

1. INTRODUÇÃO

1.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO

Os Erros Inatos do Metabolismo (EIM) compõem um vasto grupo de distúrbios genéticos ocasionados principalmente por deficiências enzimáticas específicas ou decorrentes de falhas no transporte de proteínas, que podem resultar no acúmulo de substâncias normalmente presentes em pequena quantidade, a deficiência de produtos intermediários críticos, a deficiência de produtos finais específicos ou ainda o excesso prejudicial de vias metabólicas acessórias. Esse grupo de doenças representa cerca de 10% de todas as doenças genéticas. Em grande parte, são doenças multissistêmicas e podem se manifestar em qualquer faixa etária (SOUZA et al, 2007).

Os EIM são considerados a causa das Doenças Metabólicas Hereditárias (DMH) em que a ausência de um produto esperado, acúmulo de substrato da etapa anterior interrompida ou o surgimento de uma rota metabólica alternativa podem levar ao comprometimento dos processos celulares (SOUZA et al, 2007).

Neste sentido, os EIM podem ser didaticamente divididos em dois grandes grupos: os de pequenas moléculas (aminoacidúrias, acidemias orgânicas, intolerância a açúcares, etc.) e os de moléculas complexas (doenças de depósito lisossômico, distúrbios peroxissomais) (TABELA 1). Pacientes portadores de defeitos do metabolismo de pequenas moléculas apresentam um quadro de intoxicação devido ao acúmulo de moléculas não metabolizadas corretamente, apresentando sintomas relacionados como vômito, convulsão, atraso no desenvolvimento psicomotor e físico, hipotonia, morte súbita na infância, entre outros (WAJNER et al., 2001).

Tabela 1- Doenças de defeito de pequenas moléculas (*Continua*).

Aminoácidos

Hiperfenilalaninemias
 Tirosinemias
 Doença da Urina do Xarope de Bordo
 Hiperglicemia não-cetótica
 Homocistinúria
 Cistinúria

Tabela 1- Doenças de defeito de pequenas moléculas (*Continuação*).

Ácidos Orgânicos	Acidemia propiônica Acidemia Metilmalônica Acidemia Glutárica Acidemia Isovalérica
Defeitos do ciclo da uréia	Deficiência de ornitina transcarbamilase Deficiência de carbamílfosfatase sintase I Acidúria Arginosuccínica Argininemia Intolerância Lisinúrica à proteína
Metabolismo Eneгético	Doenças mitocondriais

Defeitos de moléculas grandes (TABELA 2), geralmente apresentam manifestações tardias e não costumam ser diagnosticada precocemente por não apresentarem descompensação metabólica aguda. Os sinais clínicos mais comumente encontrados são: quadro crônico (encefalopatia crônica), regressão neurológica lenta, alterações esqueléticas e dismorfias ao nascimento (BRUSTOLIN, 2005).

Tabela 2- Doenças de defeito de grandes moléculas.

Mucopolissacaridoses	MPS I (Hurler), MPS tipo II (Hunter), MPS III (Sanfillipo), MPS tipoIV MPS VI (Maroteaux Lamy), MPS VII (Sly) e MPS IX (Natowics)
Esfingolipidoses	Niemann- Pick, Gaucher, Fabry, Farber Gangliosidose GM1, Gangliosidose GM2 Galactosialidoses, Krabbe e Leucodistrofia Metacromática.
Glicogenoses	Doença de Pompe
Mucolipidoses	Mucolipidose II e Mucolipidose IV.
Oligossacaridoses	Fucosidose, a-manosidose, b-manosidose, Aspartilglicosaminúria, Shindler, Sialidose

As DMH individualmente são consideradas raras, porém a incidência cumulativa, ou seja, quando se considera todos os EIM juntos é de 1:5.000 dos recém-nascidos vivos. No Brasil pode ser observada a incidência de algumas patologias isoladas como a da Fenilcetonúria de 1:11.818 - 1:15.000, da Doença da Urina do Xarope de Bordo de 1:43.000 e da deficiência de biotinidase em recém-nascidos vivos de 1:125.000 (MARTINS, 2012).

Os EIM apresentam, em sua grande maioria, um padrão de herança autossômica recessiva, com risco de recorrência de 25% para cada gestação. Alguns destes podem possuir também uma herança ligada ao X, o que implica em um risco de 50% para as crianças do sexo masculino serem afetados e de 50% das crianças do sexo feminino serem portadoras. Porém, a herança dos EIM também pode ser autossômica dominante, na qual se identifica um padrão de herança em que necessariamente um dos pais apresenta alteração gênica e também a doença (BRUSTOLIN, 2005).

1.2 DOENÇAS LISSOSSÔMICAS DE DEPÓSITO (DLD)

Dentre os EIM verifica-se a presença de um grupo importante, no qual se relaciona às alterações genéticas determinadas nos lisossomos que caracterizam as doenças lisossômicas de depósito (DLD). A maioria destas doenças ocorre devido a vários fatores entre eles a deficiência enzimática lisossomal, transporte insuficiente dos substratos a serem hidrolisados ou dos produtos de hidrólise através da membrana lisossomal, a ausência de cofatores essenciais ou o defeito de proteínas ativadoras das esfingolipidoses (NEUFELD, 1991; WILCOX, 2004; AERTS et al., 2003).

Os lisossomos são organelas citoplasmáticas delimitadas por membranas próprias e que não contêm DNA ou ribossomos. Estão presentes em todas as células eucarióticas e possuem funções distintas no metabolismo humano. Estes estão envolvidos na degradação de macromoléculas, como os glicosaminoglicanos (GAG) e os esfingolipídios (SCHWARTZ et al., 2008). Os produtos finais da digestão intralisossomal são transferidos para o citosol através de proteínas transportadoras contidas na membrana dos lisossomos e desta forma podem ser excretadas ou reutilizadas pela célula (LIMA, 2009).

Estas organelas são observadas em abundância em células do sistema retículo-endotelial de todo o organismo: monócitos (sangue), macrófagos (pulmão), e macrófagos diferenciados em tecidos como a serosa, osso, medula óssea, cavidades, células de Kupfer (fígado), histiócitos (tecido conjuntivo), células gliais (sistema nervoso central), além do baço, linfonodos, dentre outros (BOY & SCHWARTZ, 2012).

As DLD representam um grupo de pelo menos 50 entidades genéticas distintas, cada uma delas resultante de deficiência de uma atividade proteica particular, sendo que, este número aumenta à medida que novas doenças são caracterizadas do ponto de vista genético e bioquímico (BOY & SCHWARTS, 2012).

De acordo com a identificação do tipo de substrato acumulado, as DLD são agrupadas em amplas categorias, incluindo as mucopolissacaridoses, as glicogenoses e as oligossacaridoses, ao qual mostram similaridades clínicas entre si, que incluem: anormalidades ósseas, organomegalia, disfunção do sistema nervoso central em algumas formas, além de distorções craniofaciais de caráter cumulativo. Estas se caracterizam como doenças de comprometimento sistêmico grave e que levam a diminuição importante da expectativa de vida dos indivíduos acometidos (BOY & SCHWARTZ, 2012).

A seguir serão feitos breves relatos bioquímicos e clínicos sobre as DLD que serão abordadas neste estudo.

1.2.1 Mucopolissacaridoses

As mucopolissacaridoses (MPS) são um grupo de doenças genéticas raras que se incluem dentre os EIM, mais especificamente das DLD (SILVA, 2009), caracterizadas pelo acúmulo intralissossômico de GAG, decorrente da deficiência na atividade de uma enzima lisossômica envolvida na degradação dessas moléculas (VIEIRA, 2007).

Os GAG não degradados acumulam-se nas células e sua quantidade em excesso é excretada na urina do paciente com MPS. Este acúmulo anormal compromete a função celular e orgânica, levando a um grande número de manifestações clínicas, as quais são progressivas e afetam múltiplos órgãos (BOY & SCHWARTZ, 2012).

A classificação das MPS é baseada na deficiência enzimática específica, embora existam diferentes fenótipos clínicos para o mesmo defeito enzimático, bem como fenótipos semelhantes para deficiências enzimáticas diferentes (VIEIRA, 2007). São descritas até o momento, ao menos, 11 defeitos enzimáticos que causam sete tipos diferentes de MPS, levando ao acúmulo de GAG como o Heparan sulfato (HS), Dermatan sulfato (DS), Queratan sulfato (QS) e o condroitin sulfato (CS), de acordo com o tipo e/ou deficiência enzimática (TABELA 3).

Tabela 3. Classificação das Mucopolissacaridoses

Tipos de MPS	Epônimo	GAGs - não degradados	Enzima com atividade deficiente
MPS I	Hurler Hurler- Scheie Scheie	DS, HS	α -L-iduronidase
MPS II	Hunter	DS, HS	Iduronato-sulfatase
MPS III (A,B,C,D)	Sanfilippo A Sanfilippo B Sanfilippo C Sanfilippo D	HS HS HS HS	Heparan N-sulfatase a-N acetilglicosaminidase acetil- Coa: a- glicosaminida acetiltransferase N-acetilglicosamina 6 -sulfatase
MPS IV	Mórquio A Mórquio B	QS, CS6 QS	Galactose-6-sulfatase β -galactosidase
MPS VI	Maroteaux-Lamy	DS, CS4	N- acetilgalactosamina 4-sulfatase
MPS VII	Sly	DS, HS, CS4, CS6	β -glicuronidase
MPS IX	Natowicz	Hialuronan	Hialuronidase

Embora exista uma grande heterogeneidade fenotípica associada a cada tipo de MPS, o mais frequente é que o início da sintomatologia ocorra na infância e que os pacientes apresentem manifestações comuns, dentre estas: organomegalias, envolvimento cardíaco,

respiratório, ocular, ósseo e articular. O envolvimento neurológico é variável (NEUFELD & MUENZER, 2001).

1.2.1.1 Mucopolissacaridose I

A MPS I é uma doença herdada de forma autossômica recessiva causada por uma deficiência da enzima α -L-iduronidase (IDUA). As manifestações clínicas são heterogêneas, sendo reconhecidas duas formas principais: Síndrome de Hurler e Síndrome de Scheie (PESSUTO, 2007).

A síndrome de Hurler é a mais grave dos dois subtipos da MPS I e sua sintomatologia pode ter início nos primeiros meses de vida e dentre eles se incluem: hérnia umbilical e inguinal; aumento do perímetro do crânio (macrocefalia); baixa estatura, opacidade de córneas; aumento do volume da língua; perda visual e auditiva; constipação intestinal; hepatoesplenomegalia; limitação progressiva de todas as articulações; deformidades ósseas e limitações de movimentos; retardo mental, dentre outros (MARTINS, 2002).

Segundo Neufeld & Muenzer (2001) a Síndrome de Hurler tem progressão rápida e por esta razão leva à morte precoce dos pacientes, geralmente antes dos 10 anos de vida, decorrente na maioria das vezes por problemas cardiorrespiratórios.

A síndrome de Scheie é a forma leve da MPS I e caracteriza-se por rigidez articular (presença de "mãos em garra"), valvulopatia aórtica, opacidade da córnea e outras poucas complicações, como surdez, hérnia umbilical e inguinal, bem como presença de glaucoma. Ainda apresenta face grosseira, porém não há comprometimento cognitivo e atraso no crescimento (PESSUTO, 2007).

1.2.1.2 Mucopolissacaridose II

A MPS II ou Síndrome de Hunter foi descrita pela primeira vez em 1917, por Charles Hunter, professor de medicina do Canadá. Esta se caracteriza pela deficiência da enzima iduronato-sulfatase (IDS), o que resulta no acúmulo, dentro das células, dos GAG HS e DS. Este subtipo tem padrão de herança ligada ao X, o que a torna diferente dos outros tipos de MPS que se assemelham por serem autossômicas recessivas. As manifestações clínicas mais frequentemente encontradas são fácies grosseiras, alterações esqueléticas, baixa estatura, contraturas articulares, infecções recorrentes de vias aéreas superiores e inferiores, surdez e cardiopatia (PINTO et al., 2006).

É possível distinguir duas variantes de acordo com os aspectos clínicos da MPS II: a forma mais grave, também chamada neuropata, que compromete cerca de $\frac{2}{3}$ dos pacientes e se caracteriza por manifestações precoces que consistem em maior comprometimento somático e neurológico, e a forma leve, também chamada não neuropata onde se observa pouco ou nenhum envolvimento do sistema nervoso central, preservação da inteligência e boa expectativa de vida. Os dois subtipos não podem ser diferenciados por resultados decorrentes da investigação bioquímica, visto que os efeitos da MPS II são extremamente variáveis (BOY & SCHWARTZ, 2012).

A mobilidade destes pacientes é restrita devido à rigidez e contraturas articulares ocasionada pelo acúmulo de GAGs nestas regiões. Entre as articulações mais gravemente afetadas, são encontradas: metacarpofalangianas e interfalangianas, punho, cotovelo, joelho e tornozelo. Em decorrência destas limitações, a mobilidade destes pacientes bem como a realização de tarefas que necessitem habilidades motoras mais específica passam a ser prejudicadas (GUARANY, 2011).

1.2.1.3 Mucopolissacaridose III

A MPS III ou Síndrome de Sanfilippo corresponde às MPS III-A, III-B, III-C e III-D. Esta denominação é uma homenagem ao Dr. Sylvester Sanfilippo, médico que relatou os primeiros casos da doença em 1963. Embora, todos os subtipos apresentem o mesmo glicosaminoglicano acumulado (HS), estes são causados por deficiência de enzimas diferentes (MUENZER, 2004). A MPS III é caracterizada por um comprometimento neurológico profundo que segundo Rossier et al. (2004) se deve ao acúmulo secundário de GM2 e GM3 gangliosídeos, em adição ao acúmulo primário de HS.

Em contrapartida, as alterações somáticas são leves, (mínimo comprometimento esquelético, com estatura normal e discreta rigidez articular e sem grandes comprometimentos funcionais). As primeiras manifestações costumam aparecer entre os 02 e 06 anos de idade, e nestas se incluem: hiperatividade, comportamento agressivo, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, hirsutismo, distúrbios do sono e hepatomegalia (LEAL, 2009).

A diferença clínica entre os quatro tipos de MPS III é pequena, visto que o GAG acumulado é o mesmo (NEUFELD & MUENZER, 2001). As alterações bioquímicas da MPS III estão presentes desde o nascimento, porém os distúrbios do comportamento e desenvolvimento mental manifestam-se entre o primeiro e o terceiro ano de vida e as

alterações somáticas são observadas apenas a partir do quarto ao sexto ano de vida (ROSSIER et al., 2004).

1.2.1.4 Mucopolissacaridose IV

A MPS IV ou síndrome de Mórquio recebe esta denominação em homenagem ao Dr. Mórquio, um pediatra uruguaio que, em 1929, descreveu uma família com quatro crianças afetadas por esta doença. A MPS IV é causada pela deficiência de duas diferentes enzimas que dão origem a dois subtipos (A e B). A atividade deficiente da Galactose-6-sulfatase causa a MPS IV A e a atividade deficiente da β -galactosidase (GLB) causa a MPS IV B (BOCHERNITSAN, 2015).

Na MPS IV tipo A os pacientes apresentam cognição normal, porém são afetados por uma gravíssima displasia óssea, a qual na maioria dos pacientes leva a uma baixa estatura extrema, deformidade do tórax, pescoço curto e instabilidades cervical (VIEIRA, 2007). Além disso, estes pacientes evoluem com alterações de vértebras (ovóides, platispondilia) que causam problemas na morfologia da coluna (cifose, hiperlordose, escoliose) e, secundariamente: pescoço curto, tronco curto com protuberância do peito (“pectus carinatum”); encurtamento de ossos longos (úmero, tíbia, fêmur, etc) com encurvamento e osteoporose. Além disso, podem apresentar fácies grosseira, proeminência do queixo (prognatismo); boca grande; deficiência auditiva; leve opacidade de córnea; hepatomegalia; obstrução de vias aéreas superiores; comprometimento valvular do coração; dentes pequenos com anormalidades do esmalte e cáries frequentes (MARTINS, 2002).

A MPS IVb ou síndrome de Mórquio tipo B é uma doença metabólica hereditária de caráter autossômico recessivo causada pela deficiência da enzima (GLB). Esta hidrolase é responsável pelo catabolismo de resíduos de β -galactose terminais, como o sulfato de queratan (SQ) e o gangliósido GM1. O acúmulo de SQ em pacientes com MPS IVB ocasiona quadro de displasia esquelética, retardo do crescimento, keratansulfatúria, opacificação da córnea, além de cardiopatias (KUBASKI, 2016).

Os déficits de crescimento e deformidades ósseas observados na MPS IV B são menos graves em relação a MPS IV A, o que resulta em um fenótipo mais leve com maiores habilidades funcionais. É importante ressaltar que o comprometimento esquelético não é apenas causado pelo acúmulo de GAG primário, mas também por uma interrupção de vários caminhos e mecanismos secundários como: sinalização das vias de transdução, regulação dos

fatores humorais (quimiocinas e citocinas), endocitose, autofagia, apoptose, estresse oxidativo além das respostas imunes inata e adaptativa (KUBASKI, 2016).

1.2.1.4 Mucopolissacaridose VI

A MPS VI ou síndrome de Maroteaux-Lamy é uma doença autossômica recessiva, causada pela deficiência da enzima n-acetilgalactosamina-4 sulfatase ou arilsulfatase B (ARSB). As manifestações clínicas são similares às descritas na MPS I, porém com aspectos cognitivos satisfatórios, embora as aquisições cognitivas possam ser prejudicadas devido as manifestações de déficit auditivo e visual, assim como pelas limitações físicas (NEUFELD & MUENZER, 2001).

Estes pacientes apresentam uma variabilidade ampla de sintomas multissistêmicos, de curso crônico e progressivo, sendo acometidos, principalmente, o sistema esquelético e cardio-pulmonar, a córnea, a pele, o fígado, o baço, o cérebro e as meninges. Além disso, são encontradas inúmeras deformidades esqueléticas que se caracterizam por: tronco curto, gibosidade tóraco-lombar, alargamento de punhos e contraturas articulares que levam a uma baixa estatura significativa (BOY & SCHWARTZ, 2012).

1.2.1.5 Mucopolissacaridose VII

A MPS VII ou Síndrome de Sly é um distúrbio lisossomal originalmente descrito por William Sly em 1972, e é causada por uma deficiência da enzima beta-glicuronidase (GUBS). Esta é relativamente rara, mas compartilha características comuns a outras MPS, por ser de natureza progressiva, multissistêmica e por possuir um curso clínico (GUARANY, 2011).

Nos casos mais graves podem ocorrer óbito do feto, hidropsia fetal no recém-nascido, disostose múltipla e características dismórficas já ao nascimento, o que caracteriza a Síndrome de Sly como uma exceção entre as doenças lisossômicas de depósito, sendo esta uma raridade entre os nascidos vivos com MPS (LEAL, 2009).

Em outros casos, as manifestações clínicas normalmente começam a surgir durante a infância. Dentre as características da MPS VII nota-se a presença de macrocefalia, aparência distinta com características faciais descritas como grosseiras, além de macroglossia. Os indivíduos afetados também desenvolvem frequentemente um aumento do fígado e do baço (hepatoesplenomegalia), anormalidades da válvula cardíaca, hérnia umbilical e inguinal (LEAL, 2009).

1.2.1.6 Mucopolissacaridose IX

Até o presente momento um único paciente foi identificado com MPS IX. Este apresentou como principais características: dismorfia craniofacial, baixa estatura, ausência de limitação articular e desenvolvimento cognitivo satisfatório. Estas manifestações clínicas são consequências da deficiência da enzima hialuronidase e do acúmulo de GAGs nas cartilagens e fluido sinovial (GUARANY, 2011).

1.2.2 Esfingolipidoses

Os esfingolipídeos são lipídeos existentes na membrana plasmática de todas as células eucarióticas, sendo especialmente abundante nas células do sistema nervoso. Sua síntese ocorre no retículo endoplasmático, tendo sua finalização no complexo de Golgi. Posteriormente, as moléculas são integradas na membrana plasmática e endocitadas e degradadas ao nível do lisossomo (BARBOSA, 2011).

Na membrana plasmática, os esfingolipídeos têm sido implicados em processos diversos tais como o crescimento, diferenciação e adesão celulares, apoptose, ontogênese, angionese, reconhecimento de certas toxinas, vírus e bactérias. (BARBOSA, 2011).

As esfingolipidoses são um grupo de DLDS causadas por defeitos na degradação lisossomal de esfingolípídeos. Este grupo de doenças metabólicas são originadas por mutações no gene que codifica a enzima lisossomal ou co-fatores responsáveis pela degradação do metabólito (POLO, et al. 2016). Nas esfingolipidoses, o acúmulo lipídico ocorre geralmente no tipo de células e órgãos em que esse lipídeo é predominantemente sintetizado. Todavia, todas as doenças relacionadas com o acúmulo de esfingolipídeos deve-se a uma falha na via de degradação e não a um aumento da sua biosíntese (BARBOSA, 2011). Na TABELA 4, há um resumo das principais características bioquímicas de algumas esfingolipidoses.

Tabela 4: Características bioquímicas das esfingolipidoses.

Esfingolipidose	Enzima deficiente	Lipídeos acumulados
Gangliosidose GM1	GM1-b- galactosidase	Gangliosídeo GM1
Tay-Sachs	Hexosaminidase A	Gangliosídeo GM2
Sandhoff	Hexosaminidase A e B	Globosídeo GA2, GM2
Fabry	α -Galactosidase A	Globotriosilceramida
Gaucher	β – Glicosidase	Glucosilceramida
Leucodistrofia Metacromática	Arilsulfatase A	Sulfatídeo
Niemann- Pick A/B	Esfingomielinase ácida	Esfingomielina
Krabbe	β –galactocerebrosidase	Galactosilceramida Galactosilesfingosina
Farber	Ceramidase ácida	Ceramida

1.2.2.1 Doença de Gaucher

A doença de Gaucher (DG) é resultante da deficiência da enzima beta-glicosidase ácida (GBA) que tem como função a conversão de glicosilceramidas (glicocerebrosídeos) em ceramida e glicose, sendo que isto ocorre através da clivagem da ligação O-glicosídica com a adição de água (GOLDIM, 2012).

Nos pacientes com DG, esta clivagem não ocorre devido a deficiência enzimática específica, levando ao acúmulo de glicosilceramidas nos lisossomos, principalmente nas células de linhagem dos macrófagos o que leva a origem das “células de Gaucher”, muito utilizadas como forma auxiliar no diagnóstico DG (NOVO, 2010).

A doença de Gaucher apresenta um padrão de herança autossômica recessiva. Mais de 300 mutações foram identificadas, provocando a redução parcial ou total da atividade da GBA, caracterizando assim uma heterogeneidade de manifestações clínicas (BOOT et al., 1996; NOVO, 2010).

A DG pode se apresentar de forma assintomática ou apresentar manifestações clínicas variadas, sendo as mais comuns a hepatoesplenomegalia, trombocitopenia, anemia, infecções recorrentes, alterações ósseas incluindo fraturas e osteoporose. Os pacientes são, geralmente, divididos em três fenótipos de acordo com os sinais e sintomas clínicos apresentados.

- **DG tipo 1 ou forma não neuropática:** caracterizada por hepatoesplenomegalia, anemia, plaquetopenia e degeneração óssea. A expressão clínica da doença pode variar desde os primeiros meses de vida até a oitava década de vida. É a forma mais comum da doença correspondendo até a 99% dos casos e é, particularmente, prevalente entre os judeus Ashkenazi com uma incidência de cerca de 1:450 e de 1:40.000 em comparação com a população em geral.

- **DG tipo 2 ou neuropática:** os pacientes têm anormalidades nervo-craniais e no tronco cerebral, hipertonia, deficiência mental, apnéia e hepatoesplenomegalia. O aparecimento dos sintomas ocorre em torno dos primeiros meses de vida.

- **DG tipo 3 ou neuropática:** pacientes têm sintomas similares ao tipo 1, mas os sinais neuropáticos (atraso cognitivo, apraxia motora ocular) aparecem durante a infância (FUTERMAN & HANNUN, 2004).

A enzima quitiniosidase (CHIT) está relacionada à DG devido ao aumento da sua atividade no plasma dos pacientes, funcionando assim como um biomarcador para a doença. A CHIT é uma quitinase secretada por macrófagos ativados, com capacidade de degradação da quitina. Sua função está ligada à defesa contra patógenos contendo quitina e no envolvimento em patologias com ativação de macrófagos (BOOT et al., 1996).

O aumento da CHIT pode chegar a 1000 vezes em pacientes com DG quando comparados a controles saudáveis. Todavia, essa enzima é secretada por macrófagos e não possui correlação com a gravidade clínica, mas sim com o acúmulo de glicosilceramidas nos lisossomos das “células de Gaucher” (GOLDIM, 2012)..

Com o tratamento, os níveis de CHIT são reduzidos, sendo então este parâmetro utilizado como controle de eficácia do tratamento. Apesar de ser um marcador bastante utilizado no diagnóstico e monitoramento do tratamento de pacientes com DG, a CHIT também pode ter sua atividade aumentada nos pacientes com doença de Krabbe, gangliosidose GM1 e doença de Niemann-Pick, contaminação por fungos, contaminação por bactérias e em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (GOLDIM, 2012).

1.2.2.2 Doença de Tay- Sachs

A doença de Tay-Sachs é uma doença genética autossômica recessiva resultante da mutação no gene HEXA levando a um defeito da subunidade alfa da enzima hexosaminidase A (HEXA). Este defeito gera o acúmulo do substrato GM2 glicosídeo nos neurônios levando a um quadro de meganeurite e neurodegeneração (JAIN; KOHLI; SACHAN, 2010).

Essa doença é caracterizada principalmente pela degeneração neurológica progressiva. As crianças afetadas pela forma clássica de Tay-Sachs manifestar os primeiros sintomas da doença por volta dos 06 meses após o nascimento e morrem antes de atingir os 5 anos de idade. As principais manifestações clínicas da doença incluem: surdez, cegueira, demência e convulsões recorrentes, além disso, quando em fase terminal as crianças afetadas ficam constantemente no leito (ROZENBERG, 2000).

1.2.2.3 Doença de Sandhoff

A doença de Sandhoff (DS) é uma doença de armazenamento de glicosfingolípídeos causada pela deficiência da enzima hexosaminidase total (HEXT). Esta deficiência provoca acúmulo do gangliosídeo GM2 relacionado principalmente aos glicolípídeos das células neuronais. O armazenamento progressivo deste glicolípídeo provoca a neurodegeneração grave através de um mecanismo patogênico ainda não esclarecido (OGAWA et al., 2013).

São conhecidas três formas diferentes da DS: a clássica infantil, a forma juvenil e a forma adulta tardia. A forma clássica infantil é a mais comum e também considerada a mais grave, caracterizada pelo aparecimento clínico geralmente entre 3 a 9 meses de idade. Os principais sintomas são: hipotonia muscular, convulsões tônico-clônica ou mioclônica, cegueira, retardo psicomotor e paralisia. Além disso, um ponto vermelho-cereja em áreas maculares também é muito comum, porém não específico da DS (DELNOOZ et al., 2009).

As formas juvenil e adulta da DS são consideradas muito raras. Os sinais e sintomas podem começar já na infância, adolescência ou até mesmo na idade adulta e são geralmente mais leves do que os observados na forma infantil (SAOUAB et al., 2011).

1.2.2.2 Doença de Fabry

A doença de Fabry é uma desordem rara, progressiva, ligada ao cromossomo X e que resulta da deficiência ou ausência da atividade da enzima α -galactosidase A (GLA). Os pacientes apresentam acúmulo de glicosfingolipídeos, principalmente a globotriasilceramida (Gb3) no endotélio vascular e nos tecidos viscerais tais como: pele, rins, coração e sistema nervoso central (BARSAGLINI et al., 2015).

O acúmulo intralissômico de glicosfingolipídeos é o responsável pelo aparecimento de sinais precoces na infância ou adolescência e geralmente resulta em dor nas extremidades (acroparestesias), aparecimento de lesões cutâneas (angioquetomas) e hipoidrose. Em alguns casos estes sinais podem se manifestar de forma mais tardia, aparecendo somente na segunda ou terceira década de vida (CASTILHOS, 2014).

1.2.2 Glicogenoses

O glicogênio é um polissacarídeo presente em todas as células animais, sendo particularmente abundante no fígado e músculos. Este, sofre despolimerização e fosforilação liberando a glicose necessária para manter os processos celulares e a normoglicemia durante o jejum (REIS et al., 2001).

A partir de uma deficiência enzimática específica envolvida na síntese ou na degradação de glicogênio, poderá ocorrer um defeito metabólico no catabolismo ou no anabolismo desse polissacarídeo. Isso pode resultar em doenças genéticas relacionadas ao armazenamento do glicogênio que, em sua grande maioria, apresentam caráter autossômico recessivo. Estas doenças são denominadas de glicogenoses e se diferem em relação à deficiência enzimática, no órgão afetado, na idade em que ocorrerão as primeiras manifestações clínicas da doença e na gravidade desses sintomas, podendo ser classificadas em até treze tipos (CARLOS et al., 2014).

1.2.2.1. Doença de Pompe

A Doença de Pompe (DP) é uma doença genética, de caráter autossômica recessivo, causada por deficiência da enzima lisossomal maltase ácida ou alfa-1,4-glicosidase ácida (GAA), responsável pela catalisação e hidrólise das ligações alfa-1,4 e alfa-1,6 do glicogênio. A sua ausência induz o acúmulo de glicogênio em muitos órgãos, sendo o músculo estriado e o coração os mais afetados. Também designada doença de armazenamento de glicogênio tipo II, a DP é simultaneamente uma doença lisossomal, sendo a única glicogenose em que o acúmulo de glicogênio ocorre nos lisossomas e não no citoplasma (NEVES et al., 2013).

De acordo com a idade em que os primeiros sintomas ocorrem, podem distinguir-se duas formas clínicas da doença: a forma infantil ou de apresentação clássica, que ocorre até ao primeiro ano de vida; e a forma tardia ou de apresentação não clássica, que ocorre com mais de 1 ano de idade (NEVES et al., 2013).

A DP infantil pode apresentar-se logo no momento do nascimento ou mais frequentemente nos primeiros 4 meses de vida. Esta se caracteriza como a forma mais grave da doença, caracterizando-se por: miocardiopatia, hipotonia, fraqueza muscular generalizada de rápida progressão e de predomínio proximal acabando inevitavelmente por culminar em morte por disfunção cardiorrespiratória, antes do primeiro ano de vida. Por outro lado, a DP de início tardio, afeta bebês com mais de 1 ano de idade, crianças, jovens e adultos. Este tipo de DP caracteriza-se pelo predominante envolvimento muscular esquelético, que determina principalmente fraqueza muscular proximal progressiva e insuficiência respiratória (SILVA, 2012).

1.3 TRATAMENTO PARA DLD

O tratamento para erros inatos do metabolismo em sua grande maioria foi destinada a reduzir o acúmulo dos metabólitos. Para isto, os primeiros tratamentos envolviam restrição alimentar dos metabólitos antecedentes ao bloqueio com a finalidade de diminuir a produção de metabólitos agressores. Métodos posteriores incluíam o desvio de metabólitos anormais ou a criação de vias alternativas para eliminar metabólitos potencialmente tóxicos (GEORGIANNE, 2018)

A partir de inúmeras pesquisas os medicamentos para o tratamento de doenças raras foram e ainda estão sendo inseridos no cenário mundial sob aprovação de governos americanos e europeus. Ainda que não haja uma definição única para estas doenças, elas

podem ser entendidas, de acordo com critérios europeus, como doenças cuja incidência seja inferior a 5 a cada 10 mil habitantes e que preencham as seguintes características clínicas: que sejam crônicas, degenerativas, debilitantes e associadas à diminuição da expectativa de vida (BOY & SCHRAMN, 2009).

No Brasil, muitos pacientes vêm buscando o acesso a esses medicamentos, incluindo aqueles voltados para o tratamento das DLD, ainda não acrescentadas na lista de medicamentos excepcionais por intermédio de medidas judiciais. Tais medidas nem sempre são favoráveis aos seus pleiteadores, em razão, sobretudo, do custo elevado do tratamento e as suas implicações orçamentárias. Nesse cenário, surgem conflitos éticos importantes, referentes às políticas sanitárias de acesso aos recursos necessários para o tratamento das doenças raras no Brasil, mas são ainda pouco discutidas as maneiras possíveis e desejáveis, capazes de resolver os conflitos (BOY & SCHRAMN, 2009).

Um dos principais tratamentos utilizados por pacientes com DLD é a terapia de reposição enzimática (TRE) que consiste na reposição da enzima ausente através de infusões intravenosas periódicas. Através de técnicas de engenharia genética, a enzima humana recombinante pode ser gerada, eliminando a necessidade de purificação da enzima de humanos ou de tecidos animais. A maior vantagem da TRE se deve ao fato desta poder distribuir mais enzimas do que as produzidas pelo transplante de células tronco hematopoiéticas (MUENZER, 2004).

A DG tipo I foi a primeira doença genética a ser contemplada pela TRE através do medicamento imiglucerase, onde através deste houve a interrupção do curso natural da doença, permitindo aos pacientes, submetidos ao tratamento, uma vida normal e produtiva. Este medicamento está sendo oferecido pela União e foi incluído na Relação de Medicamentos Excepcionais, desde 1995 (BOY & SCHRAMN, 2009). A partir da incorporação da TRE para a DG, iniciou-se então a busca de tratamento semelhante para outras DLD. Alguns tipos de MPS começaram a ser tratados pela TRE, sendo a MPS I a pioneira e, subsequentemente, aprovadas as TRE para MPS VI e MPS II (GIUGLIANI et al, 2010).

Após muitos anos sem tratamento efetivo para DLD, a TRE tem sido aplicada com sucesso em pacientes com DP, DG, MPS I, II e VI, Doença de Fabry e mais recentemente para pacientes com MPS IV A (CASTILHOS, 2014).

Todavia, uma das principais desvantagens da TRE é que a substituição das enzimas não atravessam a barreira hematoencefálica e não alteram características neuropáticas. Além disso, outros efeitos clínicos somáticos de certos pacientes que apresentam

mucopolissacaridoses, incluindo doença valvar cardíaca esquelética, geralmente não melhoram se houver alterações antes do início da TRE. No entanto, este tratamento oferece uma abordagem terapêutica bem-sucedida dos efeitos somáticos de várias DLS, sendo importante frisar que já existem pesquisas vigorosas nesse campo (VERNON, 2015).

1.4. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS DLD

Para o diagnóstico das DLD utilizam-se testes bioquímicos e moleculares. Os estudos bioquímicos geralmente iniciam com testes de triagem simples que buscam identificar metabólitos em excesso e continuam com a pesquisa de deficiências enzimáticas (CASTILHOS, 2014).

Para doenças como as MPS, o protocolo de investigação inclui desde testes de triagem qualitativos, como quantitativos, dentre estes a cromatografia e eletroforese de GAG, porém o diagnóstico padrão utilizado para diagnóstico é a medida das atividades das enzimas lisossomais.

Os testes qualitativos podem ser baseados na turvação urinária (Teste de BCTMA) (FIGURA 1) ou na visualização de manchas metacromáticas em papel impregnado em corantes (Teste do azul de toluidina) (FIGURA 2). A dosagem de GAG urinários também é utilizado como teste de triagem para confirmar a excreção em excesso do metabólito na urina do paciente (SCHWARTZ et al., 2001). Além disso, esta técnica também é utilizada para o monitoramento de indivíduos já diagnosticados com MPS e que se encontram submetidos ao tratamento da TRE.



Figura 1: Teste de BCTMA



Figura 2: Teste do azul de toluidina.

A análise feita através de testes quantitativos (cromatografia ou eletroforese de GAG), servem para identificar qual GAG está aumentado, auxiliando no direcionamento da

investigação para qual ensaio enzimático específico deve ser realizado (BECK, 2000). Todavia, o diagnóstico definitivo das MPS é feito através da dosagem da enzima específica para cada tipo de MPS em plasma, leucócitos ou fibroblastos (SCHWARTZ et al. 2001). Para as MPS nas quais a enzima deficiente é uma sulfatase, deve-se medir a atividade de outra sulfatase, para excluir a possibilidade diagnóstica de deficiência múltipla de sulfatases (DMS) (VIEIRA, 2007).

No caso da DG a quantificação da CHIT em plasma é utilizada como forma auxiliar ao diagnóstico enzimático da doença, porém é necessário levar em consideração que 5% da população é homozigota para a duplicação de 24pb no exon 10 do gene da CHIT, que confere uma deficiência na atividade desta enzima. Nestes casos, a CHIT não pode ser utilizada no auxílio ao diagnóstico e no monitoramento da DG (BOOT et al., 1996).

Para outros tipos de DLD não existem testes específicos de triagem como ocorrem nas MPS, porém a avaliação clínica e precisa é fundamental para o direcionamento do diagnóstico. A dosagem da atividade da enzima específica é o que caracteriza o diagnóstico definitivo e assim como nas MPS, podem ser quantificadas em amostras de plasma, leucócitos e fibroblastos.

Para a quantificação em plasma e leucócitos são necessários aproximadamente 9mL de sangue, variando conforme o número de enzimas a serem analisadas. As amostras devem ser processadas o quanto antes e devem ser armazenadas no mínimo a -20° C, além disso, o transporte de amostras também deve ser feito refrigerado para a preservação das enzimas. A coleta de material utilizando fibroblastos para o diagnóstico, causa desconforto para o paciente, pois esta técnica é realizada a partir da retirada de um fragmento de pele (biópsia) de aproximadamente 5 mm. Além disso, após a coleta são necessários de um a dois meses de cultivo dos fibroblastos até que se tenha a quantidade necessária para a medida da atividade enzimática (WAJNER et al., 2001).

Além das técnicas descritas, atualmente é utilizado outro meio de quantificação de atividade enzimática. As amostras de sangue impregnado em papel filtro (SIPF) vêm sendo utilizadas como forma de triagem de novos pacientes com DLD e seu uso vem sendo ampliados por diversos grupos de pesquisa (CHAMOLES et al. 2002).

Nos últimos anos, a técnica de amostragem de SIPF emergiu como um método pertinente em inúmeros contextos quantitativos de bioanálise. No método de SIPF, a amostra de sangue é diretamente embebida em papel e após a secagem, pode ser analisado por modernos sistemas de detecção analítica, imunológica ou genômica.

Neste sentido, os cartões de SIPF oferecem menos riscos biológicos em comparação às amostras de plasma, devido ao fato de que, o sangue utilizado se apresenta na forma seca, ou seja, todas as proteínas, patógenos e enzimas são inativadas no cartão o que impede também o crescimento bacteriano. Além disso, a natureza menos invasiva de SIPF e o uso de um volume menor de sangue, tornaram este método muito útil para neonatais.

Todavia, no caso de rastreamento de DLD este não é utilizado como forma de diagnóstico final devido ao fato de que as quantificações em SIPF são interpretadas como atividade enzimática total e não específica como em leucócitos, plasma ou fibroblastos (GOLDIM, 2012).

As técnicas em SIPF são feitas somente medindo a atividade enzimática através da clivagem de um substrato artificial, geralmente ligado a um radical 4- metiumbeliferil. Por esta razão, o resultado pode ser alterado devido a fatores como: quantidade de sangue impregnado, forma de secagem e local do picote do papel (ELBIN, et al. 2011).

Apesar de não ser considerado padrão “ouro” de diagnóstico de DLD, a utilização de SIPF tem vantagens como o fácil transporte das amostras, podendo ser enviadas via correio em envelope convencional, sem necessidade de refrigeração, pois diferentemente das matrizes biológicas convencionais, o SIPF fornece uma enorme simplificação em relação a estas questões. Ao contrário das amostras de plasma / soro, amostra de SIPF não requer congeladores para armazenamento nem grandes volumes de gelo seco para o transporte, que além de caros, precisam de cuidados especiais. Exceto a questão umidade, que influencia significativamente na estabilidade da amostra e aumenta as chances de crescimento bacteriano (SHARMA. 2014).

2. JUSTIFICATIVA

O Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo (LEIM) da Universidade Federal do Pará (UFPA), há 31 anos presta assistência ao diagnóstico bioquímico e molecular de DLD para pacientes de diversas localidades da Região Norte do Brasil. Este serviço é prestado em parceria com a equipe do Hospital de Clínicas de Porto Alegre- HCPA, que há anos é estabelecido como ponto de referência para diagnóstico de doenças raras em todo o Brasil, incluindo os EIM.

Neste sentido, Castilho (2011) demonstra que, levando em consideração as grandes dimensões do nosso país, e mais especificamente a Região Norte como uma das maiores

regiões do Brasil, amostras em papel filtro embora com um menor volume de sangue coletado, apresentam uma maior facilidade em relação ao transporte e acondicionamento, tornando-se um material de fundamental importância no apoio ao diagnóstico de DLD. Portanto, sendo o LEIM- UFPA um laboratório de referência para a Região Norte do país é imprescindível que técnicas como estas sejam implantadas e avaliadas para garantir uma melhor assistência a indivíduos sob suspeita de DLD.

Para isto, o avanço tecnológico dos equipamentos de detecção que permitem a minituarização das metodologias em estudo, fato que determina uma maior agilidade no processamento e análise das amostras, vem sendo crucial para a introdução do tratamento, quando disponível para as DLD (CHAMOLES et al., 2001).

O presente trabalho teve como principal objetivo a implantação da metodologia de quantificação da atividade enzimática em amostras de sangue impregnado em papel filtro, diretamente relacionados com a investigação de DLD. Para isto, foram analisadas 12 enzimas (β -glicosidase, quitotriosidase, Arilsulfatase B, α -L-Iduronidase, α -N-acetilglicosaminidase Iduronato sulfatase, Hexosaminidases (A e B), β -galactosidase, α -glicosidase, α -galactosidase) em diferentes grupos populacionais: recém-nascidos, pacientes com DLD e pacientes adultos sem DLD.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Implantação de protocolo para investigação de DLD baseado na técnica de dosagem enzimática em amostras de sangue impregnado em papel filtro (SIPF).

3.2 Objetivos Específicos

- Mensuração da atividade da enzima β -glicosidase (GBA) e quitotriosidase (CHIT) em amostras de papel filtro e estabelecimento de valores de referência.
- Mensuração da atividade da enzima Iduronato sulfatase (IDS) em amostras de papel filtro e estabelecimento de valores de referência.
- Mensuração da atividade da enzima Arilsulfatase B (ARSB) em amostras de papel filtro e estabelecimento de valores de referência.

- Mensuração das atividades das enzimas Hexosaminidase A (HEXA) e total (HEXT) em amostras de papel filtro e estabelecimento de valores de referência.
- Mensuração da atividade da enzima β -galactosidase em amostras de papel filtro e estabelecimento de valores de referência. (GLB)
- Mensuração da atividade da enzima β -glicuronidase (GUSB) em amostras de papel filtro e estabelecimento de valores de referência.
- Mensuração da atividade da enzima α -glicosidase ácida (GAA) em amostras de papel filtro e estabelecimento de valores de referência.
- Mensuração da atividade da enzima α -L-Iduronidase (IDUA) em amostras de papel filtro e estabelecimento de valores de referência.
- Mensuração da atividade da enzima α - N-acetilglicosaminidase em amostras de papel filtro e estabelecimento de valores de referência (NAGLU).
- Mensuração da atividade da enzima α -galactosidase (GLA) em amostras de papel filtro e estabelecimento de valores de referência.
- Avaliação dos resultados obtidos das técnicas de dosagem enzimática em SIPF, nos diferentes grupos populacionais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Caracterização da amostra

Para o presente estudo, foram coletadas amostras de sangue total para a obtenção de SIPF. O grupo controle foi constituído de amostras de 30 indivíduos saudáveis (18 a 50 anos), de ambos os sexos. Além de amostras previamente selecionadas de indivíduos com diagnóstico realizado no LEIM/UFPA para patologias referentes a algumas enzimas presentes no estudo, dentre estas: 1 amostra de paciente com MPS IIIB; 2 amostras de pacientes com MPS VI; 13 amostras de pacientes com DG; 1 paciente com DS; 1 amostra de paciente com MPS I; 04 pacientes com MPS II.

Trinta amostras de recém-nascidos (RN) foram obtidas através de parceria com o Laboratório de Pesquisa e Apoio Diagnóstico (LAPAD), da Universidade Estadual do Pará (UEPA).

4.2 Aspectos éticos

Este trabalho levou em consideração os princípios éticos básicos das diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos: autonomia, beneficência, não maleficência e justiça, o que está de acordo com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

A explicação detalhada dos objetivos do estudo foi realizada pelo próprio pesquisador, através de um contato pessoal, e/ou uma carta convite com esclarecimento de todas as dúvidas levantadas pelo indivíduo ou seu responsável. Caso o convite para participação neste estudo por parte do indivíduo fosse aceito, foi fornecido o termo de consentimento livre e esclarecido, antes da coleta de qualquer material biológico.

O material biológico coletado foi utilizado apenas neste estudo. Ele ficou armazenado sob a responsabilidade do pesquisador responsável (coordenador do estudo) no Laboratório de Erros Inatos da UFPA, sendo este também responsável pela utilização do material. Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido foi realizada a coleta de sangue.

4.3 Coleta e armazenamento das amostras

Para os ensaios enzimáticos nas amostras foram coletados 10 mL de sangue venoso em tubo com heparina. Uma alíquota de 2 mL foi separada para fazer a impregnação no papel

filtro Whatman 903 (FIGURA 3). Estas amostras de SIPF foram armazenadas a 4°C até o momento dos ensaios enzimáticos.

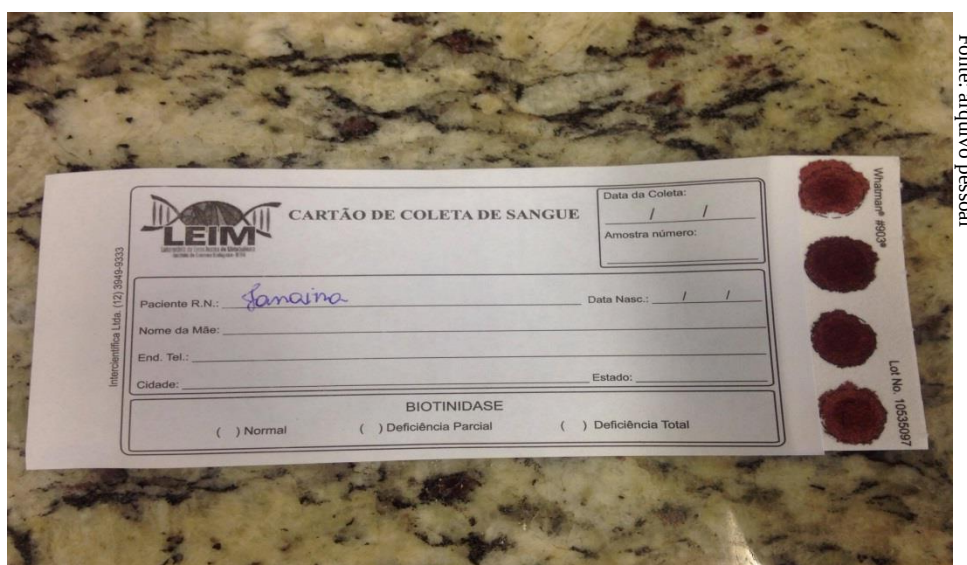


Figura 3: Sangue impregnado em papel filtro usado nos ensaios enzimáticos.

4.4 Riscos e benefícios do estudo

A coleta da amostra biológica (punção venosa de sangue periférico) representa um risco mínimo para o paciente, visto que é um procedimento rotineiramente empregado em análises clínicas para medição de vários metabólitos no sangue. Além disso a análise em sangue impregnado em papel requer um nível baixo de amostra e permite a pesquisa de várias DLD em uma única amostra. Dentre os benefícios do estudo estão a grande contribuição dos resultados para desenvolvimento de técnicas para investigação de DLD.

4.5. Ensaios enzimáticos: SIPF

As dosagens foram baseadas nas técnicas de Civallero et al. (2006) descritas na TABELA 5.

Foram utilizados discos de SIPF de 3mm, obtidos através de picotagem, o tamanho do disco equivale a aproximadamente 3,6 μ L de sangue. Após o picote, os discos foram colocados em eppendorf de 2ml e foi acrescentado o líquido de eluição, na qual contém o tampão que variou em cada ensaio enzimático e o substrato específico para cada enzima (TABELA 5). Os tubos foram fechados e incubados no banho-maria a 37° C. O período de incubação variou conforme o ensaio enzimático.

Após este período, os tubos foram retirados e acrescentados o tampão de parada que também variou conforme o ensaio enzimático trabalhado, os tubos foram então centrifugados por 10m/3.000 rpm. Após este procedimento foram realizadas as leituras, na qual foram corrigidas com valores dos brancos comparadas a uma curva de calibração de 4-metilumbeliferona e a fluorescência lida com um espectrofluorímetro Spectra Max M2 com filtros de emissão e excitação de 450nm e 365nm, respectivamente.

Tabela 5: Técnicas de dosagem de enzimas em amostras de SIPIF (*continua*)

Enzima	Líquido de diluição	Substrato	T.I	Tampão de Parada
NAGLU	- 50 µL de água destilada. - 25 µL DE Tampão Acetato de sódio 0, 2 M (Ph 4,3).	- 25 µL 2 mmol/l 4-methylumbelliferyl-2-acetamide-2-deoxy- α -D-glucopyranoside em água destilada.	20h	1000 µL de Tampão Glicina 0.5 M (Ph 10,3).
ARSB	- 45 µL de água destilada. - 30 µL de Tampão Acetato de Chumbo 15 M em Sódio acetato 0,05 M (Ph 5,0)	- 75 µL 10 mM/1 4 Metilumbriliferil- sulfato em ml de tampão sódio acetato.	20h	1000 µL de Tampão Glicina 1000 µl 0.5 M (Ph 10,5).
GLA	- 40 µL de N- acetil-D- galactosamina em 1ml de água destilada	100 µL de 4- metilum beliferil- α - D- galactosídeo 5mM/ em 1ml de tampão citrato fosfato 0,15M pH4,4	20h	600 µL de Tampão Etilenodiamina 0,1 M (Ph 11,4)
GLB	- 80 µL Tampão Citrato Fosfato 0,05M (Ph 4,4)	- 40 µL de 4- metilum Beliferil- D- Galactosídeo em 3,7 ml de água destilada.	3h	600 µL de Tampão Glicina 0.085 M (pH 10,5)
GAA	- 20 µL de água destilada - 30 µL de solução arcabosa 8mM - 2,9 ml de tampão citrato Fosfato 0,2mM, pH 4,0 Com Triton X-100 0,6g/l.	- 120 µL de 4- metilum beliferil- D- glicosídeo 10mM em 0,30 ml de Tampão citrato fosfato	20h	1000 uL de Tampão Glicina 0.5 M (pH 10,3).
GBA	- 50 µL de tampão citrato fosfato 0,54M (pH 5,5)	- 100 µL de 10 mmol/14-metilumbeliferil - β -D-glicosídeo e 50 mmol de taurcolato de sódio em Água destilada.	5h	1,5 µL de Tampão Glicina 0.5 M (pH 10,3).

Tabela 5: Técnicas de dosagem de enzimas em amostras de SIPF (*continuação*)

Enzima	Líquido de diluição	Substrato	T.I	Tampão de Parada
GUBS	- 50 µL de água destilada	- 4- metilumbeliferil - β-D- glucoronic acid 10 mM/l em 1ml de Tampão acetato de sódio 0,1 M/l (pH 4,8).	4h	600 µL de Tampão Glicina 0.085 M (pH 10,5)
HEXA	- 20 µL de água destilada - 30 µl 160 mmol de Tampão citrato fosfato (pH 4,14).	30 µL de 4- metilumbeliferil-β-D-N- acetylglucosamine- 6-sulfate em água Destilada	3h	900 µL de Tampão Glicina 0.5 M (pH 10,3).
HEXT	-50 µL de Tampão Citrato Fosfato 22 mmol/l (pH 4.4)	100 µL 4- metilumbeliferil-β-D- glucosaminide 3 mmol/l em Tampão Citrato 22 mmol/l Fosfato (pH 4.4)	2h	300 µL de Tampão Etilenodiamina 0,13 mol/l (Ph 11,3)
IDUA	-30 µL de água destilada -10 µL de Tampão Formato 50 mmol pH 2,8.	-20 µL de 4- metilumbeliferil-α- L- iduronide cyclohexylammonium 2 mmol/l em água destilada.	20h	1000 µL de Tampão Glicina 0.5 M (pH 10,3).
IDS	- Incubação 1: 10 µL de SIPF diluído em 100 µl de Albumina 0,2% (BSA) e Água destilada (30 min / 37 °C) -Incubação 2: 40 µl de Ácido cítrico 0,2M e Fosfato de sódio 0,4M (pH 4,5) com azida de sódio 0,02%. -10 µL de RLC enzima	Incubação 1: 20 µL de metilumbeliferil-α-2- sulfate 1.25 mmol/l em sódio acetato 0.1 mol/l com acetato de chumbo 10 mmol (pH 5.0).	I: 24H II: 24H	Incubação II: 480 µL Tampão Carbonato de sódio 0,5 M e Bicarbonato de sódio 0,5M com Triton X 0,0025% (pH 10,7).
CHIT	- 40 µL de Tampão acetato de sódio 0,25mmol/l (pH 5,5).	- 40 µL de 4- Metiumbeliferil -β-D- NN'-N''- triacetilquitotriosidase em água destilada.	30 min	600 µL de Tampão Etilenodiamina 0,13 mol/l (Ph 11,3)

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. Foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney do software Bioestat 5.0 para determinação da diferença entre controles e paciente. Foi considerado $p < 0,05$ como sendo significativo (AYRES et al., 2003).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo foi realizada a mensuração da atividade de 12 enzimas relacionadas ao diagnóstico de DLD em amostras de SIPF em 30 indivíduos adultos, 30 RN, e 23 indivíduos diagnosticados com DLD (Um caso de MPS I; 4 de MPS II; 2 de MPS VI; 1 de MPS III- D; 1 de DMS; 13 de DG; 1 de DS).

As amostras foram submetidas às técnicas de dosagens fluorimétricas e submetidas à análise estatística para obtenção da Média $\pm$ DP (TABELA 6) de cada dosagem. Os resultados foram submetidos ao teste não paramétrico de Mann-Whitney, onde foi possível estabelecer a análise entre as dosagens de amostras de controle e pacientes, considerando $p < 0,05$ como estatisticamente significativo (TABELA 6).

Tabela 6: Média $\pm$ DP controles e pacientes e análise estatística entre as dosagens (*continua*)

Enzima	N	(Média ± DP)	P
<i>NAGLU</i>			
Paciente com MPS IIIB (a)	1	ND	b vs c: 0.3254
Controle Normal (adulto) (b)	30	0.43 - 9 (3.09 ± 2.62)	
Controle Normal (RN) (c)	30	1.2 - 5.71 (2.43 ± 1.35)	
<i>ASB</i>			
Paciente com DMS(a)	1	2.4	a vs c: <0.0001 c vs d: 0,0038
Paciente com MPS VI (b)	2	0.12 - 3.7 (1.91 ± 2.53)	
Controle Normal (adulto) (c)	30	3.6 - 13.8 (7.16 ± 2.44)	
Controle Normal (RN) (d)	30	4 - 11.5 (6.19 ± 2.33)	
<i>GLA</i>			
Controle Normal (adulto) (a)	30	2.11 - 10.1 (5.20 ± 2.42)	a vs b: <0.0001
Controle Normal (RN) (b)	30	4.86 - 21.29 (12.24 ± 5.10)	

Tabela 6: Média $\pm$ DP controles e pacientes e análise estatística entre as dosagens (*continuação*)

Enzima	N	(Média ± DP)	P
GAA			
Controle Normal (adulto) (a)	30	12.8 - 46.4 (26.46 ± 10.79)	a vs b: 0.0006
Controle Normal (RN) (b)	30	15.5 - 81.1 (38.74 ± 13.29)	
GLB			
Controle Normal (adulto) (a)	30	15.4 - 129.2 (44.17 ± 21.70)	a vs b: <0.0001
Controle Normal (RN) (b)	30	29 - 117.6 (68.63 ± 22.93)	
GBA			
Pacientes com DG (a)	13	ND - 2.5 (0.81 ± 0.73)	a vs c: <0.0001 c vs d: 0.0251
Controle Normal (adulto) (c)	30	3 - 15.1 (7.84 ± 2.91)	
Controle Normal (RN) (d)	30	3.8 - 18 (9.98 ± 4.27)	
GUBS			
Controle Normal (adulto) (a)	30	13.2 - 89.3 (42.75 ± 19.67)	a vs b: 0.1031
Controle Normal (RN) (b)	30	17.2 - 92.1 (47.29 ± 16.42)	
HEXA			
Paciente com DS (a)	1	0.7	b vs c: <0.0001
Controle Normal (adulto) (b)	30	4.13 - 16.5 (8.30 ± 3.19)	
Controle Normal (RN) (c)	30	8.8 - 47.4 (22.49 ± 9.56)	
HEXT			
Paciente com DS (a)	1	20.4	b vs c: 0.0105
Controle Normal (adulto) (b)	30	33.3 - 153.73 (81.45 ± 37.22)	
Controle Normal (RN) (c)	30	28.79 - 132.74 (71.19 ± 28.95)	
IDUA			
Paciente com MPS I (a)	1	0.28	b vs c: 0.3452
Controle Normal (adulto) (b)	30	1 - 4.9 (2.18 ± 0.89)	
Controle Normal (RN) (c)	30	1.07 - 4.22 (2.25 ± 0.78)	
IDS			
Pacientes com MPS II (a)	4	1.7 - 6.3 (4.47 ± 1.96)	a vs e: 0.0027 e vs f: 0.0039
Paciente com MSD (b)	1	3.6	
Controle Normal (adulto) (e)	15	10.4 - 25.6 (14.79 ± 3.97)	
Controle Normal (RN) (f)	15	10 - 32.7 (19.83 ± 5.37)	

Tabela 6: Média $\pm$ DP controles e pacientes e análise estatística entre as dosagens. (*conclusão*)

Enzima	N	(Média $\pm$ DP)	P
CHIT			
Pacientes com DG (a1)	4	495.4 - 1603.55 (860.90 $\pm$ 503.59)	a1 vs b: <0.0001
Paciente com DG em terapia (a2)	7	25.5 - 202.21 (95.32 $\pm$ 69.38)	b vs c: 0.1402
Controle Normal (adulto) (b)	30	ND - 36.8 (11.37 $\pm$ 10.78)	
Controle Normal (RN) (c)	30	ND - 47.3 (13.56 $\pm$ 10.45)	

As atividades foram mensuradas em nmol/ml/h; ND: corresponde a valores não-detectáveis. Rn: amostras de recém-nascidos.

Os valores de referência foram estabelecidos a partir dos intervalos (valores máximos e mínimos) obtidos das dosagens enzimáticas, considerando Média $\pm$ DP e tipo de amostra analisada (TABELA 02).

Tabela 7: Valores de referência a partir da dosagem enzimática com Média $\pm$ DP (*Continua*).

Enzima	N	Valores de Referência (Média $\pm$ DP)
NAGLU		
Indivíduo Normal (adulto)	30	0.43 - 9 (3.09 $\pm$ 2.62)
Controle Normal (RN)	30	1.2 - 5.71 (2.43 $\pm$ 1.35)
ASB		
Controle Normal (adulto) (e)	30	3.6 - 13.8 (7.16 $\pm$ 2.44)
Controle Normal (RN)	30	4 - 11.5 (6.19 $\pm$ 2.33)
GBA		
Pacientes com DG	13	ND - 2.5 (0.81 $\pm$ 0.73)
Controle Normal (adulto)	30	3 - 15.1 (7.84 $\pm$ 2.91)
Controle Normal (RN)	30	3.8 - 18 (9.98 $\pm$ 4.27)
CHIT		
Controle Normal (adulto)	30	ND - 36.8 (11.37 $\pm$ 10.78)
Controle Normal (RN)	30	ND - 47.3 (13.56 $\pm$ 10.45)
GLA		
Controle Normal (adulto)	30	2.11 - 10.1 (5.20 $\pm$ 2.42)
Controle Normal (RN)	30	4.86 - 21.29 (12.24 $\pm$ 5.10)

Tabela 7: Valores de referência a partir da dosagem enzimática com Média $\pm$ DP (*Continuação*).

Enzima	N	Valores de Referência (Média $\pm$ DP)
GAA		
Controle Normal (adulto) (a)	30	12.8 - 46.4 (26.46 $\pm$ 10.79)
Controle Normal (RN)	30	15.5 - 81.1 (38.74 $\pm$ 13.29)
GLB		
Controle Normal (adulto)	30	15.4 - 129.2 (44.17 $\pm$ 21.70)
Controle Normal (RN)	30	29 - 117.6 (68.63 $\pm$ 22.93)
GUBS		
Controle Normal (adulto)	30	13.2 - 89.3 (42.75 $\pm$ 19.67)
Controle Normal (RN)	30	17.2 - 92.1 (47.29 $\pm$ 16.42)
HEXT		
Controle Normal (adulto)	30	33.3 - 153.73 (81.45 $\pm$ 37.22)
Controle Normal (RN)	30	28.79 - 132.74 (71.19 $\pm$ 28.95)
HEXA		
Controle Normal (adulto)	30	4.13 - 16.5 (8.30 $\pm$ 3.19)
Controle Normal (RN)	30	8.8 - 47.4 (22.49 $\pm$ 9.56)
IDUA		
Controle Normal (adulto)	30	1 - 4.9 (2.18 $\pm$ 0.89)
Controle Normal (RN)	30	1.07 - 4.22 (2.25 $\pm$ 0.78)
IDS		
Controle Normal (adulto)	30	10.4 - 25.6 (14.79 $\pm$ 3.97)
Controle Normal (RN)	30	10 - 32.7 (19.83 $\pm$ 5.37)

Os métodos fluorométricos foram utilizados para avaliar as atividades de, α -N-acetilglucosaminidase (NAGLU), arilsulfatase B (ARSB), quitotriosidase (CHIT), α e β -galactosidases (GLA e GLB), β -glicosidase (GBA), β -glucuronidase (GUSB), hexosaminidases totais (HEXT), hexosaminidase A (HEXA), α -iduronidase (IDUA), iduronato-2-sulfatase (IDS) e α -glicosidase ácida (GAA)

A partir destas análises das atividades enzimáticas, foi possível estabelecer os valores de referência para indivíduos adultos normais e também para RN a partir dos intervalos mínimos

e máximos entre as dosagens de cada amostra (TABELA 7). Não foi possível estabelecer valores de referência para alguns dos indivíduos diagnosticados com DLD devido ao tamanho amostral pequeno nesse estudo. Entretanto, nessas amostras é possível verificar o valor da atividade enzimática inferior aos valores encontrados nos indivíduos saudáveis.

Em relação a estes valores, um estudo realizado para detecção da atividade de hidrolases lisossômicas, Castilhos (2011), verificou que apesar do protocolo aplicado (o mesmo adotado neste estudo), a utilização de amostras de SIPF ainda indica muito falsos positivos, pois das 14 amostras analisadas em seu estudo, nas quais obtiveram resultados alterados e que posteriormente foram reencaminhadas para avaliação, somente 6 (42,8%) confirmaram a ocorrência de uma doença lisossômica. Castilho (2014) atribui o fato à qualidade da amostra, demonstrando que a coleta e o armazenamento da mesma antes do envio para o laboratório pode ser crucial para a análise.

Neste sentido, Sharma et al. (2014) descreve que o volume de sangue a ser utilizado no cartão de SIPF depende da sensibilidade do método bioanalítico, porém para todo o caso, a ponta da pipeta deve ser mantida logo acima do cartão, permitindo a imersão na superfície do cartão. A ponta da pipeta não deve tocar repetidamente na superfície, pois pode danificar o papel levando à falta de homogeneidade da amostra, além disso, pode ocorrer sobreposição de camadas no mesmo círculo da coleta. Cartões etiquetados incorretamente, escuros ou sujos, supersaturados, coagulados, descoloridos e contaminados, devem ser descartados em todas as hipóteses.

Outro fator crucial para a estabilidade das amostras de SIPF, segundo Sharma et al. (2014), é a secagem do papel. Após a coleta das amostras, os cartões geralmente são secos horizontalmente por 2 a 3 h em uma rack de cartão à temperatura ambiente ou sob fluxo de nitrogênio com o grau de umidade controlada. O tempo necessário para a secagem do cartão dependerá do tipo de cartão bem como o volume da amostra utilizado.

Além disso, os cartões jamais deverão ser empilhados ou expostos à luz solar direta, poeira ou insetos, pois pode comprometer a integridade da amostra de SIPF.

Resultados semelhantes também foram encontrados em estudo de Civallero et al. (2006), porém, neste caso a quantidade de falsos positivos pode ter sido em detrimento da falta do uso de outras metodologias para a confirmação do diagnóstico de indivíduos com suspeita de DLD, como quantificação enzimática em amostras de leucócitos, plasma e fibroblastos ou técnicas de biologia molecular.

Ainda no estudo de Castilho (2011) verificou-se que as atividades das hidrolases lisossômicas mantiveram-se constantes mesmo quando submetidas a diferentes

anticoagulantes e temperaturas de armazenamento variáveis, porém esta estabilidade tende a reduzir conforme o tempo e o tipo de enzima a ser analisada e conclui que caso seja necessária a investigação de muitas enzimas em uma mesma amostra de SIPF, o melhor seria que as amostras permanecessem armazenadas em no máximo 10 dias, visto que, enzimas como a GAA diminuíram suas atividades após dez dias de armazenamento.

Este tipo de estudo demonstra a importância do estabelecimento de um protocolo para avaliação do controle interno de qualidade das técnicas fluorimétricas ligadas a investigação de DLD, principalmente quando se trata de amostras de SIPF, de forma que avaliem a coleta, armazenamenmto, tempo de estabilidade dentre outros parâmetros que auxiliem na manutenção da qualidade das análises.

Em relação aos valores obtidos nas dosagens da enzima GBA, foi possível estabelecer valores de referência para indivíduos com DG, visto que, houve um número suficiente de indivíduos participantes no estudo. Houve diferença estatisticamente significativa entre indivíduos com DG e controles normais adultos. Resultados semelhantes foram obtidos no estudo de Franco (2011), onde se verificou a análise bioquímica das enzimas GBA e CHIT em amostras de SIPF em diferentes condições clínicas. Indivíduos com DG apresentaram uma diminuição na atividade da β -glicosidase, em aproximadamente 95% em relação aos controles normais.

Resultados semelhantes também foram obtidos em estudo de Goldim (2016), nas dosagens de amostras de SIPF, utilizando uma minituarização da técnica, onde em um total de 274 amostras, 55, (2%) apresentaram atividades da GBA reduzida e CHIT aumentada e obtiveram diagnóstico de DG confirmados em dosagens de leucócitos e plasma, o que demonstrou que a técnica de minituarização da dosagem enzimática em SIPF também é satisfatória.

Em estudo de Daitx, et al. (2012), onde houve uma comparação na dosagem da GLA em amostras de SIPF, leucócito e plasma, a minituarização da técnica em SIPF também mostrou-se satisfatória, desde que se estabelecessem pontos de corte e valores de referência para a técnica.

É importante enfatizar que todos os indivíduos com DG, participantes deste estudo, obtiveram seus diagnósticos confirmados por técnicas de dosagem enzimática em leucócitos e técnicas de biologia molecular.

Na dosagem enzimática de CHIT, verificou-se que os valores dos intervalos encontrados nas dosagens enzimáticas foram de ND - 36.8 nmol/ml/h (11.37 ± 10.78) para indivíduos normais adultos e ND - 47.3 nmol/ml/h (13.56 ± 10.45) para RN, e não houve

diferença estatisticamente significante ($p > 0,005$). Resultados semelhantes também foram encontrados em estudos de Franco (2011), porém neste caso, constatou-se que pacientes com DG homozigotos para duplicação dos 24 pb, não apresentam atividade de CHIT no plasma, assim como em casos de indivíduos normais que apresentam a mesma mutação.

Neste sentido, Franco (2011) determina que para validar o uso da atividade da CHIT como marcador de diagnóstico e monitoramento de pacientes com DG, é indispensável a frequência alélica e genotípica da duplicação de 24pb e de outros polimorfismos no gene *QUIT1* nos diferentes grupos étnicos e avaliar a possibilidade de usar outros marcadores (citocinas estimuladoras de macrófagos, enzima conversora de angiotensina, quemoquina CD163, CCL18, dentre outros) no monitoramento da DG.

A partir dos resultados obtidos das dosagens enzimáticas, também foi possível perceber que em 8 das enzimas analisadas (66%) houve diferença estatisticamente significantes entre amostras de indivíduos adultos e RN ($p < 0,005$).

Resultados semelhantes foram obtidos no trabalho de Civallero et al. (2006), isso demonstra a importância de se estabelecer parâmetros para as dosagens enzimáticas entre os dois grupos, visto que, o diagnóstico precoce é fundamental para sucesso de um possível tratamento e/ou a promoção da qualidade de vida do paciente. Neste sentido nota-se a importância da incorporação dos testes de rastreamento de DLD na triagem neonatal.

Neste sentido, Vernon (2015) relata que a triagem neonatal oferece a oportunidade de detectar um EIM em uma fase assintomática o que permite realizar intervenções médicas que alteram significativamente o curso natural da doença. A triagem neonatal teve grande impacto na melhoria dos resultados de EIM e para isto uma triagem bem sucedida de recém-nascidos inclui uma boa avaliação, acompanhamento e uma boa gestão. Para isto Em 2002, o American College of Medical Genetics recomendou que 29 condições devessem ser incluídas em um painel, denominado de painel de triagem uniforme recomendado. Desde então este painel vem sendo atualizado, inclusive para a doença de Pompe que estaria sendo cotada para esta inclusão.

Todavia, deve-se estabelecer outras metodologias de quantificação de atividade enzimática para completar a avaliação desta metodologia na medida em que o uso de amostras de SIPF vem sendo estudadas como método de triagem neonatal para as DLD, para que novos casos detectados sejam confirmados precocemente e o paciente seja indicado ao tratamento adequado de forma precoce.

Em relação a estas metodologias, Camelier et al., (2015) em um estudo realizado para detecção de pacientes com Pompe, Gaucher e Mórquio A em amostras de SIPF, demonstra

que devido ao seu alto conteúdo celular, estes tipos de amostras também podem ser um excelente complementar para a medição de metabólitos por espectrometria em massa in tandem, método que permite pesquisa de inúmeros metabólitos em uma única amostra de SIPF, ou seja, uma excelente estratégia para a triagem neonatal.

Em seus resultados, Civallero et al. (2006) demonstra que os métodos de diagnóstico utilizando-se amostras de SIPF são válidas para a detecção de pacientes com DLD e deve-se considerar sua incorporação como procedimentos regulares nos laboratórios. A partir disto, uma das consequências mais provável desta adoção seria o aumento do número de casos detectados, auxiliando na detecção da real incidência de DLD, especialmente em países de vasta extensão e que possuem muitas áreas de difícil acesso, como o Brasil.

Todavia, o teste não é considerado suficiente e a dosagem enzimática em leucócitos é geralmente solicitada para o diagnóstico, porém, às vezes se torna difícil o envio de amostras de sangue líquido de áreas remotas para os laboratórios de referência, tornando os ensaios em leucócitos nestes casos, desafiador.

Neste sentido, em estudo realizado por Verma et al. (2016), onde foram dosadas amostras de SIPF de indivíduos indianos e paquistaneses com suspeita de DLD, houve um resultado de 100% de sensibilidade e 95,2% de especificidade nos ensaios enzimáticos, porém foram utilizados protocolos modificados e as amostras tiveram resultados confirmados por técnicas de dosagem enzimática em amostras de leucócitos e biologia molecular.

Portanto, concluiu-se que dosagens enzimáticas utilizando-se amostras de SIPF, validado por estudos posteriores, utilizando-se metodologias inovadoras com auxílio de exames confirmatórios, poderia substituir a necessidade de amostras em sangue líquido para uma confirmação diagnóstica dessas doenças.

6. CONCLUSÃO

No presente estudo foi possível iniciar o processo de padronização do protocolo de investigação para DLDs a partir da utilização de amostras de SIPF, além de estabelecer valores de referência para controles normais adultos e RN. O estabelecimento desses valores demonstra a importância de estudos como estes, visto que a necessidade de técnicas que auxiliem a triagem e diagnóstico de DLD de forma precoce é crucial para o estabelecimento de um tratamento preciso, bem como a promoção da qualidade de vida do paciente.

Ainda há a grande necessidade de estudos que apontem metodologias que confirmem as técnicas de dosagem em amostras de SIPF como confirmadoras de diagnóstico, visto que

esta pode ser uma grande alternativa de investigação de casos de doenças metabólicas hereditárias ainda no períodos neonatal. Para isto, ainda é preciso que haja o estabelecimento e fortalecimento de protocolos de controle interno e externo de qualidade que avaliem estas técnicas a fim de torná-las mais precisas em relação aos diagnósticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AERTS, J.M., et al. Biochemistry of glycosphingolipid storage disorders: implications for therapeutic intervention. *Trans. R. Soc. Lond. B.*, v. 358, 905-914, 2003.

BARBOSA, A. C. S. *Abordagens terapêuticas em doenças hereditárias do metabolismo dos esfingolípideos*. 2011. 46 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal, 2011.

BARSAGLINI, C. P., et al. A Síndrome de Anderson-Fabry: avanços e desafios para o diagnóstico e tratamento. *Rev. Ciência & Inovação*, v. 2, n.1, dez, 2015.

BOCHERNITSAN, A. N. *Mucopolissacaridose IVA: análise molecular e caracterização de haplótipos intragênicos no gene Galns*. 2015. 37 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2015.

BOOT, R. G., et al. Cloning of a cDNA encoding chitotriosidase. A human chitinase produced by macrophages. *J Biol Chem*, 270:26252–26256.

BOY, R.; SCHWART, V. D., As doenças lisossômicas e tratamento das Mucopolissacaridoses. *Rev. Hosp. Univ. Pedro Ernesto*, v. 10, p. 61- 72, 2012.

BOY. R; SCHRAMM, F. R. Principle of protection and treatment of rare genetic diseases in Brazil: the case of lysosomal storage disorders. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro (RJ), v. 25, n. 6, p. 1276 – 1284, jun., 2009.

BRUSTOLIN, S. *Avaliação de um serviço pioneiro de informações sobre erros inatos do metabolismo*. 2005. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2005.

CAMELIER, M., et al. Extended use of dried-leukocytes impregnated in filter paper samples for detection of Pompe, Gaucher, and Morquio A diseases. *Clin Chim Acta.*, v. 15, p. 20-218, jun, 2015.

CARLOS, C. S. Glycogenoses: an overreview. *Bioscience Journal*, Uberlândia – Sp, v. 30, n. 5, p. 1598-1605, Sep/Oct, 2014.

CASTILHOS, C. D., et al. Influence of pre-analytical factors on α -galactosidase A, arylsulfatase B and α -glucosidase activities measured on dried blood spots on filter paper. *Gene*, v. 44, p. 922-926, 2011.

CASTILHOS, C. D., et al. Determination of the lysosomal hydrolase activity in blood collected on filter paper, an alternative to screen high risk populations. *Gene*, v. 25, n. 2, p. 344-7, feb., 2014.

CHAMOLES, N. A., et al. Gaucher and Niemann–Pick diseases—enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper: retrospective diagnoses in newborn-screening cards. *Clinica Chimica Acta*, v. 317, p. 191–197, 2002.

CIVALLERO, G., et al. Twelve different enzyme assays on dried-blood filter paper samples for detection of patients with selected inherited lysosomal storage diseases. *Clinica Chimica Acta*, v. 372, p. 98–102, 2006.

DAITX, V. V., et al. Comparison between alpha-galactosidase A activity in blood samples collected on filter paper, leukocytes and plasma. *Clinical Biochemistry*, v. 45, p. 1233-1238, 2012.

DELNOOZ, C. C. S., et al. New cases of adult-onset sandhoff disease with a cerebellar or lower motor neuron phenotype. *J. Neurology Neurosurgery Psychiatry*, v. 81, n. 9, p. 968-972, set, 2009.

ELBIN, C. S., et al. The effect of preparation, storage and shipping of dried blood spots on the activity of five lysosomal enzymes. *Clinica chimica acta*, v. 412, p. 12 – 1207, 2011.

FRANCO, F. T. C. *Análise bioquímica das enzimas β - glicosidase e quitotriosidase em sangue impregnado em papel filtro em diferentes condições clínicas*. 2011. 53f Trabalho de Conclusão de curso (Bacharelado em Biomedicina) – Universidade Federal do Pará, Belém (PA), 2011.

FUTERMAN, A. H.; HANNUN, Y. A. The complex life of simple sphingolipids. *Embo Reports*, v. 5, n. 8, ago, 2004.

GASPAROTTO, N., et al. *Rapid diagnostic testing procedures for lysosomal storage disorders: a- glucosidase and b-galactosidase assays on dried blood spots*. *Clin. Chim. Acta*. v. 402, p. 41 – 38, 2009.

GEORGIANNE. Arnold L. *Inborn errors of metabolism in the 21st century: past to presente*. *Ann Transl Med*. v. 06, p. 24, 2018.

GIUGLIANI R., et al. Terapia de reposição enzimática para as mucopolissacaridoses I, II e VI: recomendações de um grupo de especialistas brasileiros. *Rev Assoc Med Bras*, V. 56, n. 3, p. 257 – 277, 2010.

GOLDIM, M. P. S. *Validação das técnicas fluorimétricas para estabelecimento da atividade específica da beta-glicosidase e quitotriosidase de sangue impregnado em papel filtro para o diagnóstico da Doença de Gaucher*. 2012. 113 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2007.

GUARANY, N. R. *Avaliação do efeito da terapia de reposição enzimática na capacidade funcional de pacientes com mucopolissacaridose*. 119 f. Dissertação (Mestrado em saúde da criança e do adolescente) - Faculdade de Medicina, Universidade do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2011.

JAIN, A.; KOHLI, A.; SACHAN, D. Infantile Sandhoff's disease with peripheral neuropathy. *Pediatric Neurology*, v. 42, 459-461, 2010.

KUBASKI, F., et al. Bone mineral density in mucopolysaccharidosis IVB. *Rev. Elsevier*, v. 8, p. 80 – 84, 2016.

LEAL, G. N. *Estudo ecocardiográfico de pacientes com mucopolissacaridose*. 2009. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas- Pediatria) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

LIMA, N. O. *Monitoramento da excreção de glicosaminoglicanos em pacientes com mucopolissacaridoses submetidos à terapia de reposição enzimática*. 2009. 60 f. Tese de conclusão final (Bacharelado em Biomedicina) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2009.

MARTINS, A. M. Erros Inatos do Metabolismo: Abordagens Clínicas. Disponível em: <http://docplayer.com.br/13545410-Erros-inatos-do-metabolismo.html>. Acesso em: 23. Dez. 2016.

MUENZER, J. The Mucopolysaccharidoses: A heterogeneous group of disorders with variable pediatric presentations. *Journal of pediatric*, Rio de Janeiro, 2004, v. 144, n. 5, p. 27-34, mai., 2004.

NEUFELD, E. F. Lysosomal storage disorders. *Rev. Biochem.*, v. 60, 257-280, 1991.

NEUFELD, E.F. & MUENZER, J. The mucopolysaccharidoses. In: Scriver C, Beaudet A, Sly W, et al, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York, NY: McGraw Hill; 2001:3421–3452.

NEVES, F. L., et al. Juvenile Pompe Disease: Retrospective Clinical Study. *Acta Med Port*, v. 26, n 4, p. 361- 370 Jul-Aug, 2013.

NOVO, J. B. *Clonagem e expressão da glucocerebrosidase humana em células de ovário de hamster chinês (CHO)*. 2010. 28 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto Butantan, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

OGAWA, O., et al. Impaired neural differentiation of induced pluripotent stem cells generated from a mouse model of sandhoff disease. *PLoS One*, v. 8, n. 1, jan, 2013.

PESSUTO, F. D. *Detecção de mutações em pacientes com mucopolissacaridose tipo I (MPS I)*. 2007. 64 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2007.

PINTO, L.L.C, et al. Grupo de estudo sobre MPS II: Avaliação prospectiva de 11 pacientes brasileiros com mucopolissacaridose II. *Jornal de Pediatria*, Rio de Janeiro, v.82, n.4, jul/ago, 2006.

POLO, G., et al. Diagnosis of sphingolipidoses: a new simultaneous measurement of lysosphingolipids by LC-MS/MS. *Clin Chem Lab Med.*, v. 1, n. 3, 403 – 414, mar, 2016.

REIS, F. C., et al. Glycogen storage disease type Ia: molecular study in Brazilian patients. *Journal of Human Genetics*, Tokyo, v. 46, n. 3, p. 146-149, 2001.

ROSSIER, V. F., et al. Mucopolissacaridose Tipo III (Síndrome de Sanfilippo) – Revisão e Relato de Casos Clínicos. *JBP – Rev Ibero-america. Odontopediatria & Odontologia de Bebê*. São Paulo, v. 7, n. 38, 2004.

ROZEMBERG, R. *Análise da incidência de mutações no Gene Hexa na população judaica brasileira – Avaliação da importância de um programa preventivo da doença de Tay- Sachs*. 2000. 114 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

SAOUAB, R., et al. A Case Report of Sandhoff Disease. *Clinical Neuroradiology*, v. 21, n. 2, p. 83-85, dez, 2011.

SHARMA, Abhisheak., et al. Dried blood spots: Concepts, presente, status, and future perspectives in bioanalysis. *Drug test analysis*, 2014.

SILVA, B. O., et al., *Análise molecular de polimorfismos no gene da Quitotriosidase em populações indígenas, de Belém (PA) e pacientes com doença de Gaucher*. 2010. Dissertação de Mestrado. Belém (PA). Universidade Federal do Pará. 2010.

SCHWARTZ, I. V. D., et al. Mucopolissacaridoses. In: Carakushanski G. Doenças genéticas em pediatria. 1º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. p. 4 – 180.

SILVA, A. P. G. S. *Doença de Pompe: À propósito de 2 casos clínicos do Hospital Pêro da Covilhã*. 2012. 85 f. Dissertação (Mestrado em Medicina) – Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal. 2012.

VERMA, J., et al. Inherited Metabolic Disorders: Efficacy of Enzyme Assays on Dried Blood Spots for the Diagnosis of Lysosomal Storage Disorders. *JIMD Rep*, v. 31, p. 15-27, 2016.

VIEIRA, T. A. *História Natural das Mucopolissacaridoses: Uma investigação da trajetória dos pacientes desde o nascimento até o diagnóstico*. 2007. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2007.

SCHWARTZ, I. V., et al. Treatment of inborn errors of metabolism. *J. Pediatr*, Rio de Janeiro, v. 84, n. 4, Ago, 2008.

SOUZA, C. N., et al. Triagem urinária para erros inatos do metabolismo em crianças com atraso no desenvolvimento. *Rev. Paraense de Medicina*, Belém, V. 21, n. 2, abr/jun, 2007.

WAJNER, M., et al. Investigação de erros inatos do metabolismo. *Rev. HCPA*, Rio Grande do Sul, n. 3, p. 343 – 360, 2001.

WILCOX, W. Lysosomal storage disorders: the need for better pediatric recognition and comprehensive care. *The Journal of Pediatrics*, v. 144, 3-14, 2004.

APÊNDICE



**Serviço Público Federal
Universidade Federal do Pará
Instituto de Ciências Biológicas**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) a participar, como voluntário (a), da pesquisa: **“Implantação de protocolo para dosagem de enzimas em amostras de sangue impregnado em papel filtro para diagnóstico de doenças lisossômicas de depósito”**, que é desenvolvida pelo Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo (Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará). Para que você decida participar ou não da pesquisa lhe serão prestadas as seguintes informações.

Este projeto tem como objetivo geral estabelecer mecanismos de validação de procedimentos laboratoriais envolvidos na investigação de doenças lisossomais de depósito. As Doenças Lisossomais de depósito representam um grupo de pelo menos 50 entidades genéticas distintas dentro dos Erros Inatos do Metabolismo, cada uma delas resultante de deficiência de uma atividade proteica particular,

Riscos e desconfortos potenciais: No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor decorrente da punção da pele. Complicações de coleta de sangue rotineira são raras e geralmente de pequeno porte.

Benefícios esperados: Este estudo poderá no futuro beneficiar a investigação e o monitoramento de doenças lisossomais de depósito, através de metodologias mais precisas.

Procedimentos alternativos: Eu entendo que tive o direito de recusar a participar deste projeto, sem quaisquer prejuízos ou contrapartidas.

Pelo presente Consentimento, declaro que fui esclarecido, de forma detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento e coerção, dos objetivos, da justificativa, dos procedimentos que serei submetido, dos riscos, desconfortos e benefícios do presente projeto de pesquisa, assim como dos procedimentos alternativos aos quais poderia ser submetido, todos acima listados.

Fui igualmente informado:

1. da garantia de receber esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados a pesquisa;
2. da liberdade de retirar meu consentimento, a qualquer momento, e deixar de participar do estudo, sem que isso traga quaisquer prejuízos;
3. da segurança de que não serei identificado e que se manterá o caráter confidencial das informações relacionadas com a minha privacidade;
4. da natureza e objetivo do projeto de pesquisa;
5. que poderei não ter benefício direto por participar do estudo
6. que os possíveis riscos e/ou efeitos adversos, desconforto e inconveniências foram explicadas a mim;

7. que não serei remunerado financeiramente por participar deste estudo.
8. que o material (sangue) coletado seja utilizado somente no projeto supracitado
9. Autorizo o armazenamento das minhas amostras (sangue), obtidas nesse estudo, para utilização futura. Nesse caso, porém, entendo que serei recontactado para fornecer consentimento específico.

Belém, ____ / ____ / ____

Assinatura do Participante

Assinatura do Responsável

Assinatura do Pesquisador Responsável
Nome: Prof Dr. Luiz Carlos Santana da Silva
End.: Av. Pedro Miranda, 1807 / 203,
Bairro Pedreira, CEP. 66080-000
Fone 09132018030