more convenient.³

In order to better understand and standardize the measurement of leukocyte GAA activity, studying the enzyme's biochemical behavior by comparing healthy individuals and PD patients is very important. Thus, some biochemical and kinetic enzyme characteristics in total leukocyte samples were analyzed so as to identify the differences in behavior. This allows for better differentiating the groups and assesses the use of this method as a tool to aid in PD diagnosis. Moreover, validation parameters were determined and the effect of the acarbose inhibitor was observed.

Initially, the effect of the inhibitor concentration on GAA activity was studied. This showed that, without the inhibitor, GAA activity is significantly higher in samples from both healthy controls and patients. A significant difference was observed between the groups at all inhibitor concentrations used. However, the different inhibitor concentrations did not cause a significant difference in enzyme activity within the same group.

Maltase-glucoamylase (MGA), an isoenzyme present in neutrophils, is found in total leukocyte samples and interferes in results due to its residual enzyme activity that outdoes GAA activity. Thus, using acarbose is essential in the assay because it is a selective MGA inhibitor and is able to eliminate its interference in the result.

The present results are in accordance with studies by other authors,^{3,4,16,17} who reported that patients were reliably identified when using acarbose. They showed that using acarbose is essential to more reliably differentiate healthy individuals and patients by eliminating MGA interference.^{7,16}

The acarbose concentration normally used by the diagnostic laboratories is low and can vary according to the technique employed. According to the present results, all inhibitor concentrations are able to very effectively inhibit the enzyme both in healthy individuals and in PD patients. Hence, the literature was followed⁹ and

acarbose was used at 80 μ M concentration in all assays in order to guarantee that MGA would not interfere in the experiments.

At pH between 3.6 and 4.8, there was no single optimal value since the difference in GAA activity at adjacent pH values was not significant. The same had been reported by Kohriyama et al. (1989)¹⁸. Those authors showed that total leukocyte samples from controls and patients did not have an optimal pH, instead showing higher activity at the pH range from 3 to 5. In spite of that, a higher GAA activity, albeit not significantly so, was found in the present study at pH 4.0 for controls and pH 4.4 for patients. As the original GAA measuring technique⁹ uses pH 4.0, this value was chosen in the present study because it was within the highest activity range for controls. In addition, since no significant differences were found for the other pH values in the samples, it must be considered that in a diagnosis enzymatic assay it is unknown whether the samples are from patients or from healthy individuals. Therefore, the assay is performed at a single pH and the value with the highest average GAA activity in control samples was chosen.

Km of the groups analyzed revealed a significant difference ($p < 0.01$) in the results. Patient Km, at 1.5mM, was clearly lower than in controls, at 5.6mM. Kohriyama et al. (1989)¹⁸ reported similar Km values between patients and controls, but they used lymphocyte samples. Since lymphocytes are more purified cells, those results cannot be compared with the present ones, which used total leukocytes.

Likewise, Vmax in patient samples (0.4nmol/h/mg prot) was significantly lower than in controls (11.4nmol/h/mg prot). This result was already expected since controls have normal GAA function, unlike the patients. Kohriyama et al. (1989)¹⁸ also reported different Vmax values between patients and controls, again in lymphocyte samples.

Given the thermal stability, it can be seen that GAA enzyme in total leukocyte samples was thermally inactivated at 60°C in the groups analyzed. At 5min of pre-incubation, the enzyme inactivation process begins only in control samples and the percentage of residual enzyme activity in patients is higher than in controls. This parameter may aid in differentiating the two groups.

Starting at 10min of GAA pre-incubation at 60°C, activity decreased and inactivation takes place gradually up until 60min in samples from patients and controls. At that moment, the percentage of residual enzyme activity in patients is lower than in controls, but not significantly so. Perhaps this statistical difference was not established due to the large variation in patient GAA activity, which increases the sample's standard deviation and makes the statistical test harder. GAA residual activity after 60min of pre-incubation was 21%, while in patients it was 7.1%.

Although this residual GAA activity in patient leukocytes was lower than in controls, although not significantly so, thermal inactivation may represent a parameter that helps in differentiating the two groups. Kohriyama et al. (1989)¹⁸ verified GAA thermal stability at 56°C in both patients and controls, however, while using lymphocyte and granulocyte samples. In lymphocytes, GAA remained relatively stable in both groups, though patients had a percentage of lower activity. In granulocytes, GAA was easily inactivated and no difference was found between patients and controls.

Three coefficients of variation were established to validate and determine the precision of the technique: intra-assay, inter-assay, and interpersonal. The GAA CVs calculated for healthy controls were 5%, 9%, and 7%, respectively. Few studies are available that establish the CV for leukocyte samples for GAA. Van Diggelen et al. (2009)²¹ established inter-assay CV values of 14.6%. According to several authors,

an acceptable CV value is up to 20%.^{19,20} Thus, the present CV values are acceptable, precise, and can be appropriately reproduced when leukocytes are used. Moreover, these values are lower than what was found by other authors.²¹

When the enzyme activity in healthy individuals and PD patients was compared, a significant difference was found. Not only was the average GAA activity in patient leukocytes significantly lower than in controls, but also the activity range obtained did not allow the two groups to overlap. The values found for healthy individuals match those reported in the literature.^{1,5}

Since the average activity was significantly different between the two groups, the ranges are very distinct, and the use of acarbose provided effective and reliable results, becoming crucial in the assay to selectively inhibit MGA, the present results indicate that the fluorometric technique in leukocytes using the substrate 4-MUG is reliable. This technique may be used as the standard and definitive diagnostic of Pompe disease, as it has already been used by other authors.^{16,21}

The results of the present study show that GAA in PD patients, besides having reduced activity, had a different behavior compared to healthy controls regarding K_m , V_{max} , and thermal stability, which allows for differentiating the two groups. Moreover, the effect of the inhibitor acarbose was shown in the leukocyte assays, emphasizing how important its use is.

Such results can certainly contribute to a more precise and reliable diagnostic of Pompe disease, especially for patients whose enzyme activity is at the lower normality limit.

REFERÊNCIAS

- 1.Hirschhorn R, Reuser A.J.J. Glycogenstorage disease type II: acid α -glucosidase (acid maltase) deficiency.In: Scriver SR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D(Ed). The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8ed., McGraw-Hill, New York, 2001, pp.3389–3420.
- 2.Raben N, Plotz P, Byrne BJ. Acid α -Glucosidase Deficiency (Glycogenosis Type II, Pompe Disease). *Curr Mol Med* 2002; 2:145-66.
- 3.Winchester B, Bali D, Bodamer OA, Caillaud C, Christensen E, Cooper A, et al. Methods for a prompt and reliable laboratory diagnosis of Pompe disease: Report from an international consensus meeting. *Mol Genet Met* 2008; 93:275-81.
- 4.Lukacs Z, Cobos PN, Mengel E, Hartung R, Beck M, Deschauer M, et al. Diagnostic efficacy of the fluorometric determination of enzyme activity for Pompe disease from dried blood specimens compared with lymphocytes - possibility for newborn screening. *J Inherit Metab Dis* 2010; 33:43-50.
- 5.Chien YH, Hwu WL, Lee NC.Pompe Disease: Early Diagnosis and Early Treatment Make a Difference. *Pediatr Neonatol* 2013; 54:219-27.
- 6.Chamoles NA, Niizawa G, Blanco M, Gaggioli D, Casentini C. Glycogen storage disease type II: enzymatic screening in dried blood spots on filter paper. *Clin Chim Acta* 2004; 347:97-102.
- 7.Kallwass H, Carr C, Guerrein J, Titlow M, Pomponio R, Bali D, et al. Rapid diagnosis of late-onset Pompe disease by fluorometric assay of α -glucosidase activities in dried blood spots. *Mol Genet Met* 2007; 90:449-52.
- 8.Weida J, Hainline BE, Bodkin C, Williams MK. Management of a Pregnancy Complicated by Pompe Disease. *Case Rep Obstet Gynecol.* 2012; 2012:137861.

9. Li Y, Scott R, Chamoles NA, Ghavami A, Pinto BM, Turecek F, et al. Direct multiplex assay of lysosomal enzymes in dried blood spots for newborn screening. *Clin Chem* 2004; 50:1785-96.
10. Shigueto S, Katafuchi T, Okada Y, Nakamura K, Endo F, Okuyama T, et al. Improved assay for differential diagnosis between Pompe disease and acid α -glucosidase pseudodeficiency on dried blood spots. *Mol Genet Metab* 2011; 103:12-7.
11. Skoog WA, Beck WS. Studies on the fibrinogen, dextran and phytohemagglutinin methods of isolating leukocytes. *Blood* 1956; 11:436-54.
12. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-75.
13. Lineweaver H, Burk D. The determination of enzyme dissociation constants. *J Am Chem Soc* 1934; 56:658–66.
14. De Jesus VR, Zhang XK, Keutzer J, Bodamer OA, Mühl A, Orsini JJ, et al. Development and evaluation of quality control dried blood spot materials in newborn screening for lysosomal storage disorders. *Clin Chem* 2009; 55:158–64.
15. Van der Ploeg AT, Reuser AJ. Pompe's Disease. *Lancet* 2008; 382:1342-53.
16. Okumiya T, Keulemans JLM, Kroos M, Van der Beck NME, Boer MA, Takeuchi H, et al. A new diagnostic assay for glycogen storage disease type II in mixed leukocytes. *Mol Genet Metab* 2006; 88:22-8.
17. Gasparotto N, Tomanin R, Frigo AC, Niizawa G, Pasquini E, Blanco M, et al. Rapid diagnostic testing procedures for lysosomal storage disorders: α -glucosidase and β -galactosidase assays on dried blood spots. *Clin Chim Acta* 2009; 402:38-41.

18. Kohriyama T, Kuriyama M, Hiwatari R, Osame M, Igata A. Partial Characterization of Leucocyte α -Glucosidase in Late Onset Glycogenosis Type II. *Tohoku J Exp Med* 1989; 157:355-63.
19. Lukacs Z, Cobos PN, Keil A, Hartung R, Mengel E, Beck M, *et al.* Dried blood spots in the diagnosis of lysosomal storage disorders—Possibilities for newborn screening and high-risk population screening. *Clin Biochem* 2011; 44:476.
20. Müller KB, Rodrigues MDB, Pereira VG, Martins AM, D’Almeida V. Reference values for lysosomal enzymes activities using dried blood spots samples - a Brazilian experience. *Diagn Pathol* 2010; 29:5:65.
21. Van Diggelen OP, Oemardien LF, Van der Beek NA, Kroos MA, Wind HK, Voznyi YV, *et al.* Enzyme analysis for Pompe disease in leukocytes; superior results with natural substrate compared with artificial substrates. *J Inherit Met Dis* 2009; 32:416-2

Table 1. Michaelis constant (Km) and maximum velocity (Vmax) of GAA enzyme in leukocytes from healthy controls and Pompe disease patients (PD).

Groups	Km (mM)	Vmax (nmol/h/mg prot)
Controls	5.6	11.4
PD	1.5**	0.4***

Results are expressed as mean, in pH 4.0 using 80 μ M inhibitor.

**Significant difference compared to the control group ($p < 0.01$).

***Significant difference compared to the control group ($p < 0.001$).

Table 2. GAA enzyme activity in leukocyte samples from healthy individuals and Pompe disease (PD) patients.

Groups	Activity (nmol/h/mg prot)	Range (nmol/h/mg prot)
Controls	10.9±2.5	4.9 – 16.8
PD	2.3±1.9***	0 – 1.6

Results are expressed as mean±SD, in pH 4.0 using 80µM inhibitor.

***Significant difference compared to the control group (p<0.001).

FIGURE CAPTIONS

Figure 1 – Effect of the inhibitor acarbose on GAA residual enzyme activity in healthy controls (A) and Pompe disease patients (B). The data are expressed as mean±SD. **p<0.001 – Statistically different from the different inhibitor concentrations.

Figure 2 – Determination of the optimal pH of GAA enzyme in leukocytes from healthy controls (●) and Pompe disease patients (PD ■). The data are expressed as mean±SD.

Figure 3 – Substrate curve (Michaelis-Menten) of GAA enzyme in leukocytes from healthy controls (A) and Pompe disease patients (B) using substrate concentrations from 2mM to 15mM. The data are expressed as mean±SD.

Figure 4 – Lineweaver-Burk plot of GAA enzyme in leukocytes from healthy controls (A) and Pompe disease patients (B) to determine Km and Vmax using substrate concentrations from 1mM to 3.5mM for controls and 0.5mM to 2mM for patients. V = velocity (nmol/h/mg prot).

Figure 5 – Thermal stability of GAA enzyme after pre-incubation at 60 °C of leukocytes from healthy controls (■) and Pompe disease patients (PD ▣). Enzyme activity is reported as the percentage of residual activity compared to samples not subjected to pre-incubation (100% activity) using acarbose 80µM. *, # p<0.01: significantly different from samples not subjected to pre-incubation.

Figure 1

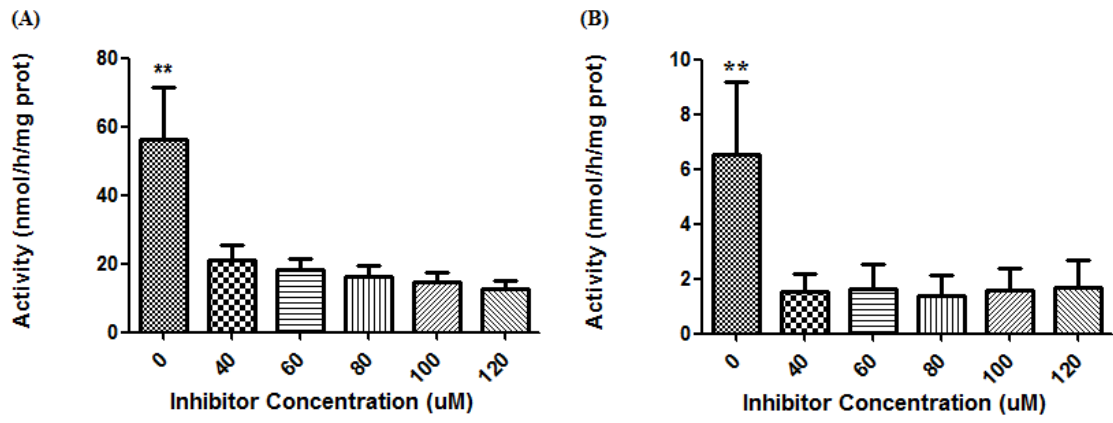


Figure 2

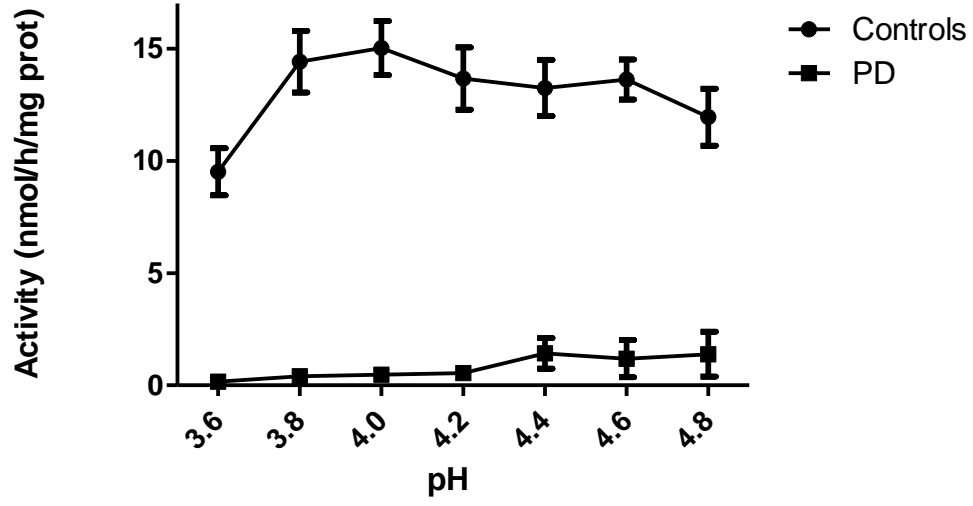


Figure 3

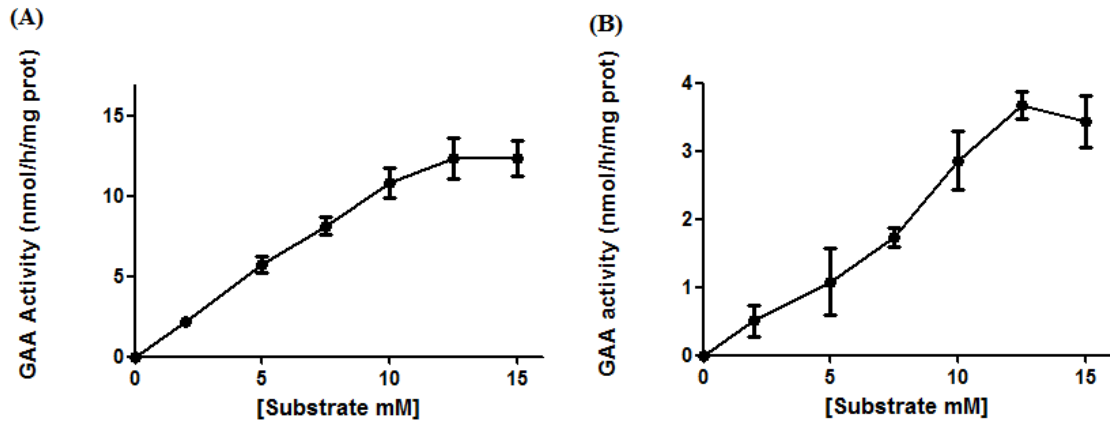


Figure 4

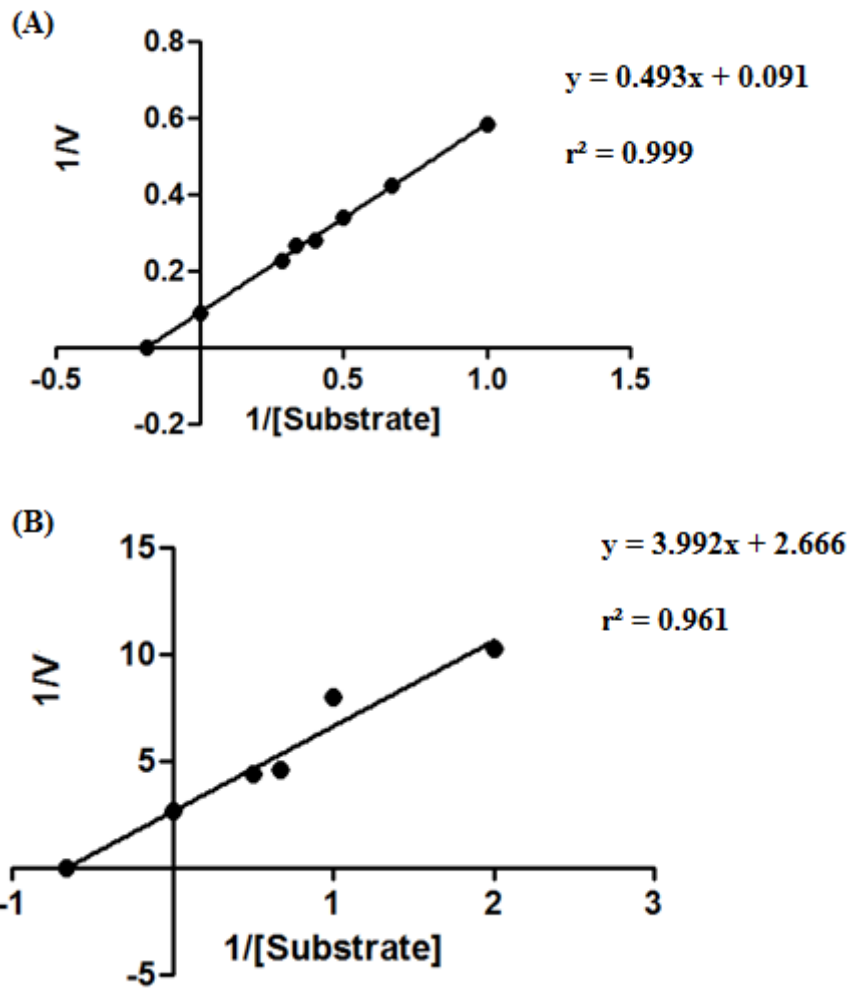
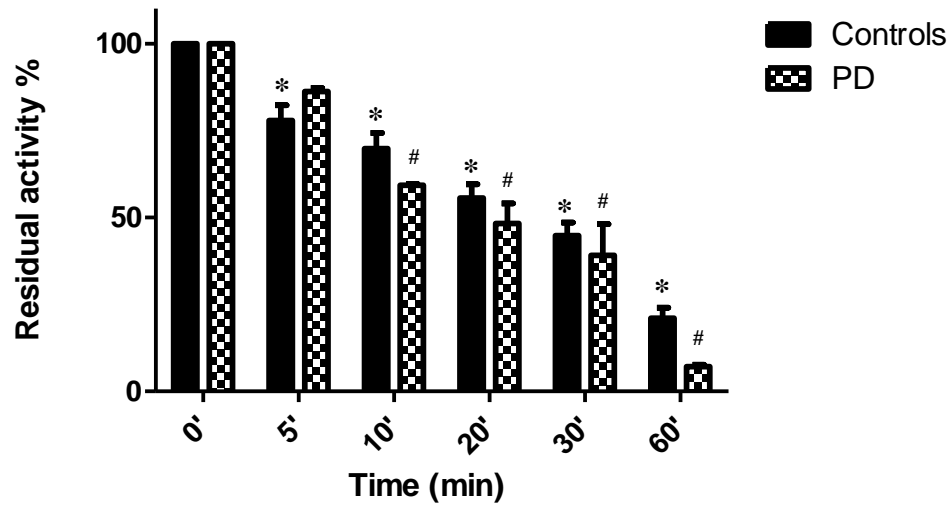


Figure 5



3.2 CAPÍTULO II – Artigo Científico II

Differences in the biochemical properties of acid α -glucosidase in dried blood spots from healthy individuals and Pompe disease patients

Jamila Mezzalira, Vanessa V. Daitx, Dácio F. W. Piloti, Vitória C. Moraes, Ana Carolina Breier, Jaqueline Cé, Janice C. Coelho.

Periódico: Clinical Biochemistry

Status: Submetido

**Differences in the biochemical properties of acid α -glucosidase
in dried blood spots from healthy individuals
and Pompe disease patients**

Jamila Mezzalira^{1,2}, Vanessa V. Daitx^{1,2}, Dácio F. W. Piloti², Vitória C. Moraes², Ana Carolina Breier^{1,2}, Jaqueline Cé^{1,2}, Janice C. Coelho^{1,2*}.

¹Posgraduate Program in Biological Sciences: Biochemistry, ²Department of Biochemistry. Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

*Correspondence to: Prof^a Dra. Janice C Coelho
Departamento de Bioquímica
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Rua Ramiro Barcelos, 2600, anexo
Porto Alegre – RS – Brazil
90035-003
Phone: 55 51 33085550
Fax: 55 51 33085535
E-mail: janice.coelho@ufrgs.br

ABSTRACT

Objectives: Characterize the biochemical and kinetic properties of the acid α -glucosidase enzyme (GAA) in DBS samples, observe the inhibiting effect of acarbose and determine how precise the technique is through the coefficients of variation (CV).

Methodology: GAA activity in DBS was compared between healthy controls and Pompe disease patients and its behavior was characterized regarding optimal pH, thermal stability, K_m , and V_{max} . Moreover, the effect of the concentration of the inhibitor acarbose was shown and CV values were established.

Results: The results showed significant differences in the behavior of GAA (optimal pH, thermostability) in DBS samples from the two groups. In addition, the importance of using acarbose was shown and the CV values below 20% were established for measuring GAA.

Conclusion: The results here presented can certainly contribute to improving Pompe disease screening as well as initiating the investigation process, besides a more precise and reliable diagnosis.

Keywords: DBS, Pompe disease, Acid alpha-glucosidase.

ABBREVIATIONS

CV – Coefficient of Variation

DBS – Dried Blood Spots

ERT – Enzyme Replacement Therapy

GAA – Acid Alpha-glucosidase

LSD – Lissosomal Storage Disease

MGA – Maltase Gluco Amilase

MUG – Methylumbelliferyl- α -D-glucopyranoside

PD – Pompe Disease

INTRODUCTION

Pompe disease (PD), also known as Glycogen Storage Disease Type II (GSDII), is a lysosomal storage disorder (LSD) of autosomal recessive inheritance caused by the deficiency of the acid α -glucosidase enzyme (GAA). GAA (EC 3.2.1.20) catalyzes the cleavage of glycosidic bonds α -1,4 and α -1,6 of the glycogen molecule. When GAA activity is deficient due to mutations in the gene that codes such enzyme, glycogen accumulates in the lysosome in various tissues. This accumulation is significant in muscle tissue, which leads to the onset of clinical symptoms. [1,2].

The disease onset greatly varies and may present in children, juveniles, or adults. The infant form is considered the most severe due to hypertrophic and hypotonic cardiomyopathy, which can lead to death at around 1 year of age. The later forms are milder, mainly characterized by muscular weakness and by not involving the heart [1,3,4,5,6].

PD incidence varies according to ethnic group and geography, affecting an estimated 1:40.000 births with a broad range of clinical phenotypes. Over 200 mutations of the GAA gene are known that are correlated with the disease's phenotypes [3,4,5].

PD is diagnosed by measuring GAA activity using the fluorometric synthetic substrate 4-methylumbelliferyl- α -D-glucopyranoside (4-MUG) in blood cells and tissues or by gene mutation analysis. However, other α -glucosidase isoenzymes present in blood cells, mainly maltase-glucoamylase (MGA), may contribute to an increase in the residual activity observed [1,5,6,7,8].

Fibroblasts do not contain MGA enzyme [6], hence they are used to confirm PD diagnostic and are considered the gold standard in determining GAA residual activity [1,7].

Although the diagnosis is based on specific techniques, lysosomal enzyme activity currently has been measured in dried blood spot (DBS) samples as a method for screening newborns and high-risk populations [6,9,10,11,12].

Using DBS is advantageous when compared to the other biologic materials due to easy shipping [13], easy sample storage [14], preservation of GAA activity for up to 10 days at different temperatures [15], lower reaction volume [11], and greater safety in sample handling, which reduces the chances of contamination [13].

Since enzyme replacement therapy (ERT) is already available for PD (Myozyme® and Lumizyme®; Genzyme Corporation, Cambridge, MA, EUA) [3,5,9] and improves patient life expectancy, the early PD diagnosis is crucial and must be appropriate and easily available so that the treatment can be initiated early and be more effective [10,16].

Given how important early PD diagnostic is for a more effective treatment and better screening techniques, this study aimed to characterize the biochemical and kinetic properties of GAA in DBS samples so as to observe its behavior and differences in healthy controls and adult PD patients. Furthermore, the study sought to assess the use of these parameters as an aid in screening, observe the inhibiting effect of acarbose, and determine how precise the technique is through the coefficients of variation.

METHODOLOGY

This study was approved by the Research Ethics Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul in accordance with the Declaration of

Helsinki of the World Medical Association for ethical principles involving clinical research in humans.

Samples

The blood samples used as healthy adult controls (n=8) were collected from anonymous volunteer donors from the Blood Bank of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) and were obtained from 9 mL of blood collected directly into heparinized tubes (Vacutainer tubes, Bectonand Dickinson - São Paulo, SP, Brazil, www.bd.com/brasil). Nine milliliters (9 mL) blood samples in heparin were also obtained from adult patients previously diagnosed with Pompe disease (n=8) through the measure of their enzymatic activity in fibroblasts or by molecular analysis.

All samples were properly identified with numbers so as to preserve the donors' identity. After collection, the tubes were homogenized several times by inversion and a drop of blood was spotted in each circle of the Whatman 903® (Whatman - S&S Grade 903, Schleicher and Schuell, Whatman, Kent, UK, www.whatman.com) filter paper. The remaining blood was used to separate the leukocytes. The samples were stored at 4°C until processed, after which they remained at -20°C.

Enzyme activity measure

GAA activity was measured through fluorometric assays based on the technique described by Castilhos et al. [15]. All assays used the fluorescent substrate 4-methylumbelliferyl- α -D-glucopyranoside (Sigma - St. Louis, MO, USA, www.sigma.com) and the inhibitor acarbose (Sigma - St. Louis, MO, USA, www.sigma.com) as maltase glucoamylase inhibitor. The DBS assays were carried

out in duplicate. Three 1.2 mm cores were taken (Harris Uni-Core 1.2 mm punch - St. Louis, MO, USA, www.sigma.com) from the blood-stained paper filter and were placed in 96-well fluorometer plates. One of the cores was used as the sample's blank. Next, 8 μ L water, 16 μ L assay solution (120 μ L 10mM substrate solution, 30 μ L 8mM acarbose solution, and 2.9mL 0.2M citrate-phosphate buffer pH 4.4 containing triton-x100 0.6g/L), and 200 μ L glycine-NaOH buffer, pH 10.3 were added to each core both before the reagents were added to the blanks and after the sample incubation time. The samples were incubated for 20 h at 37°C in an agitated incubator (CT712 – Cientec). The fluorescence was read in a microplate reader fluorometer (SpectraMax Gemini XPS – Molecular Devices—M5) with 365 nm excitation and 450 nm emission.

The inhibiting effect was verified through an inhibitor concentration curve ranging from 0 to 120 μ M acarbose at its final concentration.

Citrate-phosphate buffer, with pH between 3.6 and 4.8, was used to determine the optimal pH for preparing the substrate.

The Michaelis-Menten curve (substrate curve) was constructed using artificial substrate concentrations from 2mM to 15mM. After linearity was determined, substrate concentrations from 6 to 9mM were used to draw the Lineweaver-Burk plot (1934) [17] to determine K_m and V_{max} of controls.

In order to determine GAA's thermal stability, inactivation temperature was verified from a temperature curve (40 to 70°C) in which the samples were pre-incubated for 20min without the substrate. 50°C was chosen as the best temperature for enzyme inactivation. Next, the samples were pre-incubated at 50°C for 1, 2, 3, 5, 10, 15 and 20min. Then, 16 μ L of the assay solution were then added and the reaction was incubated for 20h at 37°C.

GAA's enzyme activity was expressed as a percentage of the residual activity and compared to the samples that were not pre-incubated, which remained at 0°C and did not undergo inactivation (100% activity).

Validation Parameters

For the validation and precision of the specific activity measurement techniques in DBS, the intra-assay, inter-assay, and interpersonal CVs were determined. For the intra-assay analysis, the samples' enzyme activity was determined in a single enzymatic assay performed in triplicate. In order to establish the inter-assay CV, enzymatic reactions were performed on three different days using the same biological samples. For the interpersonal CV, enzyme reactions were simultaneously performed for three days by two trained researchers.

Statistical Analysis

The analyses were developed with the software GraphPadPrism 5. The data were expressed as means±standard deviation and Student's T-test was applied to compare two groups of independent samples or one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test (when the differences were significant) to compare more than two groups. For the thermal stability analysis, the results for each pre-incubation time were analyzed by two-way ANOVA followed by Bonferroni test (when the differences were significant). $p < 0.05$ was used as the criterion for statistical significance.

RESULTS

Effect of the acarbose inhibitor concentration on DBS GAA activity

The effect of the inhibitor concentration on DBS GAA activity is shown in Figure 1. It can be seen that GAA activity is significantly higher ($p < 0.001$) in the absence of the inhibitor both in the samples from healthy controls and from patients when compared to the activity in the presence of the inhibitor. At 40 μ M, 80 μ M, and 120 μ M inhibitor concentrations, a significant difference ($p < 0.05$) was observed between the groups. However, the different inhibitor concentrations used caused no significant difference in the activity of samples within the same group. Hence, the concentration of the original technique [15]., i.e., 80 μ M, was maintained.

Optimal pH determination

The effect of pH on GAA activity in DBS is shown in Figure 2. A significant difference ($p < 0.05$) was found in the samples from healthy controls among the pH values, with a significantly higher enzyme activity at pH 4.4, which was considered the optimal pH. On the other hand, there was no single optimal pH for GAA activity in samples from PD patients since the difference in GAA activity for adjacent pH values was not significant. A higher activity was observed at pH 4.2. Thus, the remaining experiments were performed using the optimal pH found for the control samples, i.e., 4.4.

K_m and V_{max} determination

The effects of the substrate concentration were observed in DBS samples. After the Michaelis-Menten curve was plotted (Figure 3), linearity was determined and, after new experiments, the Lineweaver-Burk curve was plotted to determine K_m and V_{max} (Figure 4). K_m and V_{max} obtained from healthy controls were 10.2mM

and 11.2nmol/20 h/mL, respectively. The K_m and V_{max} values for PD patients were not detectable.

GAA thermostability assay in DBS

The samples were pre-incubated at 50°C for 1, 2, 3, 5, 10, and 20min for the thermostability assay. GAA's enzyme activity was expressed as a percentage of the residual activity compared to the samples that were not pre-incubated (100% activity). Figure 5 shows the residual GAA activity of samples pre-incubated at 50°C in the control and patient groups.

Pre-incubation at 50°C inactivated the GAA enzyme in the control samples. It can be seen that, starting at 3min of pre-incubation, the enzyme inactivation process is already under way and it gradually and significantly ($p < 0.001$) continues up until 20min. GAA residual activity in control samples after 20min of pre-incubation at 50°C was 4%.

When the patient DBS samples underwent pre-incubation at 50°C, GAA inactivation started at 1 min ($p < 0.001$) and continued up until 20min. After 5min of pre-incubation, GAA was completely inactivated in patient samples and residual activity was zero.

When the residual activity between groups is compared, it can be seen that the enzyme from healthy individuals is more thermostable than that from PD patients. After 1min of pre-incubation at 50°C, a significant difference can already be seen between the groups ($p < 0.05$), and this difference is greatly extended ($p < 0.01$) at 5min of pre-incubation.

Validation parameters in DBS

Multiple assays with the same samples were carried out to validate and determine the precision of this technique. In addition, six samples were analyzed in triplicate by two operators for three days. The same reagents were used, but in separate reactions. The GAA intra-assay, inter-assay, and interpersonal CV of DBS samples from healthy individuals were calculated and the values of 10%, 19%, and 15%, respectively, were found.

GAA activity between groups

Finally, after determining the optimum conditions (pH 4.4, 80 μ M inhibitor, 10mM substrate), GAA activity in healthy controls was compared to that in Pompe disease patients from the DBS samples (Table 1). As it can be seen, the patients have a significantly lower GAA activity when compared to healthy individuals ($p < 0.05$).

DISCUSSION

Early PD diagnostic is crucial for an effective treatment and to improve patient life expectancy [7,10,18]. Currently, the average diagnostic age is around 5 months and the symptoms appear at around 2 months of age. If the disease is not treated early, it may lead to death at around 9 months of age [4,5].

Although the gold standard for PD diagnosis is measuring GAA activity in fibroblasts, DBS has been used by several groups to screen for several LSDs, including PD, through different enzyme analysis methods [3,6,9,10,19]. Moreover, this PD screening guarantees early diagnostic and treatment initiation [10].

In order to better understand and standardize the measurement of DBS GAA activity, studying the enzyme's biochemical behavior by comparing healthy

individuals and PD patients is very important. Since there are no reports in the literature that describe and characterize GAA in DBS, the present study assessed the biochemical and kinetic enzyme characteristics so as to observe the differences in its behavior and to improve differentiation. In addition, the potential use of such parameters in aiding screening was assessed, validation parameters were determined, and the effect of the acarbose inhibitor was observed.

Initially, the effect of the inhibitor concentration on GAA activity was studied. This showed that, without the inhibitor, GAA activity is significantly higher in samples from both healthy controls and patients. Five acarbose concentrations were used. All of them significantly inhibited MGA activity and had no significant differences in the sample activities within the same group.

Maltase-glucoamylase (MGA), an isoenzyme present in neutrophils, is found in DBS samples and interferes with results due to its residual enzyme activity that outdoes GAA activity. Thus, using acarbose is essential in the assay because it is a selective MGA inhibitor and is able to eliminate its interference in the result.

The present results match those from other authors [3,4,14], who showed that using acarbose is essential since it eliminates MGA interference.

According to the present results, all inhibitor concentrations are able to very effectively inhibit the enzyme both in healthy individuals and in PD patients. Hence, the literature was followed [15] and acarbose was used at 80 μ M concentration in all assays in order to guarantee that MGA would not interfere in the experiments.

The first parameter analyzed was the enzyme's optimal pH. A significant difference was found in GAA activity in the samples from healthy controls at pH 4.4. At this pH, activity was significantly higher, thus this was considered the optimal pH for GAA. No single optimal value was found for samples from PD patients since the

difference in GAA activity at adjacent pH values was not significant. A higher activity was observed at pH 4.2. Thus, the remaining experiments were performed using the optimal pH found for the control samples, i.e., 4.4. This facilitates the enzymatic analysis during screening, since it is not known then whether the sample comes from a healthy individual or a PD patient and using a single pH makes the assay much more convenient.

K_m and V_{max} for healthy controls were 10.2mM and 11.2nmol/20h/mL, respectively. The K_m and V_{max} values for PD patients were not detectable at the substrate concentrations used. No data are available in the literature to compare with our results.

Given the thermal stability, it can be seen that GAA enzyme was thermally inactivated at 50°C in both groups analyzed. At 1 min of pre-incubation, the GAA inactivation process is already under way in patient samples, while in control samples inactivation begins at 3 min. Hence, the enzyme from healthy individuals is more thermostable than that from patients. This parameter may aid in differentiating the two groups.

Inactivation proceeds gradually up until 20 min in control samples, with a residual GAA activity of 6%. Otherwise, in patient samples, although the inactivation occurs gradually, the enzyme was completely inactivated at 5min of pre-incubation. The behavior of the enzyme inactivation in both controls and patients was, thus, significantly different, which makes thermal inactivation at 50°C a good parameter to differentiate DBS samples.

Three coefficients of variation were established to validate and determine the precision of the technique in DBS: intra-assay, inter-assay, and interpersonal. The GAA CVs calculated for healthy controls were 10%, 19%, and 15%, respectively.

The intra-assay and inter-assay CVs are similar to those obtained by other authors [4,15,19], are precise, and show reproducibility of the technique. Moreover, they are acceptable values since, according to several authors, an acceptable coefficient of variation is up to 20% [20,21].

Although the technique is appropriate and allows PD patients to be initially identified, some patients, depending on the mutation, may fail to be identified [22]. With that in mind, studying the biochemical properties of the enzyme in DBS may prove very useful.

Depending on the mutation, GAA activity in PD patients greatly varies and may reach 30% of that in healthy individuals in various biological samples [5,22]. When GAA activity was compared between healthy individuals and PD patients in this study, the patients' enzyme activity was approximately 1% of that in controls, which is a significant difference. Not only was the average GAA activity in patient DBS significantly lower than in controls, but also the activity range obtained did not allow the two groups to overlap. The values found for healthy individuals match those reported in the literature [3,4,14].

Since the average activity was significantly different between the two groups, the intervals are very distinct, and the use of acarbose provided effective and reliable results, becoming crucial in the assay to selectively inhibit MGA, the present results indicate that the technique in DBS is reliable. This technique may be used as a screener for Pompe disease, as it has already been used by other authors [9,10,16,19].

The results of the present study established a K_m and V_{max} for GAA in DBS from healthy individuals and showed that, besides the lower enzyme activity in PD

patients, GAA behaved differently in healthy controls in terms of optimal pH and thermostability.

In addition, the effect of the inhibitor acarbose concentration was shown in the assay, highlighting the importance of its use. Acceptable CV values were also established, which mean good precision and reproducibility of the technique.

The results hereby presented can certainly contribute to improving Pompe disease screening by differentiating PD patients from healthy individuals, which provides a more precise and reliable diagnosis.

Acknowledgements

The authors thank CNPq for the financial support, the Hemotherapy Service of the Hospital de Clinicas de Porto Alegre (HCPA) for providing the samples used in this study and the Associação Carioca dos Portadores de Distrofia Muscular (ACDIM).

REFERENCES

- [1] Hirschhorn R, Reuser A.J.J. Glycogen storage disease type II: acid α -glucosidase (acid maltase) deficiency. In: Scriver SR, Beaudet al, Sly WS, Valle D (Ed). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8ed., McGraw-Hill, New York, 2001, pp.3389–3420.
- [2] Raben N, Plotz P, Byrne BJ. Acid α -Glucosidase Deficiency (Glycogenosis Type II, Pompe Disease). *Curr Mol Med* 2002; 2(2):145-66.
- [3] Winchester B, Bali D, Bodamer OA, Caillaud C, Christensen E, Cooper A, *et al.* Methods for a prompt and reliable laboratory diagnosis of Pompe disease: Report from an international consensus meeting. *Mol Genet Met* 2008;93(3):275-81.
- [4] Lukacs Z, Cobos PN, Mengel E, Hartung R, Beck M, Deschauer M, *et al.* Diagnostic efficacy of the fluorometric determination of enzyme activity for Pompe disease from dried blood specimens compared with lymphocytes - possibility for newborn screening. *J Inherit Metab Dis* 2010;33(1):43-50.
- [5] Chien YH, Hwu WL, Lee NC. Pompe Disease: Early Diagnosis and Early Treatment Make a Difference. *Pediatr Neonatol* 2013; 54(4):219-27.
- [6] Chamoles NA, Niizawa G, Blanco M, Gaggioli D, Casentini C. Glycogen storage disease type II: enzymatic screening in dried blood spots on filter paper. *Clin Chim Acta* 2004; 347(1-2):97-102.
- [7] Kallwass H, Carr C, Guerrein J, Titlow M, Pomponio R, Bali D, *et al.* Rapid diagnosis of late-onset Pompe disease by fluorometric assay of α -glucosidase activities in dried blood spots. *Mol Genet Met* 2007; 90(4):449-52.
- [8] Weida J, Hainline BE, Bodkin C, Williams MK. Management of a Pregnancy Complicated by Pompe Disease. *Case Rep Obstet Gynecol.* 2012; 2012:137861.
- [9] Shigueto S, Katafuchi T, Okada Y, Nakamura K, Endo F, Okuyama T, *et al.* Improved assay for differential diagnosis between Pompe disease and acid α -glucosidase pseudodeficiency on dried blood spots. *Mol Genet Met* 2011;103(1):12-7.
- [10] Chiang SC, Hwu WL, Lee NC, Hsu LW, Chien YH. Algorithm for Pompe disease newborn screening: Results from the Taiwan screening program. *Mol Genet Metab.* 2012; 106(3):281-6.
- [11] Civallero G, Michelin K, de Mari J, Viapiana M, Burin M, Coelho JC, *et al.* Twelve different enzyme assays on dried-blood filter paper samples for detection of patients with selected inherited lysosomal storage diseases. *Clin Chim Acta* 2006; 372:98-102.
- [12] Spada M, Porta F, Vercelli L, Pagliardini V, Chiadò-Piat L, Boffi P, *et al.* Screening for later-onset Pompe's disease in patients with paucisymptomatic hyperCKemia. *Mol Genet Metab.* 2013; 109(2):171-3.

- [13] Rodrigues MD, de Oliveira AC, Müller KB, Martins AM, D'Almeida V. Chitotriosidase determination in plasma and in dried blood spot: a comparison using two different substrates in a microplate assay. *Clin Chim Acta* 2009; 406:86-8.
- [14] Gasparotto N, Tomanin R, Frigo AC, Niizawa G, Pasquini E, Blanco M, *et al.* Rapid diagnostic testing procedures for lysosomal storage disorders: α -glucosidase and β -galactosidase assays on dried blood spots. *Clin Chim Acta* 2009; 402:38-41.
- [15] Castilhos CD, Mezzalira J, Goldim MPS, Coelho JC. Influence of pre-analytical factors on α -galactosidase A, arylsulfatase B and α -glucosidase activities measured on dried blood spots on filter paper. *Clin Biochem* 2011; 44(10-11):922-26.
- [16] Preisler N, Lukacs Z, Vinge L, Madsen KL, Husu E, Hansen RS, *et al.* Late-onset Pompe disease is prevalent in unclassified limb-girdle muscular dystrophies. *Mol Genet Metab.* 2013; 110(3):287-9.
- [17] Lineweaver H, Burk D. The determination of enzyme dissociation constants. *J Am Chem Soc* 1934; 56:658– 66.
- [18] Van der Ploeg AT, Reuser AJ. Pompe's Disease. *Lancet* 2008 ;382:1342-53.
- [19] Sista RS, Wang T, Wu N, Graham C, Eckhardt A, Winger T, *et al.* Multiplex newborn screening for Pompe, Fabry, Hunter, Gaucher, and Hurler diseases using a digital microfluidic platform. *Clin Chim Acta.* 2013; 424:12-8.
- [20] Lukacs Z, Cobos PN, Keil A, Hartung R, Mengel E, Beck M, *et al.* Dried blood spots in the diagnosis of lysosomal storage disorders—Possibilities for newborn screening and high-risk population screening. *Clin Biochem* 2011; 44(7):476.
- [21] Müller KB, Rodrigues MDB, Pereira VG, Martins AM, D'Almeida V. Reference values for lysosomal enzymes activities using dried blood spots samples - a Brazilian experience. *Diagn Pathol* 2010; 29;5:65.
- [22] Kroos M, Hoogeveen-Westerveld M, Van der Ploeg A, Reuser A. The Genotype–Phenotype Correlation in Pompe Disease. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2012;160C(1):59-68.

Table 1. GAA enzyme activity in DBS samples from healthy individuals and Pompe disease patients.

Groups	Activity (nmol/20h/mL)	Range (nmol/20h/mL)
Controls	6.4±1.0	5.1 – 16
PD	0.07±0.005***	0 – 0.80

Results expressed as mean±SD, in pH 4.4 using 80µM inhibitor.

***Significant difference compared to the control group (p<0.001).

FIGURE CAPTIONS

Figure 1 – Effect of the inhibitor acarbose concentration on GAA residual enzyme activity in DBS in healthy controls (A) and Pompe disease patients (B). The data are expressed as mean±SD. *** $p < 0.001$ – Statistically different from the different inhibitor concentrations.

Figure 2 – Optimal pH of GAA enzyme in DBS from healthy controls and Pompe disease patients. The data are expressed as mean±SD. * $p < 0.05$ – Significantly different from the adjacent pH values.

Figure 3 – GAA substrate (Michaelis-Menten) curve in DBS from healthy controls using substrate concentrations from 2mM to 15mM. The data are expressed as mean±SD.

Figure 4 – GAA Lineweaver-Burk plot in DBS from healthy controls to determine K_m and V_{max} using substrate concentrations from 6mM to 9mM. V = velocity (nmol/20h/mL).

Figure 5 – Thermal stability of GAA in DBS from healthy controls (■) and Pompe disease patients (PD ▣) after pre-incubation at 50 °C. Enzyme activity is reported as the percentage of residual activity compared to samples not subjected to pre-incubation (100% activity) using acarbose 80μM. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$: significantly different from controls.

Figure 1

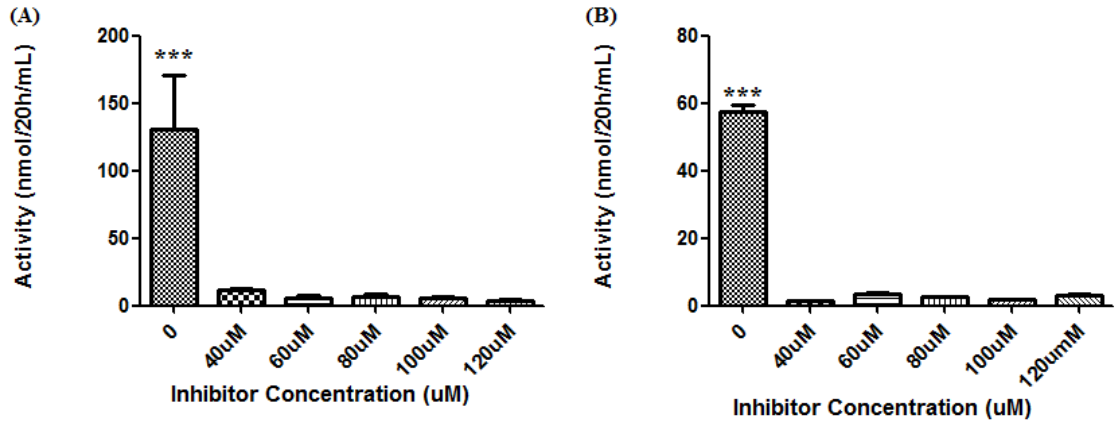


Figure 2

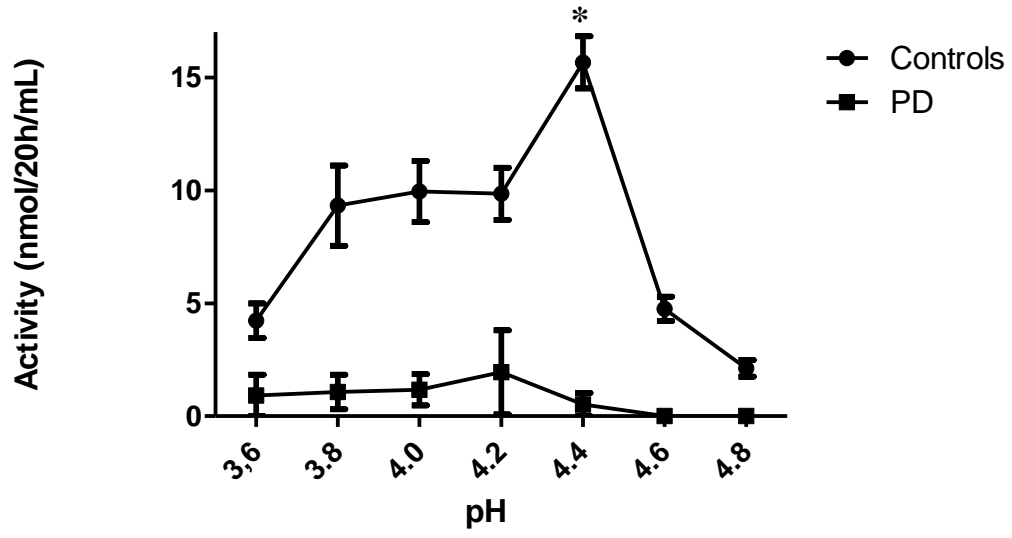


Figure 3

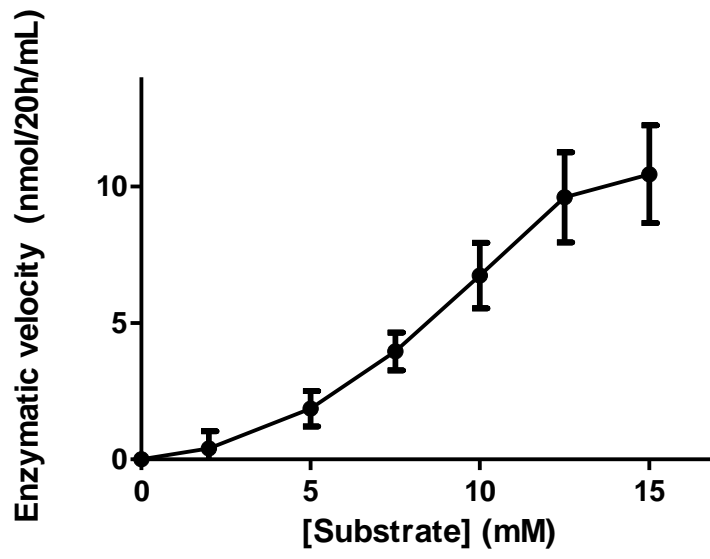


Figure 4

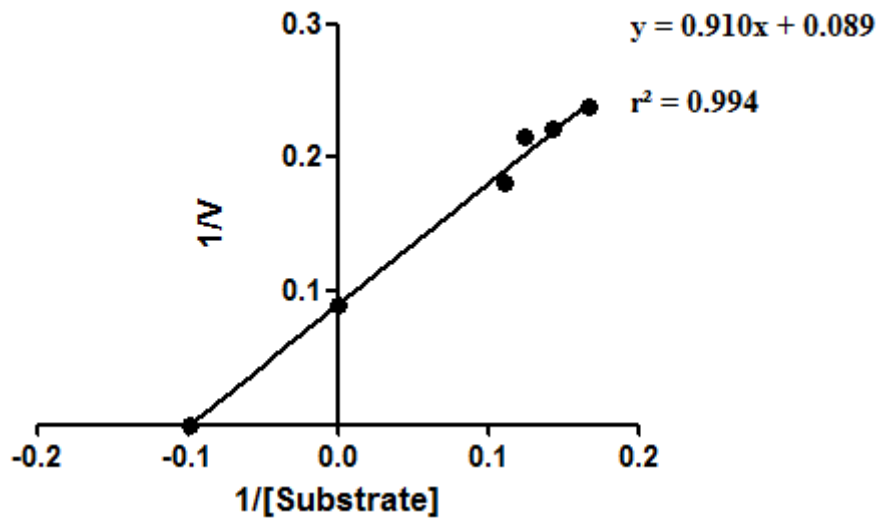
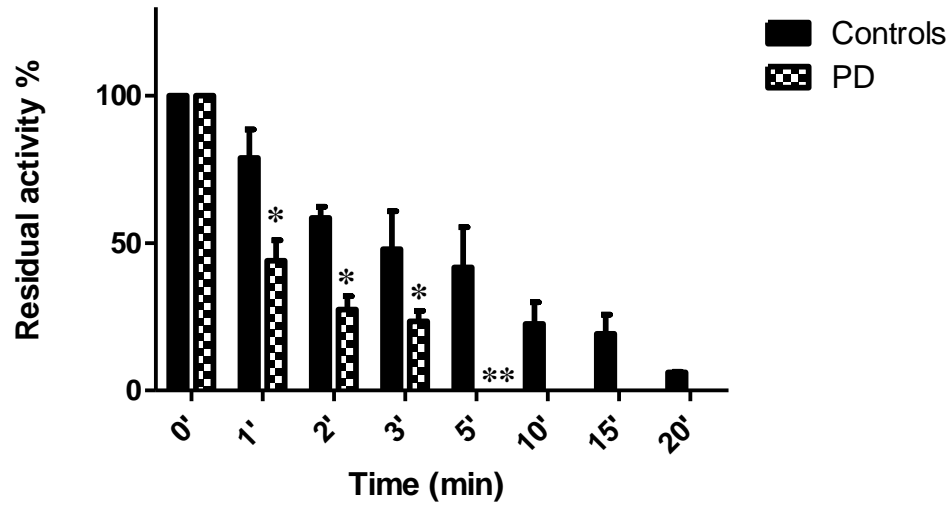


Figure 5



PARTE III

4. DISCUSSÃO

A Doença de Pompe é uma desordem lisossômica que ocorre devido a deficiência da enzima alfa-glicosidase ácida, levando ao acúmulo de glicogênio intralisossomal, gerando o aparecimento de lesões e sintomas clínicos (Lukacs *et al.*, 2010; Kallwass *et al.*, 2007; De Jesus *et al.*, 2009). Tendo em vista que a idade média no diagnóstico, na DP de início precoce, é em torno de 5 meses de idade, que o aparecimento dos sintomas se dá em torno de 2 meses de idade e que se a doença não for tratada pode levar a morte aos 9 meses de idade (Lukacs *et al.*, 2010; Chien *et al.*, 2013), o diagnóstico precoce da DP torna-se de fundamental importância não só para a eficácia do tratamento, mas também para a melhora na qualidade de vida do paciente (Kallwass *et al.*, 2007; Van der Ploeg *et al.*, 2008).

O diagnóstico da Doença de Pompe é realizado através da medida da atividade da GAA em células sanguíneas e tecidos ou, por análise da mutação gênica. O padrão-ouro para o diagnóstico é a medida da atividade da GAA em amostras de fibroblastos e, embora este tipo de diagnóstico seja definitivo, amostras de sangue também estão sendo utilizadas, pois esses testes são menos invasivos, mais rápidos e mais fáceis de padronizar (Winchester *et al.*, 2008).

No entanto, isoenzimas da alfa-glicosidase, presentes nas células sanguíneas, principalmente a maltase glicoamilase (MGA) podem contribuir para um aumento da atividade residual da GAA, gerando um resultado falso-negativo (Hirschhorn e Reuser, 2013; Chien *et al.*, 2013; Weida *et al.*, 2012; Kallwass *et al.*, 2007; Chamoles *et al.*, 2004). Desta forma, deve-se usar a acarbose como inibidor da MGA e garantir a confiabilidade dos resultados.

O uso de SPF vem sendo utilizado por muitos grupos para triagem de várias DLDs, incluindo a DP, através de diferentes métodos para análise enzimática (Lukacs *et al.*, 2010; Chamoles *et al.*, 2004; Shigueto *et al.*, 2011; Chiang *et al.*, 2012; Sista *et al.*, 2013). Além disso, a triagem para DP garante um diagnóstico precoce e o início do tratamento mais cedo (Chiang *et al.*, 2012).

Alguns pacientes podem apresentar atividade da GAA residual, que ultrapassa os valores estabelecidos para pacientes com DP ou, alelos pseudodeficientes que causam resultados falso-positivos (Chien *et al.*, 2013; Lukacs *et al.*, 2011; Van Diggelen *et al.*, 2009). Nestes casos, é indicada a análise molecular do gene da GAA para o estabelecimento do diagnóstico definitivo. Entretanto, o diagnóstico molecular é bastante demorado e tem custo elevado, devido a grande quantidade de mutações descritas, o elevado polimorfismo do gene e também a ausência de mutações comuns para DP (Chien *et al.*, 2013; Lukacs *et al.*, 2011; Van Diggelen *et al.*, 2009).

Sabendo que o diagnóstico bioquímico é mais rápido e mais barato que o diagnóstico molecular, o estudo das propriedades da GAA pode contribuir para aprimorar este tipo de diagnóstico. Assim, para melhor entender e padronizar a medida da atividade da GAA em leucócitos e SPF, o estudo do comportamento bioquímico da enzima, comparando a mesma em indivíduos normais e pacientes com DP é muito importante.

Considerando que existem poucos estudos caracterizando a GAA em leucócitos totais e que não há relatos na literatura descrevendo e caracterizando a GAA em SPF, avaliamos algumas características bioquímicas e cinéticas da enzima nestas amostras de modo a observar as diferenças quanto ao seu comportamento, tornando melhor a diferenciação entre os grupos e avaliando a possível utilização

como ferramenta auxiliar para o diagnóstico da DP utilizando leucócitos totais e como auxílio na triagem, neonatal e de populações de alto risco, da doença para amostras de SPF .

Além disso, determinamos parâmetros de validação das técnicas em leucócitos e SPF e observamos o efeito do inibidor acarbose, devido à variação nas concentrações utilizadas e relatadas na literatura com propósito de verificar ou não alterações na atividade da GAA, tendo como referencia inicial as concentrações de acarbose usadas nas técnicas descritas por Li *et al.* (2004) e Castilhos *et al.* (2011b), para leucócitos e SPF, respectivamente.

Inicialmente estudamos o efeito da concentração de inibidor na atividade da GAA em leucócitos. Observamos que na ausência de inibidor, a atividade da GAA estava significativamente elevada, tanto nas amostras de controles como em pacientes com DP. Isto devia-se ao fato da superposição entre as duas atividades enzimáticas, MGA e GAA, presentes nestas células, estando de acordo com o que já havia sido relatado na literatura (Li *et al.*, 2004; Okumiya *et al.*, 2006; Van Diggelen *et al.*, 2009). Ao utilizarmos o inibidor, observamos que em todas as concentrações utilizadas, houve diminuição significativa da atividade da GAA. Esta diminuição foi consequência da inibição da MGA nestas células. O que observamos, porém, ao utilizarmos várias concentrações de acarbose, foi que não havia diferença significativa, nem para os controles e nem para os pacientes com DP, entre as diferentes concentrações de inibidor utilizadas. Além disso, a acarbose não diminuiu mais a atividade da MGA em controles do que nos pacientes com DP, em nenhuma das concentrações utilizadas.

Nas amostras de SPF, observamos que na ausência de inibidor, a atividade da GAA está significativamente elevada, tanto enzima de controles saudáveis como

de pacientes com DP, como já havíamos observado em leucócitos. Então, utilizamos as mesmas concentrações de acarbose no ensaio e observamos que todas inibiram significativamente e na mesma magnitude a atividade da MGA, em ambos os grupos.

Sabendo-se que, a MGA, isoenzima presente em neutrófilos, está presente em amostras de leucócitos totais e SPF e, interfere nos resultados por exercer uma atividade enzimática residual que se sobrepõe a atividade da GAA, o uso da acarbose mostrou ser essencial no ensaio, pois é um inibidor seletivo da MGA, eliminando sua interferência no resultado.

Nossos resultados estão de acordo com estudos realizados por outros grupos (Winchester *et al.*, 2008; Lukacs *et al.*, 2010; Gasparotto *et al.*, 2009; Okumiya *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2009), que observaram que os pacientes foram identificados de forma confiável com o uso de acarbose, em amostras de leucócitos totais e SPF. Eles demonstraram que o uso da acarbose é essencial para diferenciar indivíduos saudáveis de pacientes com maior confiabilidade por eliminar a interferência da MGA (Kallwass *et al.*, 2007; Okumiya *et al.*, 2006).

Ao mesmo tempo, nossos resultados vão contra aqueles encontrados por Labousse *et al.* (2010) que não encontraram alterações significativas na atividade da GAA após o uso de 80µM de acarbose no ensaio em SPF; e por Duffey *et al.* (2010), Kallwass *et al.* (2007) que mostraram alterações significativas utilizando concentrações menores de acarbose em SPF. Em leucócitos, alguns trabalhos utilizam concentrações menores de acarbose e afirmam que são concentrações ideais pra inibição da MGA (Okumiya *et al.*, 2006; Winchester *et al.*, 2008).

Portanto, a concentração de acarbose geralmente utilizada pelos laboratórios pode variar conforme a técnica utilizada (Li *et al.*, 2004; Okumiya *et al.*, 2006;

Winchester *et al.*, 2008; Labrousse *et al.*, 2010; Castilhos *et al.*, 2011b). Segundo nossos resultados, a concentração de 80 μ M é capaz de inibir com muita eficácia tanto a enzima de indivíduos normais como de pacientes com DP, nas amostras utilizadas. Sendo assim, seguimos conforme aqueles autores que indicam o uso de uma concentração mais elevada (Li *et al.* 2004 e Castilhos *et al.* 2011b), e utilizamos 80 μ M de acarbose em todos os ensaios realizados. Assim, garantimos que a MGA não estava interferindo em nossos experimentos.

Os grupos a serem analisados neste trabalho, contavam com indivíduos sem doença metabólica ou outra doença previamente determinada (controles saudáveis) e pacientes já previamente diagnosticados com doença de Pompe por análise enzimática em fibroblastos (padrão ouro). Consideramos o estudo das características bioquímicas da GAA importante e de grande utilidade, pois no momento do diagnóstico por análise enzimática em leucócitos ou a triagem em SPF, muitas dúvidas podem surgir, principalmente neste último tipo de amostra. Apesar da técnica em SPF ser adequada e permitir uma identificação inicial de pacientes com DP, alguns pacientes, dependendo da mutação apresentada, podem ainda não ser identificados (Lukacs *et al.*, 2011).

Iniciamos nossos experimentos de caracterização bioquímica da GAA com os estudos de pH ótimo, de modo a identificarmos o pH de maior atividade enzimática e seguirmos os demais experimentos com este pH.

Em leucócitos, observamos que na faixa de pH de 3,6 a 4,8, não foi encontrado um único pH ótimo para a enzima, visto que a diferença na atividade da GAA em pHs adjacentes não foi significativa. O mesmo já havia sido relatado por Kohriyama *et al* (1989). Estes autores demonstraram que amostras de leucócitos totais de controles e pacientes não apresentaram um único pH ótimo, mas atividades

mais elevadas num intervalo de pH de 3 a 5. Apesar disso, uma atividade mais aumentada da GAA, embora não significativamente, foi observada em nosso trabalho em pH 4,0 para controles e em pH 4,4 para pacientes. Como na técnica original de medida da atividade da GAA em leucócitos (Li *et al.*, 2004) é utilizado pH 4,0, resolvemos seguir com este pH, pois ele estava dentro da faixa de maior atividade para controles. Além disso, como não houve diferença significativa dos demais pHs nas amostras utilizadas, devemos levar em consideração que num ensaio enzimático para diagnóstico não sabemos se as amostras são de indivíduos normais ou pacientes. Desta forma, o ensaio é realizado num único pH, e resolvemos escolher o que apresentou maior média de atividade para GAA em amostras de controles.

Em SPF, no intervalo de pH utilizado, houve diferença significativa na atividade da GAA nas amostras de controles saudáveis no pH 4,4. Neste pH a atividade foi significativamente maior sendo este considerado o pH ótimo da GAA. Para as amostras de pacientes com DP, não foi encontrado um único pH ótimo, visto que a diferença na atividade da GAA em pHs adjacentes não foi significativa. Observamos uma atividade mais aumentada da GAA, embora não significativamente, no pH 4,2. Desta forma, prosseguimos os demais experimentos utilizando o pH ótimo encontrado para as amostras de controles, que foi 4,4. Isto facilita a análise enzimática no momento da triagem, pois neste momento não sabemos se estamos trabalhando com uma amostra de indivíduo normal ou com DP e o uso de um único pH no ensaio torna a análise muito mais prática.

Em seguida, foi determinado o K_m e a V_{max} da GAA nos dois tipos de amostra estudados. Em leucócitos, o K_m dos grupos analisados, revelou uma diferença significativa entre os resultados encontrados. O K_m dos pacientes

(1.5mM), foi claramente mais baixo daquele observado nos controles (5,6mM). No trabalho de Kohriyama *et al* (1989), eles demonstraram valores de Km similares entre pacientes e controles, porém, em amostras de linfócitos. Por serem os linfócitos células mais purificadas, não temos como comparar estes resultados com os nossos, em leucócitos totais.

Da mesma forma, a Vmax encontrada nas amostras de leucócitos de pacientes (0,4nmol/h/mg de proteínas), foi significativamente menor que aquela encontrada nos controles (11,4nmol/h/mg de proteínas). Este resultado era esperado, visto que os controles apresentam a GAA funcionando normalmente, o que não ocorre nos pacientes. Kohriyama *et al* (1989), também demonstraram valores de Vmax diferentes entre pacientes e controles, porém, em amostras de linfócitos.

O Km e a Vmax obtidos para controles saudáveis, em amostras de SPF, foram 10,2mM e 11,2nmol/20h/mL respectivamente. Para pacientes com DP, não foi possível determinar os valores de Km e Vmax, pois os valores não foram detectáveis nas concentrações de substrato utilizadas. Não há dados na literatura para compararmos os resultados aqui obtidos.

Por fim, estudamos a estabilidade térmica da GAA. Considerando o estudo da estabilidade térmica, podemos observar que ocorreu inativação térmica da GAA nas amostras de leucócitos totais à 60°C nos dois grupos analisados. Podemos observar que em 5min de pré-incubação já inicia o processo de inativação da enzima de indivíduos normais. Neste momento, a porcentagem de atividade residual da enzima dos pacientes é superior a dos controles saudáveis. A enzima dos pacientes somente irá inativar, significativamente, após 10 minutos de incubação. Isto nos mostra ser um parâmetro que pode auxiliar a diferenciar os dois grupos.

A partir dos 10min de pré-incubação da GAA à 60°C, a atividade cai e a inativação ocorre de forma gradual até o tempo de 60min tanto nas amostras de controles como em pacientes com DP. Neste momento, a porcentagem de atividade residual da enzima dos pacientes é menor que aquela da enzima dos controles, mas não significativamente. Talvez não tenhamos estabelecido esta diferença estatística devido à grande variação nas atividades da GAA dos pacientes, o que aumenta o desvio padrão da amostra e dificulta a realização do teste estatístico. A atividade residual da GAA dos controles após 60min de pré-incubação foi de 21% enquanto, a atividade residual da GAA dos pacientes foi 7,1%.

Embora essa atividade residual da GAA em leucócitos de pacientes tenha sido menor que a dos controles, mas não de maneira significativa, a inativação térmica pode representar um parâmetro que nos permite discriminar os dois grupos. Kohriyama *et al* (1989), verificaram a estabilidade térmica da GAA à 56°C em pacientes e controles, porém, em amostras de linfócitos e granulócitos. Em linfócitos, a GAA mostrou-se relativamente estável nos dois grupos, sendo que os pacientes apresentaram porcentagem de atividade menor. Em granulócitos, a GAA foi inativada facilmente e não houve diferença entre pacientes e controles.

Considerando a estabilidade térmica em amostras de SPF, podemos observar que ocorreu inativação térmica da GAA à 50°C nos dois grupos analisados. Observamos que em 1min de pré-incubação, já inicia o processo de inativação da GAA em amostras de pacientes com DP, enquanto nas amostras de controles a inativação inicia somente aos 3min de pré-incubação. Portanto, a enzima de indivíduos normais é mais termoestável que aquela dos pacientes. Isto é um parâmetro que pode auxiliar a diferenciar os dois grupos.

Após iniciar o processo de inativação, o mesmo ocorreu de forma gradual até o tempo de 20min nas amostras de controles, e a porcentagem de atividade residual da GAA neste momento foi de 6%. De outra forma, observamos que nas amostras de pacientes, embora a inativação ocorresse também de forma gradual, a enzima foi totalmente inativada aos 5 minutos de pré-incubação. O comportamento de inativação da enzima nos dois grupos, foi, portanto, significativamente diferente o que torna a inativação térmica aos 50°C, um bom parâmetro para diferenciar os grupos em amostras de SPF.

Para a validação e determinação da precisão da técnica em leucócitos e SPF foram estabelecidos três coeficientes de variação: intra-ensaio, interensaio e interpessoal. Os coeficientes de variação calculados para GAA em leucócitos, de controles saudáveis, foram, respectivamente, 5%, 9% e 7%. Existem poucos trabalhos na literatura estabelecendo os CV para amostras de leucócitos para GAA. Van Diggelen *et al* (2009) estabeleceram valores de CV interensaio de 14,6%.

Os coeficientes de variação calculados para GAA em SPF, de controles saudáveis, foram, respectivamente, 10%, 19% e 15%. Os CV intra-ensaio e interensaio aqui obtidos são semelhantes aos obtidos por outros grupos (Gasparotto *et al.*, 2009; Lukacs *et al.*, 2010; Sista *et al.*, 2013).

Segundo vários autores, um coeficiente de variação aceitável é aquele até 20% (Lukacs *et al.*, 2011; Müller *et al.*, 2010). Desta forma, nossos valores de CV são aceitáveis e expressam boa precisão e reprodutibilidade da técnica quando leucócitos e SPF são utilizados.

Quando comparamos as atividades enzimáticas, em leucócitos totais, entre controles saudáveis e indivíduos com DP, observamos uma diferença significativa entre os dois grupos. Não só a atividade média da GAA em leucócitos de pacientes

era significativamente menor que aquela dos controles, como o intervalo de atividade obtido não permitiu sobreposição entre os dois grupos. Os valores aqui encontrados para os indivíduos normais estão de acordo com aqueles observados na literatura (Hirschhorn e Reuser, 2013; Chien *et al.*, 2013).

Dependendo da mutação apresentada, pacientes com DP apresentam atividade muito variável da GAA, podendo chegar a 30% daquela de indivíduos normais nas mais diversas amostras biológicas (Chien *et al.*, 2013; Lukacs *et al.*, 2011). Quando comparamos, neste trabalho, a atividade da GAA, em SPF, entre controles saudáveis e indivíduos com DP, observamos que a atividade enzimática dos pacientes foi aproximadamente 1% daquela dos controles, sendo esta diferença significativa. Não só a atividade média da GAA em SPF de pacientes foi significativamente menor que aquela dos controles, como o intervalo de atividade obtido também não permitiu sobreposição entre os dois grupos. Os resultados aqui encontrados para os indivíduos normais estão de acordo com aqueles observados na literatura (Winchester *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2009; Lukacs *et al.*, 2010).

Considerando que, nas amostras analisadas, os resultados das médias das atividades entre os grupos foi significativamente diferente, os intervalos são bem distintos, o uso do inibidor acarbose demonstrou eficácia e confiabilidade nos resultados, sendo essencial no ensaio por inibir de forma seletiva a isoenzima MGA, e os coeficientes de variação das técnicas empregadas foram aceitáveis, nossos resultados permitem inferir que a técnica fluorimétrica em leucócitos utilizando o substrato 4-Metilumbeliferil- α -D-glicopiranosídeo é confiável podendo ser utilizada para diagnóstico definitivo e padrão da Doença de Pompe, como já vem sendo utilizada por outros grupos (Okumiya *et al.*, 2006; Van Diggelen *et al.*, 2009). Da mesma forma, nossos resultados permitem inferir que a técnica fluorimétrica em SPF

é confiável podendo ser utilizada como triagem da Doença de Pompe, como vem sendo realizada por outros grupos (Shiguetto *et al.*, 2011; Chiang *et al.*, 2012; Castilhos *et al.*, 2011b; Sista *et al.*, 2013).

Neste trabalho nós conseguimos estabelecer que o uso do inibidor acarbose é essencial para a análise da atividade enzimática da GAA, sendo que ele, ao inibir a atividade da MGA em pacientes com DP garante o diagnóstico desta doença. Também determinamos níveis de referência da atividade da GAA tanto em controles quanto em pacientes com DP em amostras de leucócitos e SPF e validamos as duas técnicas. Além disso, ao caracterizarmos bioquimicamente a GAA de leucócitos e SPF, melhoramos as condições de diagnóstico daqueles pacientes que não podem ser diagnosticados simplesmente pela medida da atividade enzimática.

5. CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho permitem concluir:

- a) O uso do inibidor acarbose é essencial para a análise enzimática da GAA em amostras de leucócitos totais e SPF por inibir seletivamente a isoenzima MGA e assim, garantir o diagnóstico da DP.
- b) Os valores de coeficiente de variação estabelecidos para técnicas em leucócitos e SPF estão dentro do aceitável e expressam boa precisão e reprodutibilidade das técnicas.
- c) A enzima alfa-glicosidase ácida foi caracterizada bioquimicamente, através da determinação dos parâmetros cinéticos: K_m , Velocidade máxima, pH ideal e termoestabilidade em amostras de SPF e leucócitos de controles saudáveis e pacientes com Doença de Pompe;
- d) A GAA de pacientes com DP mostrou um comportamento diferente do observado em controles saudáveis em termos dos parâmetros analisados (K_m , V_{max} , estabilidade térmica), em leucócitos totais. Em SPF, GAA mostrou um comportamento diferente do observado nos controles saudáveis em termos de pH ótimo e estabilidade térmica; e valores de K_m e V_{max} para GAA foram estabelecidos somente em SPF de controles saudáveis.
- e) A técnica fluorimétrica usando o substrato 4-Metilumbeliferil- α -D-glicopiranosídeo em leucócitos é confiável podendo ser utilizada para diagnóstico definitivo e padrão da Doença de Pompe. Em SPF, pode contribuir para melhorar a triagem desta doença tornando o processo de investigação mais preciso e confiável.

6. REFERÊNCIAS

Adam BW, Orsini Jr. JJ, Martin M, Hall EM, Zobel SD, Caggana M, *et al.* (2011) The preparation and storage of dried-blood spot quality control materials for lysosomal storage disease screening tests. *Clin Biochem.* 44(8-9):704-10.

Alberts B, Jhonson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2010) Tráfego Intracelular de Vesículas. In: *Biologia Molecular da Célula*. 5ed. Porto Alegre : Artmed.

American Association of Neuromuscular & Electrodiagnostic Medicine (AANEM). (2009) Diagnostic criteria for late-onset (childhood and adult) Pompe, disease. *Muscle Nerve.* 40:149–160.

Boustany RM. (2013) Lysosomal storage diseases - the horizon expands. *Nat Rev Neurol.* 9(10):583-98.

Brand GD, de Matos HC, da Cruz GC, Fontes Ndo C, Buzzi M, Brum JM. (2013) Diagnosing lysosomal storage diseases in a Brazilian non-newborn population by tandem mass spectrometry. *Clinics (São Paulo).* 68(11):1469-73.

Castilhos, Cristina Dickie de. (2011a) Determinação da atividade de hidrolases lisossômicas em sangue colhido em papel filtro, uma alternativa para triagem em populações de alto risco. Tese de Doutorado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, RS.

Castilhos CD, Mezzalira J, Goldim MPS, Coelho JC. (2011b) Influence of pre-analytical factors on α -galactosidase A, arylsulfatase B and α -glucosidase activities measured on dried blood spots on filter paper. *Clin Biochem.* 44(10-11):922-26.

Castilhos CD, Mezzalira, J, Goldim, MPS, Werlang, FG, Coelho, JC. (2011c). Effect of sample collection, temperature and time of storage on β -galactosidase and

total hexosaminidase activities in dried blood collected on filter paper. *Clin Chem Lab Med.* 49(8):1299-302.

Castilhos CD, Mezzalira J, Goldim MPS, Daitx VV, Garcia CS, Andrade CV, *et al.* (2014) Determination of the lysosomal hydrolase activity in blood collected on filter paper, an alternative to screen high risk populations. *Gene.*536(2):344-7.

Chamoles NA, Niizawa G, Blanco M, Gaggioli D, Casentini C. (2004) Glycogen storage disease type II: enzymatic screening in dried blood spots on filter paper. *Clin Chim Acta.* 347(1-2):97-102.

Chen Y, Kishnani P.S., Koeberl D. (2013). Glycogen Storage Diseases. In Valle D, Beaudet A.L., Vogelstein B, Kinzler K.W., Antonarakis S.E., Ballabio A, Gibson K, Mitchell G (Eds), *OMMBID - The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*. Retrieved March 06, 2014 from <http://ommbid.mhmedical.com/content.aspx?bookid=474&Sectionid=45374051>.

Chiang SC, Hwu WL, Lee NC, Hsu LW, Chien YH. (2012) Algorithm for Pompe disease newborn screening: Results from the Taiwan screening program. *Mol Genet Metab.* 106(3):281-6.

Chien YH, Hwu WL, Lee NC. (2013) Pompe Disease: Early Diagnosis and Early Treatment Make a Difference. *Pediatr Neonatol.* 54(4):219-27.

Childs B, Valle D, Jimenez-Sanchez G (2013). The Inborn Error and Biochemical Ballabio A, Gibson K, Mitchell G (Eds), *OMMBID - The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*. Retrieved March 05, 2014 from Individuality. In Valle D, Beaudet A.L., Vogelstein B, Kinzler K.W., Antonarakis S.E., <http://ommbid.mhmedical.com/content.aspx?bookid=474&Sectionid=45373955>.

Civallero G, Michelin K, de Mari J, Viapiana M, Burin M, Coelho JC, *et al.* (2006) Twelve different enzyme assays on dried-blood filter paper samples for detection of patients with selected inherited lysosomal storage diseases. *Clin Chim Acta.*372:98-102.

De Jesus VR, Zhang XK, Keutzer J, Bodamer OA, Mühl A, Orsini JJ, *et al.* (2009) Development and evaluation of quality control dried blood spot materials in newborn screening for lysosomal storage disorders. *Clin Chem* 55:158–64.

Derosa G, Maffioli P. (2012) α -Glucosidase inhibitors and their use in clinical practice. *Arch Med Sci.* 8(5):899-906.

Duffey TA, Bellamy G, Elliott S, Fox AC, Glass M, Turecek F, *et al.* (2010) A tandem mass spectrometry triplex assay for the detection of Fabry, Pompe, and mucopolysaccharidosis-I (Hurler). *Clin Chem.* 56:1854-61.

Ellaway, CJ, Wilcken, B, Christodoulou. (2002) Neonatology for the generalist clinical approach to iborn errors of metabolism presenting in the newborn period. *J. Paediatr. Child Health.* 38: 511-17.

Gasparotto N, Tomanin R, Frigo AC, Niizawa G, Pasquini E, Blanco M, *et al.* (2009) Rapid diagnostic testing procedures for lysosomal storage disorders: α -glucosidase and β -galactosidase assays on dried blood spots. *Clin Chim Acta.* 402:38-41.

Goldim MPS, Garcia CS, de Castilhos CD, Daitx VV, Mezzalira J, Breier AC, *et al.* (2012) Screening of high-risk Gaucher disease patients in Brazil using miniaturized dried blood spots and leukocyte techniques. *Gene.* 508(2):197-8.

Hirschhorn R, Reuser A.J. (2013). Glycogen Storage Disease Type II: Acid. InValle D, Beaudet A.L., Vogelstein B, Kinzler K.W., Antonarakis S.E., Ballabio A, Gibson K, Mitchell G (Eds), *OMMBID - The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*. Retrieved March 05, 2014 from <http://ommbid.mhmedical.com/content.aspx?bookid=474&Sectionid=45374135>.

Kallwass H, Carr C,Guerein J, Titlow M, Pomponio R, Bali D, *et al.* (2007) Rapid diagnosis of late-onset Pompe disease by fluorometric assay of α -glucosidase activities in dried blood spots. *Mol Genet Met.* 90(4):449-52.

Kishnani PS, Steiner RD, Bali D, Berger K, Byrne BJ, Case LE, *et al.* (2006) Pompe disease diagnosis and management guideline. *Genet Med.* 8:267-88.

Kohriyama T, Kuriyama M, Hiwatari R, Osame M, Igata A. (1989) Partial Characterization of Leucocyte α -Glucosidase in Late Onset Glycogenosis Type II. *Tohoku J Exp Med* 157:355-63.

Labrousse P, Chien YH, Pomponio RJ, Keutzer J, Lee NC, Akmaev VR, *et al.* (2010) Genetic heterozygosity and pseudodeficiency in the Pompe disease newborn screening pilot program. *Mol Genet Metab.* 99:379-83.

Lampe, Christina, Cinzia Maria Bellettato, Nesrin Karabul, and Maurizio Scarpa. (2013) "Mucopolysaccharidoses and Other Lysosomal Storage Diseases." *Rheumatic diseases clinics of North America* 39(2): 431–55.

Li Y, Scott R, Chamoles NA, Ghavami A, Pinto BM, Turecek F, *et al.* (2004) Direct multiplex assay of lysosomal enzymes in dried blood spots for newborn screening. *Clin Chem.* 50(10):1785-96.

Lieberman M, Marks AD, Peet A, Chansky M. (2013) Relationship between Cell Biology and Biochemistry. In: Marks' basalical medical biochemistry: a clinical approach. 4th ed. Philadelphia: Wolter Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.

Lukacs Z, Cobos PN, Keil A, Hartung R, Mengel E, Beck M, *et al.* (2011) Dried blood spots in the diagnosis of lysosomal storage disorders—Possibilities for newborn screening and high-risk population screening. *Clin Biochem.* 44(7):476.

Lukacs Z, Cobos PN, Mengel E, Hartung R, Beck M, Deschauer M, *et al.* (2010) Diagnostic efficacy of the fluorometric determination of enzyme activity for Pompe disease from dried blood specimens compared with lymphocytes - possibility for newborn screening. *J Inherit Metab Dis.* 33(1):43-50.

Mak CM, Lee HC, Chan AY, Lam CW. (2013) Inborn errors of metabolism and expanded newborn screening: review and update. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 50(6):142-62.

Müller KB, Rodrigues MDB, Pereira VG, Martins AM, D'Almeida V. (2010) Reference values for lysosomal enzymes activities using dried blood spots samples - a Brazilian experience. *Diagn Pathol.* 29;5:65.

Nelson DL, Cox MM. (2011) *Princípios de Bioquímica de Lehninger.* 5ed. Porto Alegre: Artmed.

Okumiya T, Keulemans JLM, Kroos M, Van der Beck NME, Boer MA, Takeuchi H, *et al.* (2006) A new diagnostic assay for glycogen storage disease type II in mixed leukocytes. *Mol Genet Metab* 88:22-8.

Pastores GM, Maegawa GHB. (2013) Clinical Neurogenetics Neuropathic Lysosomal Storage Disorders. *Neurol Clin.* 31(4):1051-71.

Raben N, Plotz P, Byrne BJ. (2012) Acid α -Glucosidase Deficiency (Glycogenosis Type II, Pompe Disease). *Curr Mol Med.* 2(2):145-66.

Rodrigues MD, de Oliveira AC, Müller KB, Martins AM, D'Almeida V. (2009) Chitotriosidase determination in plasma and in dried blood spot: a comparison using two different substrates in a microplate assay. *Clin Chim Acta.* 406:86-8.

Saudubray JM, Desguerre I, Sedel F, Charpentier C. (2006) A Clinical Approach to Inherited Metabolic Diseases. In: Fernandes J, Saudubray JM, Van Den Berghe G, Walter JH (Eds) *Inborn Metabolic Diseases, Diagnosis and Treatment.* 4th ed. Würzburg: Springer Medizin Verlag, p. 4-48.

Scriver SR, Beaudet al, Sly WS, Valle D. (2001) *The metabolic and molecular bases of inherited disease.* New-York: McGraw-Hill.

Shigueto S, Katafuchi T, Okada Y, Nakamura K, Endo F, Okuyama T, *et al.* (2011) Improved assay for differential diagnosis between Pompe disease and acid α -glucosidase pseudodeficiency on dried blood spots. *Mol Genet Met.* 103(1):12-7.

Sista RS, Wang T, Wu N, Graham C, Eckhardt A, Winger T, *et al.* (2013) Multiplex newborn screening for Pompe, Fabry, Hunter, Gaucher, and Hurler diseases using a digital microfluidic platform. *Clin Chim Acta.* 424:12-8.

Sneader, W. (2005) Pharmacodynamic Agents from Micro-organisms. In: *Drug Discovery. A History.* John Wiley & Sons Ltd.

Spada M, Porta F, Vercelli L, Pagliardini V, Chiadò-Piat L, Boffi P, *et al.* (2013) Screening for later-onset Pompe's disease in patients with paucisymptomatic hyperCKemia. *Mol Genet Metab.* 109(2):171-3.

Staretz-Chacham, O, Lang, TC, LaMarca, ME, Krasnewich, D, Sidransky, E. (2009) Lysosomal Storage Disorders in the Newborn. *Pediatrics.* 123: 1191-1207.

Van der Ploeg AT, Reuser AJ. (2008) Pompe's Disease. *Lancet.* 382:1342-53.

Van Diggelen OP, Oemardien LF, Van der Beek NA, Kroos MA, Wind HK, Voznyi YV, *et al.* (2009) Enzyme analysis for Pompe disease in leukocytes; superior results with natural substrate compared with artificial substrates. *J Inher Met Dis* 32:416-23

Wang RY, Bodamer OA, Watson MS, Wilcox WR. (2011) Lysosomal storage diseases: diagnostic confirmation and management of presymptomatic individuals. *Genet Med.* 13(5):457-84.

Weida J, Hainline BE, Bodkin C, Williams MK. (2012) Management of a Pregnancy Complicated by Pompe Disease. *Case Rep Obstet Gynecol.* 2012:137861.

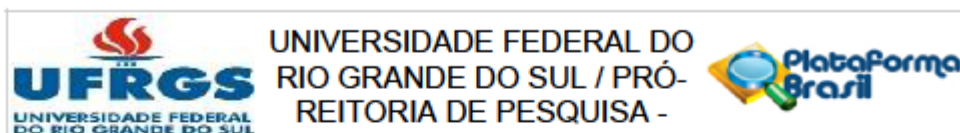
Wenger DA, Coppola S, Liu SL. (2003) Insights Into the Diagnosis and Treatment of Lysosomal Storage Diseases. *Arch Neurol.* 60:322-8.

Wilcox WR. (2004) Lysosomal storage disorders: the need for better pediatric recognition and comprehensive care. *J Pediatr.* 144(5 Suppl):S3-14.

Winchester B, Bali D, Bodamer OA, Caillaud C, Christensen E, Cooper A, *et al.* (2008) Methods for a prompt and reliable laboratory diagnosis of Pompe disease: Report from an international consensus meeting. *Mol Genet Met.* 93(3):275-81.

7. ANEXOS

7.1 Parecer Consubstanciado Emitido pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo das Propriedades Bioquímicas da Enzima Alfa-Glicosidase Ácida de Pacientes com Doença de Pompe em Diferentes Amostras Biológicas: Comparação com a Enzima de Indivíduos Normais

Pesquisador: Janice Carneiro Coelho

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 08040312.7.0000.5347

Instituição Proponente: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 152.525

Data da Relatoria: 08/11/2012

Apresentação do Projeto:

Todas as pendências apontadas em parecer anterior foram atendidas, de forma que o projeto encontra-se aprovado.

Objetivo da Pesquisa:

Todas as pendências apontadas em parecer anterior foram atendidas, de forma que o projeto encontra-se aprovado.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Todas as pendências apontadas em parecer anterior foram atendidas, de forma que o projeto encontra-se aprovado.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Todas as pendências apontadas em parecer anterior foram atendidas, de forma que o projeto encontra-se aprovado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todas as pendências apontadas em parecer anterior foram atendidas, de forma que o projeto encontra-se aprovado.

Recomendações:

Recomendamos aprovação.

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - 2º andar do Prédio da Reitoria - Campus Centro
 Bairro: Farroupilha CEP: 90.040-060
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE
 Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-4085 E-mail: etica@propesq.ufrgs.br

7.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Único

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar de um trabalho intitulado ***“Estudo das propriedades bioquímicas da enzima alfa-glicosidase ácida de pacientes com Doença de Pompe em diferentes amostras biológicas: comparação com a enzima de indivíduos normais”***, cujo objetivo é caracterizar bioquimicamente, através da determinação de parâmetros cinéticos, a enzima alfa-glicosidase ácida de modo a melhor diferenciação entre controles saudáveis e pacientes com Doença de Pompe em diferentes amostras biológicas. Este estudo será de importância para o estabelecimento de novas formas de diagnóstico na área de doenças lisossômicas de depósito.

O estudo será desenvolvido no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo–Doenças Lisossômicas de Depósito (LEIM-DLD) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os pesquisadores responsáveis pelo estudo são a profa. Dra. Janice Carneiro Coelho e a mestrandia Jamila Mezzalira da UFRGS. Em qualquer etapa do estudo você terá acesso aos pesquisadores responsáveis para o esclarecimento de eventuais dúvidas através do telefone (51) 33085549. Além disso, a secretária do Comitê de Ética em pesquisa da UFRGS, telefone (51) 33083738, também poderá ser contatada para apresentar recursos ou reclamações em relação ao estudo.

Procedimentos a serem realizados / Riscos individuais

Está sendo solicitada a doação de 9mL de sangue periférico. O desconforto causado será o de uma coleta habitual de sangue (e o risco da coleta é considerado mínimo). Fica claro que sua participação na pesquisa é voluntária, sendo que você poderá desistir de fazer parte do trabalho a qualquer momento, sem qualquer tipo de constrangimento, restrições ou conseqüências por parte dos pesquisadores. No caso de aceite, fica claro que não haverá benefício financeiro pela sua participação, nem riscos ou prejuízos à saúde.

Confidencialidade

O material será utilizado apenas para fins do projeto de pesquisa, sendo garantida a confidencialidade das informações obtidas, sendo reservado ao doador acesso às mesmas. Além disto, os dados receberão um número pelo qual serão identificados, garantindo assim, também, o anonimato dos participantes. A identidade dos participantes será desconhecida pela equipe do trabalho de pesquisa.

Pelo presente, declaro que fui devidamente informado sobre o projeto de pesquisa de forma clara e detalhada, da liberdade de não participar do estudo e tive minhas dúvidas esclarecidas. Concordo, voluntariamente, em participar deste estudo e estou ciente que receberei uma cópia desse termo de consentimento livre e esclarecido, onde se encontra o objetivo do projeto e os contatos dos pesquisadores e do comitê de ética em pesquisa da UFRGS.

Na impossibilidade de autonomia para a leitura deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, o mesmo foi lido para _____ (*preencher com nome do(a) doador(a)*) pelo pesquisador _____ (*preencher com nome do pesquisador*) enquanto eu estava presente como testemunha.

Identificação do voluntário

Nome: _____

Data: _____, _____ / _____ / _____

Pesquisadora responsável: Profa. Dra. Janice Carneiro Coelho

Pesquisadora: Jamila Mezzalira

Assinatura Pesquisador Responsável

Assinatura Voluntário

7.3 Termo de Concordância Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)

Porto Alegre, 22 de junho de 2012.

Termo de Concordância - HCPA

Ilmo Sr.

Tor Onsten

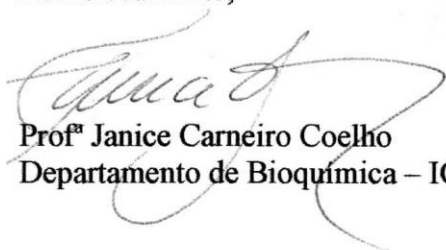
Serviço de Hemoterapia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre
N/HCPA

Prezado Senhor:


Venho por meio desta solicitar a concordância para coleta de 12 amostras de sangue contendo 10 mL cada, para a realização do projeto “Estudo das propriedades bioquímicas da enzima alfa-glicosidase ácida de pacientes com Doença de Pompe em diferentes amostras biológicas: comparação com a enzima de indivíduos normais” que está sendo desenvolvido pela mestrandia Jamila Mezzalira do PPG Bioquímica-UFRGS. As amostras solicitadas serão para uso deste projeto como grupo controle durante as dosagens enzimáticas em leucócitos, plasma e sangue impregnado em papel filtro.

Outrossim, informo que o ideal seria o fornecimento das amostras as 8h da manhã e na quantidade de 5 de cada vez, a fim de melhor atender o cronograma do projeto.

Atenciosamente,



Prof^a Janice Carneiro Coelho
Departamento de Bioquímica – ICBS – UFRGS



Responsável pelo Serviço de Hemoterapia do HCPA

HCPA
Prof. Dr. Tor Gunnar Hugo Onsten
Chefe do Serviço de Hemoterapia
CREMERS 13078

7.4 Termo de Concordância Associação Carioca dos Portadores de Distrofia Muscular (ACADIM)

Porto Alegre, 23 de outubro de 2012.

Termo de Concordância – Associação Carioca dos Portadores de Distrofia Muscular (ACADIM)

Ilmo Sra.

Maria Clara Migowski Pinto


Presidente da Associação Carioca dos Portadores de Distrofia Muscular

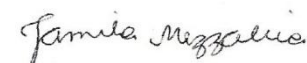
Prezada Senhora:

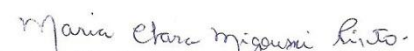
Venho por meio desta, solicitar a concordância para entrar em contato com as famílias portadoras da Doença de Pompe e convidá-las a participarem na realização do projeto de mestrado "Estudo das Propriedades Bioquímicas da Enzima Alfa-Glicosidase Ácida de Pacientes com Doença de Pompe em Diferentes Amostras Biológicas: Comparação com a Enzima de Indivíduos Normais" que está sendo desenvolvido pela aluna Jamila Mezzalira do PPG Bioquímica/UFRGS sob a orientação da Profa. Janice Carneiro Coelho, do mesmo curso. Este projeto tem por objetivo principal melhorar o diagnóstico desta doença. As amostras solicitadas serão de uso exclusivo deste projeto. As mesmas serão processadas para a medida da atividade enzimática e estudos bioquímicos em leucócitos e sangue impregnado em papel filtro.

Outrossim, informo que o convite para participação da pesquisa poderá ser feito através de e-mail desta Associação e exposição de cartaz na sede da mesma.

Atenciosamente,


Prof.^a Janice Carneiro Coelho
Departamento de Bioquímica – ICBS/UFRGS


Jamila Mezzalira
Mestranda


Ciente: Maria Clara Migowski Pinto
Presidente da Associação Carioca de Distrofia