

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

VANESSA VITCOSKI DAITX

Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS DA ALFA-
GALACTOSIDASE A PARA O DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE FABRY.**

Porto Alegre
2014

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

VANESSA VITCOSKI DAITX

Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS DA ALFA-
GALACTOSIDASE A PARA O DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE FABRY.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em
Ciências Biológicas: Bioquímica – Universidade Federal do
Rio Grande do Sul – como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Mestre em Bioquímica

Orientadora: Prof^a. Dr^a Janice Carneiro Coelho

Porto Alegre
2014

CIP - Catalogação na Publicação

Vitcoski Daitx, Vanessa

AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS DA ALFA-GALACTOSIDASE A PARA O DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE FABRY. / Vanessa Vitcoski Daitx. -- 2014.
107 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. Erros Inatos do Metabolismo. 2. Doenças Lisossômicas. 3. Diagnóstico da Doença de Fabry. 4. Alfa-galactosidase A. I. Carneiro Coelho, Janice, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e especialmente:

À Janice, minha orientadora, pela oportunidade e pelo privilégio de conviver todos estes anos, desde o período de iniciação científica. Também não posso deixar de mencionar as nossas conversas e reuniões que sempre me deixaram mais tranquila e animada. Agradeço por tudo o que passamos juntas, e nunca vou esquecer os momentos de entusiasmo após cada resultado obtido.

Ao grupo de pesquisas de Doenças Lisossômicas de Depósito do Laboratório 25, pela oportunidade de conviver com pessoas repletas de recursos intelectuais e afetivos. Sem dúvida aprendi muito com cada um dos colegas com quem convivi no Departamento de Bioquímica.

Às amigas Aline, Ana Carolina e Jaqueline que foram muito mais do que colegas de laboratório, participando de todas as felicidades e angústias durante o período do mestrado. Muito obrigada mesmo!

À Vitória, bolsista de Iniciação científica que acompanhou praticamente todo o trabalho do mestrado, pela competência, comprometimento e responsabilidade que demonstrou desde o início.

À Jamila, amiga e colega de mestrado, por estar ao meu lado desde as preparações para prova de mestrado. A ajuda e os momentos de discussão sobre os experimentos e resultados foram imprescindíveis. Jamila, obrigada pela companhia, pela amizade e pela colaboração!

Aos pacientes, bem como à Associação Gaúcha de Pacientes e Portadores de Doença de Fabry e Familiares (AGPPDFF) e aos doadores e funcionários do banco de sangue do Hospital de

Clínicas de Porto Alegre pelas amostras de sangue utilizadas neste estudo. Sem a participação dos voluntários, não seria possível realizar este estudo. Os pacientes são a própria justificativa para realização deste estudo, uma vez que este visa o aprimoramento das técnicas de diagnóstico para que o tratamento possa ser iniciado o quanto antes.

Aos chefes e colegas da RELINTER pelo apoio durante o último ano do mestrado.

A todos os servidores do Departamento, em especial à Cléia pela paciência e solicitude.

Aos meus familiares e amigos pelo apoio que sempre me deram, confiando e entendendo os momentos de ausência devido às atividades do mestrado.

Aos meus pais pelo caráter e honestidade, e pelo exemplo de pessoas batalhadoras que são.

Ao meu marido, Gabriel, pelo incentivo, cumplicidade, carinho, paciência e por demonstrar, diariamente, através de pequenos gestos o quanto somos importantes um para o outro.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao CNPq e FAPERGS pelo apoio financeiro.

RESUMO

A doença de Fabry (DF) é uma doença lisossômica com herança ligada ao cromossomo X, causada pela deficiência na enzima alfa-galactosidase A (GLA), gerando acúmulo progressivo de globotriaosilceramida no interior dos lisossomos. O diagnóstico bioquímico de DF é baseado na medida da atividade enzimática da GLA e pode ser difícil em alguns casos, devido à diversidade de fenótipos encontrados e à diferença existente entre indivíduos masculinos (hemizigotos) e femininos (heterozigotos). Tendo em vista a necessidade de aprimoramento das técnicas utilizadas para este diagnóstico, o objetivo deste estudo foi estabelecer e comparar as propriedades bioquímicas e cinéticas da GLA em amostras de sangue impregnado em papel filtro (SPF), plasma e leucócitos de pacientes com DF e indivíduos saudáveis, bem como avaliar o uso de N-acetilgalactosamina (GalNAc) como inibidor da alfa-galactosidase B em ensaios realizados para os mesmos fins. A atividade da GLA foi caracterizada e comparada em termos de: pH ótimo, Km, V_{máx} e termoestabilidade. Foram realizados ensaios para medida da atividade da GLA utilizando diferentes concentrações de GalNAc em amostras de SPF, plasma e leucócitos de controles e pacientes com DF. Foi observada diferença entre a V_{máx} da GLA de pacientes com DF e controles saudáveis utilizando amostras de SPF, plasma e leucócitos. Em leucócitos, a pré-incubação a 50 °C por 1 hora foi efetiva para diferenciar pacientes com DF de controles. Foi observada diferença entre a atividade da alfa-galactosidase na ausência e presença de GalNAc, em todas as concentrações testadas do inibidor, utilizando amostras de SPF de mulheres com DF e amostras de plasma de homens com DF. Em plasma, atividade residual de mulheres e homens saudáveis diferiu em ensaios utilizando 50 mM de GalNAc, e a atividade residual de homens com DF foi menor que a atividade de homens saudáveis, para todas as concentrações testadas do inibidor. Em leucócitos, não foi observada diferença na atividade em diferentes concentrações de GalNAc, nem entre os grupos estudados. Os resultados da comparação das propriedades bioquímicas e cinéticas da GLA podem ser usados como ferramenta auxiliar para o diagnóstico da DF, especialmente em casos de pacientes cuja atividade da GLA se encontra dentro dos limites considerados normais. A utilização de GalNAc pode diminuir os resultados falso-negativos, principalmente quando utilizado amostras de SPF e plasma. Em leucócitos, o uso do inibidor parece não ser necessário.

ABSTRACT

Fabry disease (FD) is a lysosomal disorder with X-linked inheritance, caused by a deficiency in the enzyme alpha-galactosidase A (GLA), resulting in progressive accumulation of globotriaosylceramide within lysosomes. The biochemical diagnosis of FD is based on the measurement of GLA enzymatic activity and can be difficult in some cases due to the diversity of phenotypes and the difference between male (hemizygous) and female (heterozygous) subjects. Given the need for improvements in the diagnosis techniques, the aim of this study was to establish and compare the GLA biochemical and kinetic properties using dried blood spots (DBS), plasma and leukocytes samples of FD patients and healthy individuals, as well as evaluating the use of N-acetylgalactosamine (GalNAc) as an inhibitor of alpha-galactosidase B in assays for the same purposes. The GLA activity was characterized and compared in terms of pH optimum, K_m , V_{max} and thermostability. Assays for measuring GLA activity using different concentrations of GalNAc in DBS, plasma and leukocytes samples of FD patients and controls were performed. A difference was observed between the V_{max} of FD patients and controls using DBS, plasma and leukocyte samples. In leukocytes, pre-incubation at 50 °C for 60 min was effective to differentiate FD patients from healthy controls. It was observed a difference between alpha-galactosidase activity in the absence and presence of GalNAc at all concentrations of inhibitor tested, using DBS samples of women with FD and plasma samples of men with DF. In plasma, the residual activity of male and female healthy subjects differed in assays using 50 mM GalNAc, and the residual activity of men with FD was lower than the activity of healthy men, for all concentrations of the inhibitor. In leukocytes, no difference in GLA activity was observed neither at different concentrations of GalNAc nor between groups. The results comparing the biochemical and kinetic properties of GLA can be used as an auxiliary method to the FD diagnosis, especially in cases of patients whose GLA activity is within normal range. The use of GalNAc can decrease the false-negative results, especially when DBS and plasma samples are used. In leukocytes, the use of the inhibitor seems not to be necessary.

LISTA DE ABREVIATURAS

Alfa-GalNAcase – Alfa-N-acetilgalactosaminidase

DF – Doença de Fabry

DBS – Dried blood spot

DL – Doenças Lisossômicas

EC – *Enzyme commission*

EIM – Erros Inatos do Metabolismo

GalNAc – N-acetilgalactosamina

Gb3 – Globotriaosilceramida

GLA – Alfa-galactosidase A

GLB – Alfa-galactosidase B

Km – Constante de Michaelis-Menten

Lyso-Gb3 – Globotriaosilesfingosina

M6P – Receptor manose-6-fosfato

OMIM – *Online Mendelian Inheritance in Man*

RER – Retículo Endoplasmático Rugoso

SPF – Sangue impregnado em papel filtro

TRE – Terapia de reposição enzimática

V_{máx} – Velocidade máxima

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Reação catalisada pela enzima alfa-galactosidase A.....	21
Figura 2: Estrutura Tridimensional da Alfa-galactosidase A humana.....	25

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	III
RESUMO	V
ABSTRACT	VI
LISTA DE ABREVIATURAS	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Erros Inatos do Metabolismo	12
1.2 Doenças Lisossômicas	13
1.3 Lisossomos e Enzimas lisossômicas	16
1.4 Doença de Fabry	17
1.5 Alfa-galactosidase A	21
2. OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo Geral	28
2.2 Objetivos Específicos	28
3. CAPÍTULO 1	29
<i>Artigo: Comparing the alpha-galactosidase A biochemical properties from healthy individuals and Fabry disease patients.</i>	29
4. CAPÍTULO 2	57
<i>Artigo: Effect of N-acetylgalactosamine on alpha-galactosidase A activity in dried blood spot, plasma, and leukocytes from Fabry disease patients and healthy individuals.</i>	57
5. DISCUSSÃO	80
6. CONCLUSÕES	90

7. REFERÊNCIAS	92
8. ANEXOS	101
8.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Único	102
8.2 Parecer com aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa – UFRGS.....	104
8.3 Termo de concordância - Banco de Sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre	105
8.4 Artigo submetido à <i>Clinica Chimica Acta</i>	106
8.4 Artigo submetido à <i>Clinical Biochemistry</i>	107

1. INTRODUÇÃO

A doença de Fabry (DF), tema principal deste estudo, faz parte de um grupo de doenças metabólicas hereditárias conhecido como Erros Inatos do Metabolismo (EIMs). Esta doença é, ainda, enquadrada em uma classe de EIM denominada Doenças Lisossômicas (DLs).

1.1 Erros Inatos do Metabolismo

O termo EIM foi proposto em 1908, por Sir Archibald Garrod, utilizando como exemplos ilustrativos a alcaptonúria, a pentosúria, o albinismo e a cistinúria. Através de seus estudos sobre estas desordens, ele concluiu que os sintomas poderiam ser explicados pela presença de defeitos pontuais em vias metabólicas específicas para cada doença. Dessa forma, Garrod evidenciou a natureza dinâmica do metabolismo ao mostrar que vias metabólicas normais podem sofrer variação por herança mendeliana (Scriver, 2008).

Atualmente, sabemos que os EIMs são causados por alterações a nível molecular, que resultam em perda de uma enzima funcional, transportador transmembrana, ou proteína similar, ocasionando bloqueio da via metabólica correspondente. A atividade de enzima, transportador ou proteína similar pode estar ausente devido à falta de síntese, síntese de proteína deficiente ou destruição da proteína normalmente sintetizada. Devido ao bloqueio da via metabólica, poderá ocorrer acúmulo de metabólitos antes do bloqueio e/ou deficiência de produto(s) final(s) da via (Pollitt et al., 1997; Childs et al., 2013).

É comum a ocorrência de variabilidade clínica dentro da mesma doença, com formas leves, moderadas ou graves. Em alguns casos também é possível observar heterogeneidade genética, quando a deficiência de enzimas diferentes gera um mesmo quadro clínico (Pollitt et al., 1997).

Quanto ao tipo de herança, a maioria dos EIMs é autossômica recessiva, tendo a prole 25% de chance de apresentar a doença em caso de pais heterozigotos. Alguns EIMs possuem herança ligada ao cromossomo X, como no caso da DF, sendo o risco de apresentar a doença de 50% para o sexo masculino e para as filhas 50% de serem portadoras, caso a mãe seja uma heterozigota (Jimenez-Sanchez et al., 2013). Atualmente são conhecidos mais de 1000 EIMs diferentes. Embora eles sejam raros quando considerados individualmente, em conjunto a incidência estimada pode chegar a mais de 1 em 800 nascidos vivos (Mak et al., 2013).

1.2 Doenças Lisossômicas

As DLs formam um grupo com mais de 50 doenças genéticas causadas pelo acúmulo de moléculas complexas que, normalmente, deveriam ser degradadas nos lisossomos. Esse acúmulo é causado, na maioria das vezes, pela deficiência de enzimas denominadas hidrolases lisossômicas, mas também pode ser ocasionado por outro fator que impeça ou diminua 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; De Jesus et al., 2009; Lampe et al., 2013). O acúmulo de substratos específicos para cada uma das enzimas deficientes, nos lisossomos de diversos tecidos leva a disfunção de células, tecidos e órgãos. Caso a doença não seja adequadamente diagnosticada e tratada, esta disfunção causa deterioração física e/ou neurológica progressiva, podendo levar à morte do paciente (Boustany, 2013; Brand et al., 2013; Lampe et al., 2013). De forma geral, os sintomas das DLs compreendem um amplo espectro de anormalidades esqueléticas, comprometimento do sistema nervoso e disfunções orgânicas (Boustany, 2013; Lampe et al., 2013).

Cada uma dessas doenças é considerada relativamente rara quando analisada individualmente, porém, todas as DLs juntas afetam um em cada 5.000 a 8.000 recém-nascidos (Meikle et al., 1999; Wilcox, 2004; Boustany, 2013; Brand et al., 2013).

As DLs podem ser classificadas de acordo com a natureza do substrato acumulado em: (i) esfingolipidoses: deficiência na degradação de esfingolipídios, como exemplo podemos citar doença de Gaucher, DF e doença de Niemann-Pick; (ii) mucopolissacaridoses: deficiência de hidrolase lisossomal ou sulfatase lisossomal que resulta em acúmulo de glicosaminoglicanos nos lisossomos e sua excreção na urina; (iii) glicoproteínoses: deficiência na clivagem sequencial de resíduos de açúcares dos carboidratos das glicoproteínas, aqui exemplificadas pela fucosidose, manosidose e sialidose; (iv) grupo heterogêneo formado por outras DLs clinicamente intermediárias, como o caso da mucopolipidose, uma DL clinicamente intermediária entre esfingolipidose e mucopolissacaridose (Watts, 2003).

Embora não exista cura para nenhuma dessas doenças, os pacientes podem receber tratamento médico convencional, visando o alívio dos sintomas, principalmente dor e desconforto, melhorando a qualidade de vida do mesmo e de seus familiares. Além disso, nas últimas décadas vêm sendo desenvolvidos tratamentos específicos para cada doença, como terapia gênica, terapia com chaperonas, transplante de medula óssea, inibidores de síntese de substrato e terapia de reposição enzimática que, entretanto, não se encontram disponíveis para todas as DL (Boustany, 2013). Mesmo no caso de doenças com tratamento específico disponível, como a terapia de reposição enzimática, a abordagem multidisciplinar vem sendo cada vez mais valorizada, com tratamento médico convencional e terapias específicas geralmente sendo usados concomitantemente (Germain, 2010). O fato de muitos tratamentos disponíveis serem invasivos, também corrobora para que a busca por alternativas seja de grande importância.

Ao mesmo tempo em que percebemos o aumento do número de tratamentos alternativos para as DLs, também cresce a preocupação com o diagnóstico, para que esse seja adequado, de fácil acesso e realizado de maneira mais precoce possível, visando o início do tratamento cada vez mais cedo. O diagnóstico para as DLs é, na maioria das vezes, realizado através de ensaios bioquímicos de medida da atividade enzimática específica em plasma, leucócitos ou fibroblastos, podendo ser confirmado por testes moleculares (Pastores and Maegawa, 2013). As amostras de plasma e leucócitos são separadas a partir de uma amostra de sangue heparinizado, sendo necessários para esse procedimento cerca de 10mL de sangue, variando conforme o número de enzimas a serem analisadas. Para garantir a qualidade dessa amostra, o material coletado deve ser processado da maneira mais rápida possível, o transporte deve ser feito sob refrigeração e, após o processamento, as amostras devem ser armazenadas a -40°C (Wajner et al., 2007). Os fibroblastos são gerados através de cultura celular a partir de uma biópsia de pele, onde 3 a 5 mm de pele são retirados do paciente gerando certo desconforto para o mesmo (Sopelsa et al., 2000).

Além disso, a triagem em populações de alto risco por meio de ensaios realizados em sangue impregnado em papel filtro (SPF) também vem ganhando cada vez mais espaço (Chamoles et al., 2001; Chamoles et al., 2002; Civallero et al., 2006). Os ensaios enzimáticos com amostras de SPF, apesar de apresentar algumas vantagens, não são utilizados como diagnóstico final, uma vez que os resultados são expressos em atividade enzimática total e não atividade enzimática específica (que leva em conta a concentração da amostra), como é feito atualmente em leucócitos ou fibroblastos.

A grande variedade de fenótipos e a semelhança entre os sintomas de diferentes DLs tornam o diagnóstico mais difícil, implicando na necessidade de acompanhamento médico especializado (Staretz-Chacham et al., 2009).

1.3 Lisossomos e Enzimas lisossômicas

Lisossomos são organelas citoplasmáticas ácidas que contêm numerosas enzimas hidrolíticas capazes de degradar a maioria das macromoléculas biológicas. Estas organelas participam na morte de agentes infecciosos, tais como bactérias, na reciclagem de componentes celulares, através de autofagia, na remodelagem de tecidos, além da degradação de diversos compostos como hormônios e lipoproteína de baixa densidade (Kornfeld, 1987).

As enzimas lisossômicas são sintetizadas em polissomos ligados à membrana do retículo endoplasmático rugoso (RER). Cada uma dessas proteínas possui um peptídeo sinal que permite o transporte vetorial da proteína ao longo do lúmen do RER. As enzimas lisossômicas sofrem glicosilação de resíduos específicos de asparagina e, após, o peptídeo sinalizador é removido e as proteínas são translocadas do RER para o Complexo de Golgi, onde ocorre fosforilação dos oligossacarídeos. A fosforilação de certos resíduos de manose de enzimas hidrossolúveis é um processo que, entre outras consequências, resulta na criação dos sítios de reconhecimento do receptor manose-6-fosfato (M6P) no complexo de Golgi. Dessa forma, as enzimas lisossômicas são separadas de proteínas destinadas à secreção (Kornfeld, 1987).

As vesículas contendo glicoproteínas ligadas a receptores surgem do complexo de Golgi e ligam-se a vesículas pré-lisossômicas, onde ocorre a dissociação da glicoproteína de seu receptor devido à acidificação deste compartimento. O receptor que se dissocia da enzima é reciclado, retornando ao Complexo de Golgi, onde poderá ser utilizado várias vezes, enquanto os pré-lisossomos se fundem a lisossomos que receberão suas enzimas (Kornfeld, 1987).

Caso não ocorra acidificação, não haverá dissociação do complexo enzima-receptor e consequentemente o receptor M6P não retorna ao Complexo de Golgi. Na carência do receptor, glicoproteínas que deveriam ter como destino os lisossomos continuam na via de secreção e são liberadas (Kornfeld, 1987).

1.4 Doença de Fabry

A DF (OMIM 301500) é uma doença metabólica com herança ligada ao cromossomo X, ao contrário da maioria das DLs, que possuem herança autossômica recessiva. A mutação relacionada a essa doença ocorre no gene localizado na posição q22.1 do cromossomo X (Nakamura et al., 2011). É causada pela deficiência na enzima alfa-galactosidase A (GLA, EC 3.2.1.22), gerando acúmulo progressivo de glicosfingolipídeos com porção terminal alfa-galactosil, predominantemente globotriaosilceramida (Gb3) e, em menor extensão, galabiosilceramida e substâncias do grupo sanguíneo B. Este acúmulo ocorre principalmente nas células endoteliais, no rim, coração e células nervosas, gerando uma série de sintomas como acroparestesia, angioqueratomas, problemas de visão e desenvolvimento de fibrose tecidual irreversível nos rins e coração (Desnick et al., 2013).

Os primeiros sintomas costumam aparecer ainda na infância, entre 3 e 10 anos de idade, sendo que indivíduos do sexo feminino, heterozigotos, normalmente apresentam sintomas alguns anos mais tarde (Germain, 2010). Com o passar dos anos, a progressão da doença gera danos a órgãos vitais em ambos os gêneros, levando à progressiva falência desses órgãos (principalmente rins e coração), o que diminui consideravelmente a expectativa de vida dos pacientes.

Considera-se que alguns homens adultos desenvolvem o fenótipo “clássico” da doença, embora exista grande variação nesse grupo de pacientes. As mulheres portadoras do gene, heterozigotas, exibem um amplo espectro de fenótipos, desde graves sintomas relacionados ao fenótipo “clássico”, até um quadro praticamente assintomático. A grande variação de sintomas em mulheres pode ser, em grande parte, explicado pela inativação aleatória de um dos

cromossomos X, que pode ser tanto o cromossomo portador da mutação para DF, como o outro normal (Elstein et al., 2012).

Dados epidemiológicos sugerem que a DF afete desde um em cada 476.000 a um em 117.000 indivíduos na população em geral (Germain, 2010). Entretanto, devido à raridade da doença e ao desconhecimento da mesma, acredita-se que esses dados possam estar subestimados. Além disso, iniciativas de triagem neonatal masculina encontraram prevalências mais altas, como 1 em 3100 recém-nascidos na Itália (Spada et al., 2006) e, surpreendentemente, 1 em 1500 recém nascidos do sexo masculino em Taiwan, sendo que cerca de 86% eram portadores de uma mutação relacionada a um fenótipo de desenvolvimento tardio de problemas cardíacos (Hwu et al., 2009; Lin et al., 2009).

O tratamento para DF une o uso de tratamentos médicos convencionais com tratamentos específicos para a doença. O convencional ajuda a atenuar os problemas causados pela doença trazendo benefícios em curto prazo para o paciente. A Terapia de Reposição Enzimática (TRE) para DF encontra-se disponível desde 2001. Em muitos países são encontradas duas opções comerciais de enzima recombinante: agalsidade alfa (Replagal®; Shire, Cambridge, EUA), produzida através de cultura de fibroblastos humanos e usada com a dose de 0,2 mg/kg a cada duas semanas, e agalsidase beta (Fabrazyme®; Genzyme Corp, Cambridge, EUA), produzida pela expressão do gene humano para a alfa-galactosidase A em células de ovário de hamster chinês e usada com a dose de 0,1 mg/kg a cada duas semanas (Lee et al., 2003; Sakuraba et al., 2006).

O uso das duas enzimas recombinantes vem sendo monitorado e comparado em diversos trabalhos, ambos apresentando resultados positivos em relação à diminuição dos sintomas apresentados pelos pacientes tratados (Germain, 2010).

O diagnóstico da DF, assim como de todas as DL, deve ser realizado o quanto antes, com o objetivo de iniciar o tratamento, particularmente porque, neste caso, a TRE já se encontra disponível. Entretanto, os sintomas podem confundir os médicos, impedindo uma indicação clínica adequada. Um dos principais fatores é a grande variação de fenótipos passíveis de serem encontrados, além do fato de que sintomas característicos como o comprometimento dos sistemas nervoso, renal e cardiovascular, geralmente só aparecem em idade mais avançada. Essa dificuldade de identificação de possíveis portadores da doença acarreta um atraso no diagnóstico que, normalmente, não ocorre antes que o paciente já tenha consultado uma série de especialistas médicos (Germain, 2010).

Após a indicação médica, o diagnóstico geralmente é realizado através de ensaios enzimáticos para determinar a atividade da GLA. Em indivíduos do sexo masculino, o diagnóstico enzimático é definitivo quando realizado em plasma ou leucócitos. Porém, em indivíduos do sexo feminino (heterozigotos) os resultados podem ser normais, apesar de apresentarem DF (Linthorst et al., 2005). Por este motivo, o diagnóstico feminino é conclusivo apenas através de análise genética para mutações no gene da GLA, existindo mais de 585 mutações descritas (Elstein et al., 2012). Entretanto, é importante ressaltar que o diagnóstico bioquímico para DF é mais rápido e menos oneroso que o molecular, que é mais complexo e trabalhoso devido ao fato de o sequenciamento completo do gene ser necessário para determinar a mutação de cada paciente, uma vez que existem poucas mutações comuns (Germain, 2010).

Assim como em outras DL, a triagem de populações de alto risco para a DF pode ser feita com a utilização de SPF, mas os resultados dos ensaios enzimáticos realizados com esse material não podem ser considerados definitivos para o diagnóstico, tornando necessária a confirmação em plasma ou leucócitos em homens e molecular em mulheres. Entretanto, a utilização de SPF tem diversas vantagens em relação ao uso de outros materiais biológicos, entre elas: facilidade

para transporte, pois pode ser enviado via correio em envelope convencional sem necessidade de ser refrigerado (Rodrigues et al., 2009); fácil volume de reação, reduzindo os custos em relação aos ensaios convencionais (Civallero et al., 2006); maior segurança na manipulação das amostras, diminuindo as chances de contaminação (Rodrigues et al., 2009).

Mais recentemente, Daitx e colaboradores (2012) verificaram a necessidade de aprimoramento das técnicas utilizadas para diagnóstico bioquímico, devido à diferença encontrada entre a atividade da GLA em amostras de SPF e plasma de homens e mulheres saudáveis. Posteriormente, foi encontrado resultado semelhante (Pasqualim et al., 2014), confirmando a necessidade de utilizar valores de referência específicos para cada gênero, visando uma melhor diferenciação entre os pacientes com DF do sexo feminino e masculino e indivíduos saudáveis.

Além da medida da atividade da GLA, biomarcadores podem auxiliar no diagnóstico da DF, bem como servir de parâmetro para o acompanhamento da evolução da doença. Inicialmente, os níveis plasmáticos e urinários de Gb3 foram utilizados para este fim (Bekri et al., 2006). Entretanto, estudos demonstraram que os níveis de Gb3 nestes tipos de amostra não possuem correlação com a severidade das manifestações clínicas da DF (Young et al., 2005; Bekri et al., 2006; Vedder et al., 2007). Aerts e colaboradores (2007) demonstraram que pacientes com DF apresentavam níveis elevados de globotriaosilesfingosina (lyso-Gb3), um metabólito desacilado de Gb3, sendo o aumento dos níveis de lyso-Gb3 em pacientes com DF mais específico que o aumento de Gb3. Também foi demonstrado por estes pesquisadores, que seus níveis diminuíram em camundongos com DF submetidos à TRE, e, como o lyso-Gb3 é o metabólito acumulado em diversos tipos celulares, pode ser encontrado em altos níveis em células endoteliais de indivíduos com DF (Aerts et al., 2008). Além disso, foi proposto que o lyso-Gb3 participe no

desenvolvimento da neuropatia e processo inflamatório da DF (Sanchez-Nino et al., 2011). Dessa forma, o lyso-Gb3 pode ser utilizado como um biomarcador confiável para DF.

1.5 Alfa-galactosidase A

A enzima GLA catalisa a hidrólise de resíduos alfa-galactosil terminais não reduzidos de alfa-galactosídeos, incluindo oligossacarídeos de galactose, galactomananos e galactolipídeos, no interior dos lisossomos (Figura 1). Sua deficiência causa acúmulo progressivo destes glicoesfingolipídeos com porção terminal alfa-galactosil.

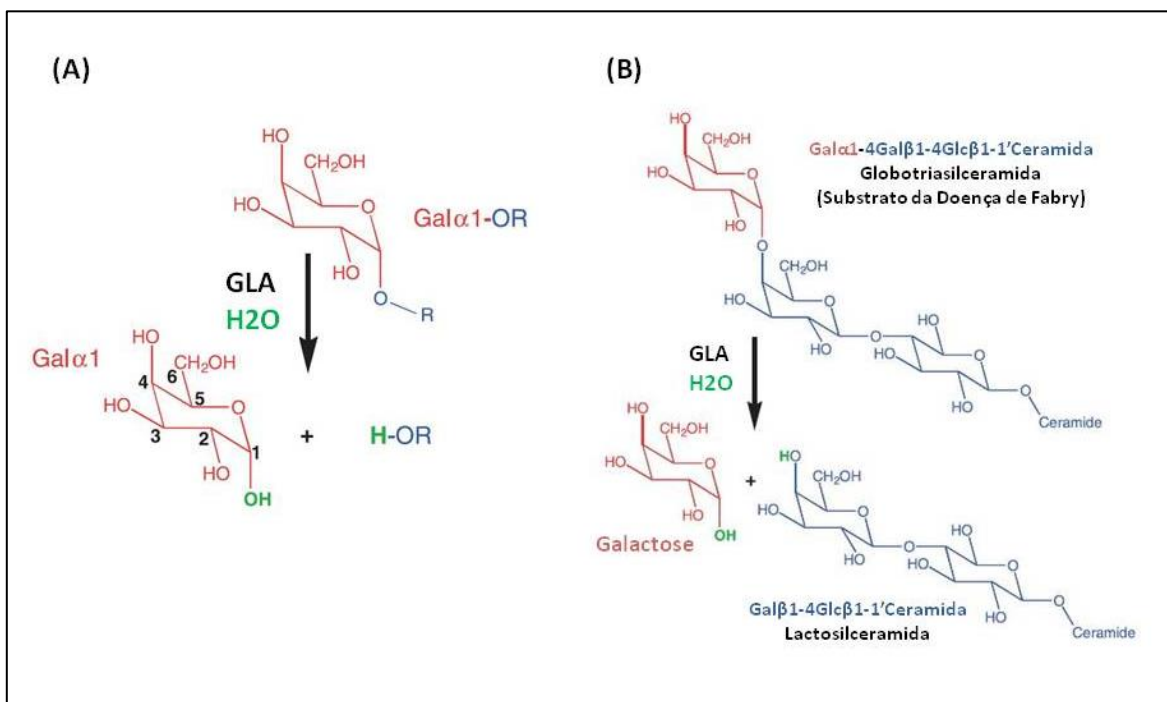


Figura1: Reação catalisada pela enzima alfa-galactosidase A (GLA). (A) Esquema geral da reação da GLA. Uma galactose terminal é clivada de um oligossacarídeo, glicoproteína, ou glicolipídeo, produzindo alfa-galactose e um álcool. Os átomos de carbono são numerados na alfa-galactose. (B) Globotriaosilceramida é clivada pela GLA, formando lactosilceramida. Na ausência da enzima funcional, a globotriaosilceramida acumula nos tecidos, causando a Doença de Fabry (Fonte: Garman and Garboczi, 2004).

Desde a determinação do substrato acumulado na DF (Sweeley and Klionsky, 1963) com consequente determinação da GLA como a enzima deficiente (Brady et al., 1967; Kint, 1970), foram realizados inúmeros estudos para determinar as características estruturais, bioquímicas e genéticas da enzima.

O diagnóstico da DF geralmente é realizado através de ensaios enzimáticos para determinar a atividade da GLA, utilizando substrato artificial fluorescente 4-Metilumbeliferil- α -D-galactosídeo (Desnick et al., 2013). Entretanto, foi observado que outra enzima lisossômica também é capaz de hidrolisar este mesmo substrato: alfa-N-acetilgalactosaminidase (Alfa-GalNAcase). Em humanos, inicialmente esta enzima foi considerada uma isoenzima da GLA e foi denominada alfa-galactosidase B (GLB) (Beutler and Kuhl, 1972). Em controles saudáveis, apenas 10-20% da medida da atividade total da alfa-galactosidase em diferentes tecidos corresponde à GLB (Beutler and Kuhl, 1972; Ho et al., 1972; Wood and Nadler, 1972; Desnick et al., 1973). Em pacientes com DF, cuja atividade da GLA é nula ou residual, a atividade da GLB é normal e pode chegar a 100% da atividade total em um ensaio enzimático com o substrato artificial sem o uso de inibidor apropriado (Rietra et al., 1975; Desnick et al., 2013).

As duas enzimas, GLA e GLB, em humanos, apresentam propriedades similares, compartilhando 50% da composição de aminoácidos. Os substratos naturais também são muito similares, diferindo apenas pela presença de uma porção hidroxil ou N-acetil ligada ao carbono 2 da galactose. Entretanto, foi demonstrado através de estudos subsequentes de cinética, inibição, imunologia e de mapeamento genético, que a GLA e GLB possuem diferentes especificidades de substratos e são geneticamente distintas, sendo a GLA codificada por um gene ligado ao cromossomo X, enquanto a GLB é codificada por um gene localizado no cromossomo 22. Dessa forma, estes estudos demonstraram que a GLB na verdade é uma Alfa-GalNAcase (Dean et al., 1977; Schram et al., 1977; Dean and Sweeley, 1979b).

Em 1978, Kusiak e colaboradores (Kusiak et al., 1978) testaram uma série de carboidratos para verificar se ocorria a inibição da GLA e da GLB. Dessa forma, verificou-se que a hidrólise do substrato artificial 4-Metilumbeliferil- α -D-galactosídeo pela GLB foi fortemente inibida por N-acetilgalactosamina (GalNac), enquanto a hidrólise pela GLA não foi afetada. A GalNac é produto da reação catalisada pela GLB, inibindo-a por aumento da concentração de produto desta reação. Com base nestes resultados, Mayes et al (1981) propuseram uma técnica para medida da atividade da GLA em fibroblastos humanos, utilizando GalNac como inibidor da GLB. Tal procedimento permitiu diferenciar as duas enzimas, aprimorando a metodologia utilizada no diagnóstico da DF. Assim, os métodos utilizados para diagnóstico bioquímico da DF são ainda aqueles descritos há mais de 30 anos.

Após publicação destes trabalhos, a GalNac passou a ser utilizada como inibidor da GLB, inclusive quando a atividade da GLA era medida utilizando outros tipos de amostra que não fibroblastos. Entretanto, a concentração utilizada variava entre os autores que adotaram o uso do inibidor, podendo ser um fator que gerava variabilidade nos resultados, influenciando no diagnóstico da DF (Chamoles et al., 2001; Desnick et al., 2003; Winchester and Young, 2006; Kalkan Ucar et al., 2012). Além disso, nem todos os pesquisadores passaram a utilizar este inibidor como rotina em suas análises para o diagnóstico e estudos de triagem da DF, nos diferentes tipos de amostra (Spada et al., 2006; Terryn et al., 2008).

Além de ser utilizada para fins de diagnóstico, Lukas et al (2013) demonstraram que a medida da atividade da GLA em pacientes com DF pode ser uma ferramenta para previsão do fenótipo da doença. Dessa forma, pacientes com atividade da GLA não detectável ou muito baixa, normalmente desenvolvem o fenótipo clássico, ou de início precoce, da DF. Ao contrário, os pacientes com atividade da GLA residual normalmente desenvolvem o fenótipo de início tardio, tipicamente com sintomas limitados a problemas cardíacos ou a problemas renais (Ishii et al.,

2007). Em um contexto de grande variabilidade de fenótipos, que variam desde casos clássicos até casos de início tardio, a previsão da evolução da DF tem sido bastante valorizada.

Quanto às características estruturais, a GLA de humanos é uma proteína com estrutura homodimérica, com cada monômero contendo um domínio (beta/alfa)₈ com o sítio ativo e um domínio beta antiparalelo (Figura 2). A enzima é uma glicoproteína que contém carboidratos N-ligados em 6 locais da estrutura homodimérica, revelando as bases do transporte lisossomal via M6P. Dois resíduos de ácido aspártico (D170 e D231) são responsáveis pelo mecanismo catalítico da enzima, os quais funcionam como um nucleófilo e um ácido/base, respectivamente (Garman and Garboczi, 2004).

Em relação às propriedades cinéticas, em ensaios utilizando o substrato artificial 4-Metilumbeliferil- α -D-galactosídeo, os valores de constante de Michaelis-Menten (K_m) para GLA do tipo selvagem (normal) foram estabelecidos em 2,8 mM por Ishii et al. (2007) e em 2,9 por Dean e Sweeley (1979) e por Lukas et al. (2013). Nos três trabalhos citados os parâmetros bioquímicos e cinéticos foram estabelecidos com uso de amostras da enzima purificada a partir de fígado humano (Dean and Sweeley, 1979a), células COS-7 (*“fibroblast-like cell line derived from monkey kidney tissue”*) transfectadas (Ishii et al., 2007) e células HEK293H (células embrionárias de rim modificadas) transfectadas (Lukas et al., 2013). A utilização de amostras da enzima purificada certamente gera resultados mais confiáveis para os parâmetros bioquímicos e cinéticos de qualquer enzima. Entretanto, a purificação da enzima a partir de pequenas alíquotas de sangue humano é inviável. Assim, para identificação de parâmetros cinéticos que poderiam auxiliar no diagnóstico rápido da DF, não é indicado o uso de metodologias que necessitem de amostras de enzima purificada a partir de amostras humanas.

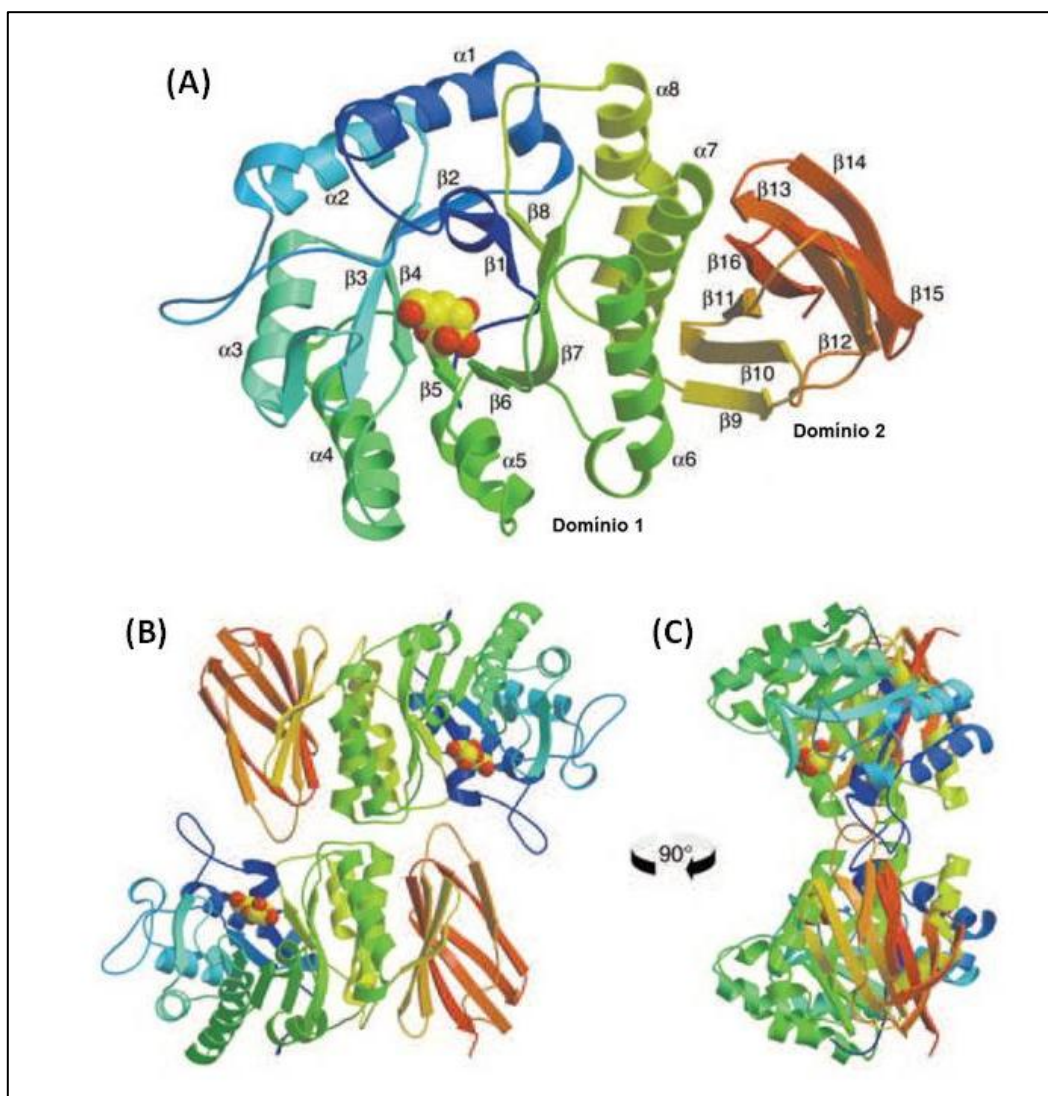


Figura 2: Estrutura Tridimensional da Alfa-galactosidase A humana. A proteína é colorida da extremidade N (azul) para C terminal (vermelho). O ligante de galactose é mostrado em amarelo e vermelho (átomos CPK). (A) Monômero da alfa-galactosidase A (GLA). O domínio 1 contém o sítio ativo no centro das folhas β em barril (β/α)₈, enquanto o domínio 2 contém as folhas β antiparalelas. (B) e (C) Dois panoramas do dímero da GLA. Os sítios ativos são separados por uma distância de 50 Å no dímero, na superfície côncava da molécula, como podemos ver no lado representado em (C) (Fonte: Garman and Garboczi, 2004).

Não há trabalhos publicados que comparem as propriedades bioquímicas e cinéticas da GLA em amostras de SPF, plasma e leucócitos de pacientes e controles saudáveis. Outros trabalhos demonstraram que propriedades bioquímicas e cinéticas das enzimas deficientes podem ser utilizadas para fins de triagem e diagnóstico de outras DL (Mandelli et al., 2001; Mandelli et

al., 2002; Michelin et al., 2004; Wajner et al., 2004; Michelin et al., 2005; Wajner et al., 2007; Campos et al., 2013). Da mesma forma, estes parâmetros poderiam ser utilizados como ferramenta auxiliar no diagnóstico da DF, melhorando a diferenciação entre pacientes (principalmente entre homens e mulheres) com DF e indivíduos normais.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar bioquimicamente a enzima GLA, estudando alguns parâmetros bioquímicos e cinéticos, visando melhorar a diferenciação entre pacientes com DF e indivíduos saudáveis; e avaliar o uso de GalNAc como inibidor da GLB em ensaios realizados para fins de diagnóstico da DF.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Caracterizar bioquimicamente a enzima GLA em indivíduos saudáveis e pacientes com DF através da determinação do pH ótimo, Km, velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) e termoestabilidade da enzima em amostra de SPF, plasma e leucócitos.
- b) Comparar as propriedades bioquímicas e cinéticas de indivíduos normais e pacientes com DF.
- c) Verificar se existe diferença entre as propriedades da GLA encontradas para homens e mulheres.
- d) Avaliar a influência da enzima GLB nos ensaios realizados com cada material utilizando-se o inibidor GalNAc.
- e) Obter parâmetros que auxiliem a diferenciar os grupos de indivíduos saudáveis e pacientes com DF de ambos os sexos para fins de diagnóstico.

3. CAPÍTULO 1

Artigo: *Comparing the alpha-galactosidase A biochemical properties from healthy individuals and Fabry disease patients.*

Status: *Submetido ao periódico Clinica Chimica Acta*

Comparing the alpha-galactosidase A biochemical properties from healthy individuals and Fabry disease patients

Vanessa Vitcoski Daitx², Jamila Mezzalira², Vitória da Costa Moraes¹, Ana Carolina Breier²,
Jaqueline Cé², Janice Carneiro Coelho^{1,2*}

¹ *Department of Biochemistry and* ² *Graduate Program in Biology – Biochemistry, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.*

* Corresponding Author

Address Correspondence to:

Prof^ª Dra. Janice Carneiro Coelho

Departamento de Bioquímica

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rua Ramiro Barcelos, 2600 anexo

90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil.

Telefone: +55 51 33085546

Fax: +55 51 33085535

E-mail: janice.coelho@ufrgs.br

Abstract

Objectives: Due to the importance and the difficulty still present in determining the biochemical diagnosis of Fabry disease (FD), the aim of this study was to establish and compare the biochemical and kinetic properties of alpha-galactosidase A (GLA) in dried blood spots (DBS), plasma and leukocytes samples of FD patients and healthy subjects to evaluate the possible use of these parameters as an auxiliary tool in the diagnosis of this disease.

Methods: GLA activity in DBS, plasma and leukocyte samples from Fabry disease patients and healthy subjects were compared and characterized in terms of optimal pH, K_m and V_{max} and heat stability.

Results: A difference was observed between the V_{max} of FD patients and healthy controls using DBS, plasma and leukocyte samples. In leukocytes, pre-incubation at 50 °C for 60 min was effective to differentiate FD patients from healthy controls.

Conclusion: The results obtained in this study can be used as an auxiliary method to the FD diagnosis, especially in cases of patients whose GLA activity is within normal range.

Keywords: Alpha-galactosidase A; Fabry disease; Kinetics; Lysosomal disorders

Abbreviations

FD – Fabry disease

LD – Lysosomal disorder

Gb3 – Globotriosylceramide

GLA – Alpha-Galactosidase A

DBS – Dried blood spot

1. Introduction

Fabry disease (FD) is an inborn error of metabolism linked to chromosome X and is caused by the deficiency in the enzyme alpha-galactosidase A (GLA, EC 3.2.1.22). GLA is a lysosomal hydrolase responsible for degrading neutral glycosphingolipids with terminal alpha-galactosyl moieties. Deficiency in this enzyme causes the progressive accumulation of these glycosphingolipids, especially globotriaosylceramide (Gb3). Gb3 accumulation takes place mainly in the endothelial, kidney, heart, and nervous cells, leading to a series of symptoms such as acroparesthesia, angiokeratomas, sight impairment, and irreversible tissue fibrosis in the kidneys and heart (Desnick et al., 2001).

Male neonatal screenings have found higher prevalence than the previously estimates of 1:40000 (Meikle et al., 1999), such as 1:3100 newborns in Italy (Meikle et al., 1999; Spada et al., 2006), 1:1500 newborns in Taiwan (Hwu et al., 2009), and 1:13341 newborns in Turkey (Wittmann et al., 2012). Thus, with an estimated prevalence between 1:1500 and 1:13341, FD can be considered the second most common lysosomal disorder (LD).

FD is usually diagnosed through enzyme assays to determine GLA activity and is definitive in men when performed in plasma and/or leukocytes. For women, mutations in the GLA gene must be analyzed because women can have regular enzyme activity despite carrying FD (Linthorst et al., 2005). Measuring GLA in dried blood spots (DBS) is often used to screen high-risk populations (Chamoles et al., 2001; Civallero et al., 2006; Nakamura et al., 2011). Although the results of GLA activity in this material are inconclusive for diagnosis, using DBS is advantageous compared to other biological materials used for screening (Civallero et al., 2006; de Castilhos et al., 2011).

FD diagnosis must be appropriate, easily available, and performed as early as possible in order to initiate treatment since the enzyme replacement therapy is already available (Wenger et al., 2003).

For the molecular diagnosis, the GLA gene must be fully sequenced since there are over 585 mutations described (Germain, 2010). Thus, the biochemical FD diagnosis is quicker and less costly than the molecular one.

Patients with non-detectable or very low GLA activity usually develop the classic, or early-onset, FD phenotype. On the other hand, patients with residual enzyme activity usually develop the late-onset phenotype typically with symptoms limited to heart or kidney issues (Ishii et al., 2007). Patients with residual GLA activity of both genders are a challenge for the biochemical diagnosis of FD.

Many of the current biochemical diagnosis techniques are based on methods described 30 to 40 years ago (Desnick et al., 1973). Besides the difficulty in diagnosing patients with residual activity, factors such as the different GLA activities in men and women with FD (Daitx et al., 2012) make it even harder to differentiate male and female FD patients and healthy individuals.

Since the 1970s, several studies were carried out on GLA due to its relation with FD. Biochemical and kinetic parameters of purified GLA, both in native form and in several conformations resulting from FD-related mutations, have been investigated by some research groups (Dean and Sweeley, 1979a; Ishii et al., 2007; Lukas et al., 2013). Other studies showed that the biochemical and kinetic properties of the deficient enzymes may be used for testing and diagnosis of other LDs (Mandelli et al., 2001; Mandelli et al., 2002; Michelin et al., 2004; Wajner et al., 2004; Michelin et al., 2005; Wajner et al., 2007; Campos et al., 2013).

Given how important and difficult the biochemical FD diagnosis still is, this study aimed to establish and compare the biochemical and kinetic properties of GLA in DBS, plasma, and

leukocytes samples from FD patients and healthy individuals to assess the possible use of such parameters as a tool to aid in diagnosing this disease.

2. Materials and Methods

2.1 Samples

The blood samples used as healthy controls were collected from blood donors at the blood bank of the Clinics Hospital of Porto Alegre by the team in charge of blood collection. 24 samples were collected from men and women at equal distribution since Fabry disease's genetic inheritance pattern is linked to chromosome X. These samples were properly identified with numbers so as to preserve the identity of the donors, who had no knowledge of the results and had their identities concealed throughout the research.

9 mL of blood were drawn from each volunteer donor. The blood was collected into Vacutainer sodium heparin tubes (Becton and Dickinson, São Paulo, SP, Brazil, www.bd.com/brasil). For the DBS samples, a drop of homogenized heparinized blood was placed in each circle of the Whatman 903® filter paper card. After the DBS cards dried at room temperature overnight, they were stored at 4 °C until processed and at -20 °C after that.

In order to separate the plasma, the heparinized blood was centrifuged at 2,000 rpm at room temperature for 10 min. The remaining blood was used to separate leukocytes following the technique described by Skoog and Beck (Skoog and Beck, 1956). The process yielded a leukocyte pellet, which was then diluted in distilled water, sonicated, and analyzed for total protein content through the miniaturized colorimetric technique by Lowry et al. (Lowry et al., 1951) using clear bottom 96-well plates (Techno PlasticProducts AG-TTP, Switzerland). Both

the plasma and the leukocyte samples were stored at -20 °C until processed and then stored at -80 °C. All samples were processed within 15 days.

The samples from FD patients came from previously diagnosed plasma and/or leukocytes and DBS cards and were stored the same way as those from healthy individuals. 17 samples from FD patients were used, being nine from men and eight from women. The blood was collected from patients by the medical team and was then sent to the laboratory by a shipping company specialized in biological samples.

2.2 Enzyme assays for alpha-galactosidase A

GLA enzyme activity was determined through fluorometric assays on the different sample types according to Civallero et al. (Civallero et al., 2006) and Chamoles (Chamoles et al., 2001) for DBS and according to Desnick et al. (Desnick et al., 1973) for plasma and leukocytes. The assays were carried out with a reduced volume in a 96-well plate according to Castilhos et al. (de Castilhos et al., 2011) for DBS and to Daitx et al. (Daitx et al., 2012) for plasma and leukocytes. All assays used the artificial substrate 4-methylumbelliferyl- α -D-galactoside, while the DBS and plasma assays also used the alpha-galactosidase B isoenzyme inhibitor, N-acetyl-D-galactosamine, both provided by Sigma (St. Louis, MO, USA, www.sigma.com). The samples were incubated at a stirring incubator at 37 °C and the fluorescence was read in a microplate reader fluorometer at 365 nm excitation and 450 nm emission. The samples were analyzed in duplicate in all assays.

In the DBS assays, three 1.2 mm DBS punches were taken (Harris Uni-Core 1.2 mm punch - St. Louis, MO, USA, www.sigma.com) from the blood-stained filter paper, being one of them used as the sample blank. To each punch, 10 μ L of 25 mM N-acetyl-D-galactosamine, 25 μ L of 5 mM substrate solution diluted with 0.15 M citrate-phosphate buffer, and 150 μ L of 0.1

ethylenediamine (pH 11.4) were added before the reagents to the blanks and at the end of incubation to the remaining samples. Incubation lasted for 30 h at 37 °C.

A solution with 10 mM substrate diluted in 0.5 M sodium acetate was prepared for the plasma assays. 200 mM N-acetyl-D-galactosamine was diluted in this solution. 25 µL of the solution containing substrate and inhibitor and the same volume of sample were added to each well. After incubation for 2 h at 30 °C, 200 µL of 1 M glycine buffer (pH 10.4) were added to all wells and 25 µL of plasma sample were added to the blanks.

For leukocytes, a blank in duplicate was used for each assay, to which the same volume of water instead of sample was added. 5 µL of sample and 30 µL of 5 mM substrate diluted in 0.5 mM citrate-phosphate buffer were added to each well. After incubation for 2 h at 37 °C, 200 µL of 0.5 M glycine-NaOH buffer (pH 10.3) were added to interrupt the reaction through protein denaturation.

The method's precision was verified by determining the intra-assay (intraday), inter-assay (interday), and interpersonal coefficients of variation (CV). Six DBS, plasma, and leukocyte samples from healthy controls were used to measure the GLA activity in order to fulfill these determinations. The samples were analyzed in triplicate and identical assays were simultaneously carried out on three consecutive days by two trained researchers. The results were expressed as relative standard deviation (RSD) of a series of measurements.

Buffers with pH ranging from 2 to 7 were used to dilute the substrate and determine the optimal pH. The optimal pH for each type of sample (DBS, plasma, and leukocyte) was used in all subsequent assays.

The Michaelis-Menten curve (substrate curve) was plotted using substrate concentrations ranging from 0.5 mM to 8 mM for assays in DBS and leukocytes and from 1 mM to 15 mM for plasma. After linearity was determined, the Lineweaver-Burk plot was built for DBS and

leukocytes using substrate concentrations from 0.1 mM to 0.6 mM. The Lineweaver-Burk plot for plasma samples used different substrate concentrations for GLA from controls and FD patients, at 0.5 mM to 2.5 mM for controls and 0.2 mM to 1 mM for patients. K_m and V_{max} values were calculated from these results.

In order to determine GLA thermostability in the different sample types, initially the ideal inactivation temperature was determined from a temperature curve. Next, the DBS and plasma samples were pre-incubated at 40 °C for different periods of time ranging from 1 to 60 min before the usual enzymatic assays at 37 °C and 30 °C, respectively. The leukocyte samples were pre-incubated for the same periods of time at 50 °C. After pre-incubation, substrate was added and the samples were incubated using the times and temperatures of the standard assays.

2.3. Statistical Analysis

Two groups were compared using Student's T-test and the means of more than two groups were compared using one- or two-way ANOVA followed by Tukey's or Bonferroni tests, respectively, when the differences were significant. The data were expressed as mean±standard deviation and the results were considered statistically significant when $p < 0.05$. All analyses were carried out using the software GraphPad Prism 5.

3. Results

3.1 GLA activity in the different groups

In order to verify the precision of the methods, intra-assay, inter-assay, and interpersonal coefficients of variation were obtained for each type of sample. In DBS, the intra-assay coefficient of variation was 13%, the inter-assay was 17%, and the interpersonal was 20%. In

assays using plasma, the intra-assay, inter-assay, and interpersonal CVs were 2%, 8%, and 4%, respectively. For leukocyte samples, the CVs were 4%, 7%, and 6%, respectively.

The results of GLA activity in controls were compared to the results from FD patients (Tables 1, 2, and 3).

In DBS, the average GLA activity in women was significantly lower than in healthy men ($p < 0.04$), just as in plasma ($p < 0.03$). In leukocytes, the difference between genders was not significant. As significant differences were found for GLA activity between DBS and plasma samples from men and women controls, all results for these types of samples were analyzed separately according to the gender.

3.2 Optimal pH determination

Figure 1 shows the GLA activity in DBS (Figure 1A), plasma (Figure 1B), and leukocytes (Figure 1C) for healthy controls at the pH values tested. There was no single optimal pH for GLA activity in the different types of samples since the difference in GLA activity for adjacent pHs was not significant. The pH values at which the mean GLA activity in healthy controls was the highest (5.0 for DBS, 5.9 for plasma, 4.8 for leukocytes) were chosen for the other enzymatic assays in the study.

In plasma, GLA activity in both men and women was the highest at pH 4.9. However, the activities at pH 4.7 and 4.8 were significantly different between men and women ($p < 0.01$) in this type of sample.

As with controls, no significant difference was found for GLA activity at adjacent pH values for FD patients for all types of samples. Therefore, no single optimal pH was found for FD patients. In DBS, the highest mean GLA activity was found at pH 3 for men and pH 5.1 for

women. In plasma, such pH values were 4 for men and 4.8, respectively, while for leukocytes the highest enzyme activity was found at pH 4.7.

3.3 Determining Km and Vmax

The GLA Km and Vmax values in DBS samples from controls and FD patients are shown in Table 4. The Km values did not differ significantly among the groups. GLA Vmax in DBS samples from patients was lower than that from healthy controls ($p < 0.05$).

Table 5 shows the GLA Km and Vmax values in plasma samples for all groups. As with the DBS samples, the Km values did not differ significantly among the groups. The FD patient groups had significantly lower Vmax than the healthy controls ($p < 0.001$ for FD patients, $p < 0.05$ for women with FD and $p < 0.01$ for men with FD). Except for the group of female FD patients, whose Vmax did not differ compared to the female controls, all patient groups had significantly lower Vmax than the male and female controls, as shown in Table 5.

Neither the control nor the FD patient group was subdivided by gender for leukocyte samples since no significant difference was found between male and female GLA activity for this type of material. Thus, the GLA Km and Vmax results in leukocyte samples were compared only between controls and patients (Table 6). Both groups had similar values for Km but not for Vmax, which was significantly higher in controls than in FD patients ($p < 0.01$), as shown in Table 6.

3.4 Thermostability assays

Initially, the ideal inactivation temperatures were determined from a temperature curve. For DBS and plasma, the ideal inactivation temperature was 40 °C, while for leukocytes it was 50 °C (Figure 2).

No curve could be obtained for residual GLA activity in DBS or plasma samples from male FD patients since they have very low or non-detectable activity in these types of samples. Only the results from female FD patients were compared with controls, as shown in Figures 2A and 2B.

No difference was found in the behavior of GLA activity in the groups studied (Figure 2A). In plasma, at 2 min of pre-incubation at 40 °C, residual GLA activity both in healthy women ($p<0.01$) and in female FD patients ($p<0.001$) was lower than in male controls. However, no significant difference was found between healthy women and male FD patients at this pre-incubation time (Figure 2B).

In leukocyte samples, residual GLA activity in patients remained virtually unchanged even after 60 min of pre-incubation at 50 °C. The difference between the residual GLA activity in leukocytes from controls and patients was significant after 4 min of pre-incubation (Figure 2C). The mean activity in the samples that were not pre-incubated (100% activity) was 1.699 ± 1.298 nmol/h/mg prot. This value dropped to 1.003 ± 0.427 nmol/h/mg prot after 60 min of incubation, i.e., 79% activity. This result shows that GLA activity in leukocytes from FD patients, despite being residual and very low, is more stable than in healthy controls.

4. Discussion

Measuring GLA activity in plasma and leukocyte samples is the main method for biochemical diagnosis of FD. Even though this type of diagnostic is definitive for males, some patients may have residual GLA activity, which is above the values established for FD patients. Female FD patients (heterozygote) have a greater variation in GLA activity and often have results at the same range as healthy controls (Linthorst et al., 2005). In these cases, molecular analysis of

the GLA gene is indicated for a definitive diagnostic. However, the molecular diagnosis is very time consuming and costly due to the large number of mutations described and to the lack of common mutations for FD.

Measuring GLA activity in FD patients, besides serving for diagnosis, also seems to be a great tool to predict the disease phenotype, as shown by Lukas et al. (Lukas et al., 2013). Given the large variability of phenotypes, which go from classic cases to late-onset ones, predicting FD evolution has been considered valuable.

Since the biochemical diagnosis is quicker and cheaper when compared to the molecular diagnosis, studying GLA's biochemical properties may help to enhance this type of diagnosis by making it more precise. Hence, aiming to find parameters that help in differentiating healthy individuals and FD patients, the optimal pH, K_m , V_{max} , and thermostability of GLA were studied in the present study.

As for the precision of the results obtained, the intra-assay, inter-assay, and interpersonal CVs showed the precision and reliability of all techniques used. According to several authors, an acceptable coefficient of variation is up to 20% (Olivova et al., 2009; Muller et al., 2010; Lukacs et al., 2011), which is the case for all CVs in this study.

GLA activity was significantly higher in controls than in patients for all types of samples. When the results from DBS and plasma samples were divided by gender, it was also possible to distinguish the controls from FD patients. The results from DBS and plasma samples were divided by gender due to the significant difference found in GLA activity between male and female controls, as previously observed by Daitx et al. (Daitx et al., 2012).

Virtually no overlapping was found in GLA activity values. Only in DBS samples from female FD patients was the GLA activity in the range of the female controls. Except for the mean GLA activity in DBS samples from healthy men, all average activity from controls were within

the reference value range for healthy controls established by these same authors in a previous study (Daitx et al., 2012). The mean GLA activity in DBS samples from healthy men was 8.784 ± 2.852 , above the previously established reference values. Such difference can be explained by the different pH used in the assays, since pH 5 (in which the mean GLA activity was the highest in DBS) was used instead of pH 4.4 (used in the previous study and in the usual assays for FD diagnosis). The GLA activity values for the types of samples employed were similar to those in the literature (Chamoles et al., 2001; Desnick et al., 2001; Hoffmann et al., 2005; Civallero et al., 2006; Andrade et al., 2008; Castilhos et al., 2014).

No statistically significant difference was found between GLA activity at adjacent pH values for any type of sample. This is why the pH at which the mean GLA activity in healthy controls was the highest was chosen for the other enzymatic assays in the study. A significant difference between GLA activity in healthy men and women was observed in the assays using plasma at pH 4.7 and 4.8. This may have contributed to the difference found between the plasma GLA activities from healthy men and women, since in Daitx et al. (Daitx et al., 2012) the plasma assays were carried out at pH 4.8. Therefore, specific reference values for each gender must be used for GLA assays at these pH values.

No type of sample yielded a significant difference between K_m values for GLA from healthy controls and FD patients. The K_m values for wild-type GLA were established at 2.8 mM by Ishii et al. (Ishii et al., 2007) and at 2.9 by Dean et al. (Dean and Sweeley, 1979a) and Lukas et al. (Lukas et al., 2013). In these three studies, the biochemical and kinetic parameters were established using purified enzyme samples from human liver (Dean and Sweeley, 1979a), transfected COS-7 cells (fibroblast-like cell line derived from monkey kidney tissue), and transfected HEK293H cells (modified kidney embryonary cells) (Lukas et al., 2013). Between the control groups in this study, the K_m and GLA values in plasma samples were the closest to the

Km values established by Dean et al. (Dean and Sweeley, 1979a), Ishii et al. (Ishii et al., 2007), and Lukas et al. (Lukas et al., 2013). Using purified enzyme samples certainly produces more reliable results for the biochemical and kinetic parameters of any enzyme. However, purifying the enzyme from small human blood aliquots is impractical. Since the goal of this study is related to identifying the parameters that may aid in the quick diagnosis of FD, the difference between the present results and those from the aforementioned authors should not compromise the present results.

A significant difference between Vmax values from healthy controls and FD patients was found. In DBS, the groups could not be differentiated according to gender, only as a whole. Virtually all patient groups had significantly lower average Vmax than the male and female controls, as shown in Table 5. The only exception was the female patient group, whose Vmax did not differ from that of healthy women. Thus, it is seen that the healthy individuals and FD patients can be distinguished based on this parameter using any type of sample.

Regarding the thermostability assays, GLA behavior was similar among DBS and plasma samples from controls and patients. In plasma, at 2 min of pre-incubation at 40 °C, residual GLA activity both in healthy women and in female FD patients was lower than in male controls. However, at the other pre-incubation times, no difference was found among these groups.

In leukocytes, the enzyme from controls and FD patients had significantly different behavior after 4 min of pre-incubation. Although the mean GLA activity among FD patients was low, the enzyme in this group seemed more thermostable than in the control group. After 60 min of pre-incubation at 50 °C, the enzyme maintained 79% of the GLA activity compared to samples that were not pre-incubated. Therefore, the GLA thermostability assays in leukocyte samples could differentiate the controls from the FD patients.

5. Conclusions

The results of the present study show that FD patient GLA differs from that of healthy individuals not only regarding the activity in DBS, plasma, and leukocyte samples, but also regarding Vmax and thermostability. The difference between GLA Vmax can be used to differentiate patients and controls in assays performed with DBS, plasma, or leukocytes. Only the leukocyte samples can be used to distinguish controls from FD patients through thermostability assays. Pre-incubation at 50 °C for 60 min is a quite practical way of differentiating FD patients given how simple the method is. The data obtained in this study can be used as a tool to aid in FD diagnosis, especially in cases of patients whose GLA activity is within the normal ranges.

Acknowledgements

The authors thank CNPq and FAPERGS for the financial support, the Rio Grande do Sul Association of Fabry Disease Patients and Relatives (AGPPDFF) and the donors and staff of the blood bank of the Clinics Hospital of Porto Alegre for the blood samples used in this study.

Table 1

Alpha-galactosidase A enzyme activity in dried blood spots on filter paper samples from healthy controls and Fabry disease patients.

	GLA activity (nmol/h/mL)	Variation
Controls (n=17)	7.513 ± 2.721	3.170-12.46
Women (n=8)	6.083 ± 1.793	3.170-8.205
Men (n=9)	8.784 ± 2.852 ^a	4.596-12.46
FD patients (n=11)	1.161 ± 1.297 ^{b,c,d}	0.093-4.214
Women (n=5)	2.00 ± 1.496 ^{b,c,d}	0.663-4.214
Men (n=6)	0.463 ± 0.536 ^{b,c,d}	0.093-1.392

Results expressed as mean±SD

^a Significantly different from women controls according to Student's T-test, p<0.04.

^b Significantly different from the control group according to one-way ANOVA, p<0.001.

^c Significantly different from the women controls according to one-way ANOVA, p<0.05 from female FD patients and p<0.001 for FD patients and male FD patients.

^d Significantly different from the male control group according to one-way ANOVA, p<0.001.

Table 2

Alpha-galactosidase A enzyme activity in plasma samples from healthy controls and Fabry disease patients.

	GLA activity (nmol/h/mL)	Variation
Controls (n=17)	8.514 ± 2.565	5.292- 14.83
Women (n=6)	6.704 ± 1.276	5.292- 8.841 ^b
Men (n=11)	9.502 ± 2.583 ^a	6.129- 14.83 ^c
FD patients (n=17)	0.9248 ± 1.186 ^{b,c,d}	0.0115-3.782
Women (n=8)	1.841 ± 1.18 ^{b,c,d}	0.3191- 3.782
Men (n=9)	0.110 ± 0.086 ^{b,c,d}	0.011- 0.315

Results expressed as mean±SD.

^a Significantly different from women controls according to Student's T-test, p<0.03.

^b Significantly different from the control group according to one-way ANOVA, p<0.001.

^c Significantly different from the women controls according to one-way ANOVA, p<0.05 for male FD patients and p<0.001 for the other groups.

^d Significantly different from the male controls according to one-way ANOVA, p<0.05 for female controls and p<0.001 for the other groups.

Table 3

Alpha-galactosidase A enzyme activity in leukocyte samples from healthy controls and Fabry disease patients.

	GLA activity (nmol/h/mg prot)	Variation
Controls (n=7)	44.27 ± 12.24	24.75-77.09
FD patients (n=3)	2.375 ± 1.959	0.634- 6.731 ^a

Results expressed as mean±SD.

^a Significantly different from the control group according to Student's T-test, p<0.0001.

Table 4
 GLA Km and Vmax using dried blood spots on filter paper samples from healthy controls and Fabry disease patients.

	Km (mM)	Vmax (nmol/h/mL)
Controls (n=11)	0.569 ± 0.441	2.478 ± 1.416
Women (n=5)	0.618 ± 0.414	2.402 ± 1.198
Men (n=6)	0.528 ± 0.497	2.540 ± 1.689
FD patients (n=6)	1.615 ± 2.520	0.549 ± 0.319 ^a
Women (n=2)	0.579 ± 0.585	0.537 ± 0.387
Men (n=4)	2.133 ± 3.065	0.555 ± 0.346

Results expressed as mean±SD.

^a Significantly different from the control group according to one-way ANOVA, p<0.05.

Table 5
GLA Km and Vmax using plasma samples from healthy controls and Fabry disease patients.

	Km (mM)	Vmax (nmol/h/mL)
Controls (n=12)	3.100 ± 1.247	7.298 ± 2.597
Women (n=5)	3.094 ± 0.487	6.339 ± 2.103
Men (n=7)	3.103 ± 1.641	7.983 ± 2.846
FD patients (n=4)	2.200 ± 1.206	0.519 ± 0.414 ^{a,b,c}
Women (n=2)	2.711 ± 0.093	0.802 ± 0.402 ^{a,c}
Men (n=2)	1.688 ± 1.818	0.235 ± 0.178 ^{a,b,c}

Results expressed as mean±SD.

^a Significantly different from the control group according to one-way ANOVA, p<0.001 for FD patients, p<0.05 for female FD patients and p<0.01 male FD patients.

^b Significantly different from the female control group according to one-way ANOVA, p<0.05.

^c Significantly different from the male control group according to one-way ANOVA, p<0.001 for FD patients, p<0.01 for female and male FD patients.

Table 6

GLA Km and Vmax using leukocyte samples from healthy controls and Fabry disease patients.

	Km (mM)	Vmax (nmol/h/mg prot)
Controls (n=7)	1.383 ± 1.165	42.67 ± 25.46
FD patients (n=3)	2.552 ± 1.043 ^a	1.344 ± 0.394

Results expressed as mean±SD.

^a Significantly different from the control group according to Student's T-test, p<0.01.

References

- [1] Desnick RJ, Ioannou YA, Eng CM, Alpha-galactosidase A deficiency: Fabry disease. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al., editors. *The metabolic & molecular bases of inherited disease*. New York ; London: McGraw-Hill, 2001: 3733-3774.
- [2] Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA* 1999; 281:249-254.
- [3] Spada M, Pagliardini S, Yasuda M, et al. High incidence of later-onset fabry disease revealed by newborn screening. *Am J Hum Genet* 2006; 79:31-40.
- [4] Hwu WL, Chien YH, Lee NC, et al. Newborn screening for Fabry disease in Taiwan reveals a high incidence of the later-onset GLA mutation c.936+919G>A (IVS4+919G>A). *Hum Mutat* 2009; 30:1397-1405.
- [5] Wittmann J, Karg E, Turi S, et al. Newborn screening for lysosomal storage disorders in hungary. *JIMD Rep* 2012; 6:117-125.
- [6] Linthorst GE, Vedder AC, Aerts JM, Hollak CE. Screening for Fabry disease using whole blood spots fails to identify one-third of female carriers. *Clin Chim Acta* 2005; 353:201-203.
- [7] Nakamura K, Hattori K, Endo F. Newborn screening for lysosomal storage disorders. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2011; 157:63-71.
- [8] Civallero G, Michelin K, de Mari J, 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.
- [9] Chamoles NA, Blanco M, Gaggioli D. Fabry disease: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. *Clin Chim Acta* 2001; 308:195-196.
- [10] de Castilhos CD, Mezzalira J, Goldim MP, Coelho JC. Influence of pre-analytical factors on alpha-galactosidase A, arylsulfatase B and alpha-glucosidase activities measured on dried blood spots on filter paper. *Clin Biochem* 2011; 44:922-926.
- [11] Wenger DA, Coppola S, Liu SL. Insights into the diagnosis and treatment of lysosomal storage diseases. *Arch Neurol* 2003; 60:322-328.
- [12] Germain DP. Fabry disease. *Orphanet J Rare Dis* 2010; 5:30.
- [13] Ishii S, Chang HH, Kawasaki K, et al. Mutant alpha-galactosidase A enzymes identified in Fabry disease patients with residual enzyme activity: biochemical characterization and restoration of normal intracellular processing by 1-deoxygalactonojirimycin. *Biochem J* 2007; 406:285-295.
- [14] Desnick RJ, Allen KY, Desnick SJ, Raman MK, Bernlohr RW, Krivit W. Fabry's disease: enzymatic diagnosis of hemizygotes and heterozygotes. Alpha-galactosidase activities in plasma, serum, urine, and leukocytes. *J Lab Clin Med* 1973; 81:157-171.
- [15] Daitx VV, Mezzalira J, Goldim MP, Coelho JC. Comparison between alpha-galactosidase A activity in blood samples collected on filter paper, leukocytes and plasma. *Clin Biochem* 2012; 45:1233-1238.
- [16] Dean KJ, Sweeley CC. Studies on human liver alpha-galactosidases. I. Purification of alpha-galactosidase A and its enzymatic properties with glycolipid and oligosaccharide substrates. *J Biol Chem* 1979; 254:9994-10000.
- [17] Lukas J, Giese AK, Markoff A, et al. Functional characterisation of alpha-galactosidase a mutations as a basis for a new classification system in fabry disease. *PLoS Genet* 2013; 9:e1003632.

- [18] Mandelli J, Wajner A, Pires R, Giugliani R, Coelho JC. Detection of mucopolysaccharidosis type I heterozygotes on the basis of the biochemical properties of plasma alpha-L-iduronidase. *Clin Chim Acta* 2001; 312:81-86.
- [19] Mandelli J, Wajner A, Pires RF, Giugliani R, Coelho JC. Detection of mucopolysaccharidosis type I heterozygotes based on the biochemical characteristics of leukocyte alpha-L-iduronidase. *Arch Med Res* 2002; 33:20-24.
- [20] Michelin K, Wajner A, Bock H, et al. Biochemical properties of beta-glucosidase in leukocytes from patients and obligated heterozygotes for Gaucher disease carriers. *Clin Chim Acta* 2005; 362:101-109.
- [21] Michelin K, Wajner A, Goulart Lda S, et al. Biochemical study on beta-glucosidase in individuals with Gaucher's disease and normal subjects. *Clin Chim Acta* 2004; 343:145-153.
- [22] Wajner A, Michelin K, Burin MG, et al. Comparison between the biochemical properties of plasma chitotriosidase from normal individuals and from patients with Gaucher disease, GM1-gangliosidosis, Krabbe disease and heterozygotes for Gaucher disease. *Clin Biochem* 2007; 40:365-369.
- [23] Wajner A, Michelin K, Burin MG, et al. Biochemical characterization of chitotriosidase enzyme: comparison between normal individuals and patients with Gaucher and with Niemann-Pick diseases. *Clin Biochem* 2004; 37:893-897.
- [24] Campos D, Monaga M, Gonzalez EC, Herrera D. Identification of mucopolysaccharidosis I heterozygotes based on biochemical characteristics of L-iduronidase from dried blood spots. *Clin Chim Acta* 2013; 430C:24-27.
- [25] Skoog WA, Beck WS. Studies on the fibrinogen, dextran and phytohemagglutinin methods of isolating leukocytes. *Blood* 1956; 11:436-454.
- [26] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-275.
- [27] Muller KB, Rodrigues MD, Pereira VG, Martins AM, D'Almeida V. Reference values for lysosomal enzymes activities using dried blood spots samples - a Brazilian experience. *Diagn Pathol* 2010; 5:65.
- [28] Olivova P, van der Veen K, Cullen E, et al. Effect of sample collection on alpha-galactosidase A enzyme activity measurements in dried blood spots on filter paper. *Clin Chim Acta* 2009; 403:159-162.
- [29] Lukacs Z, Nieves Cobos P, Keil A, 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.
- [30] Castilhos CD, Mezzalira J, Goldim MP, et al. Determination of the lysosomal hydrolase activity in blood collected on filter paper, an alternative to screen high risk populations. *Gene* 2014; 536:344-347.
- [31] Hoffmann B, Georg Koch H, Schweitzer-Krantz S, Wendel U, Mayatepek E. Deficient alpha-galactosidase A activity in plasma but no Fabry disease--a pitfall in diagnosis. *Clin Chem Lab Med* 2005; 43:1276-1277.
- [32] Andrade J, Waters PJ, Singh RS, et al. Screening for Fabry disease in patients with chronic kidney disease: limitations of plasma alpha-galactosidase assay as a screening test. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; 3:139-145.

Figure captions:

Figure 1

(A) Optimal pH determination for GLA activity in DBS from healthy men (n=4) and women (n=4) and male (n=3) and female (n=3) Fabry disease patients. Results expressed as mean (nmol/h/mL)±standard deviation.

(B) Optimal pH determination for GLA activity in plasma from healthy men (n=4) and women (n=4) and male (n=3) and female (n=3) Fabry disease patients. The difference between healthy men and women was significant at pHs 4.7 and 4.8 (two-way ANOVA followed by Bonferroni test, $p<0.01$). Results expressed as mean (nmol/h/mL)±standard deviation.

(C) Optimal pH determination for GLA activity in leukocytes from healthy controls (n=14) and Fabry disease patients (n=5). Results expressed as mean (nmol/h/mg prot)±standard deviation.

Figure 2

(A) Heat activation profile of alpha-galactosidase A enzyme in DBS from healthy men (n=3) and women (n=3) and female FD patients (n=3) after pre-incubation at 40 °C up to 60 min. No difference was observed in the GLA activity profile in the groups studied (two-way ANOVA, $p>0.05$). Results expressed as percentage of residual activity compared to samples that were not pre-incubated (100% activity).

(B) Heat activation profile of alpha-galactosidase A enzyme in plasma from healthy men (n=3) and women (n=3) and female FD patients (n=3) after pre-incubation at 40 °C up to 60 min. Residual GLA activity after 2 min of pre-incubation at 40 °C in healthy women and in female FD patients was significantly lower than in male controls. Results expressed as percentage of residual activity compared to samples that were not pre-incubated (100% activity). ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, two-way ANOVA followed by Bonferroni test.

(C) Heat activation profile of alpha-galactosidase A enzyme in leukocytes from healthy men (n=3) and FD patients (n=3) after pre-incubation at 50 °C up to 60 min. Significant difference among the groups. Results expressed as percentage of residual activity compared to samples that were not pre-incubated (100% activity). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, two-way ANOVA followed by Bonferroni test.

Figure 1

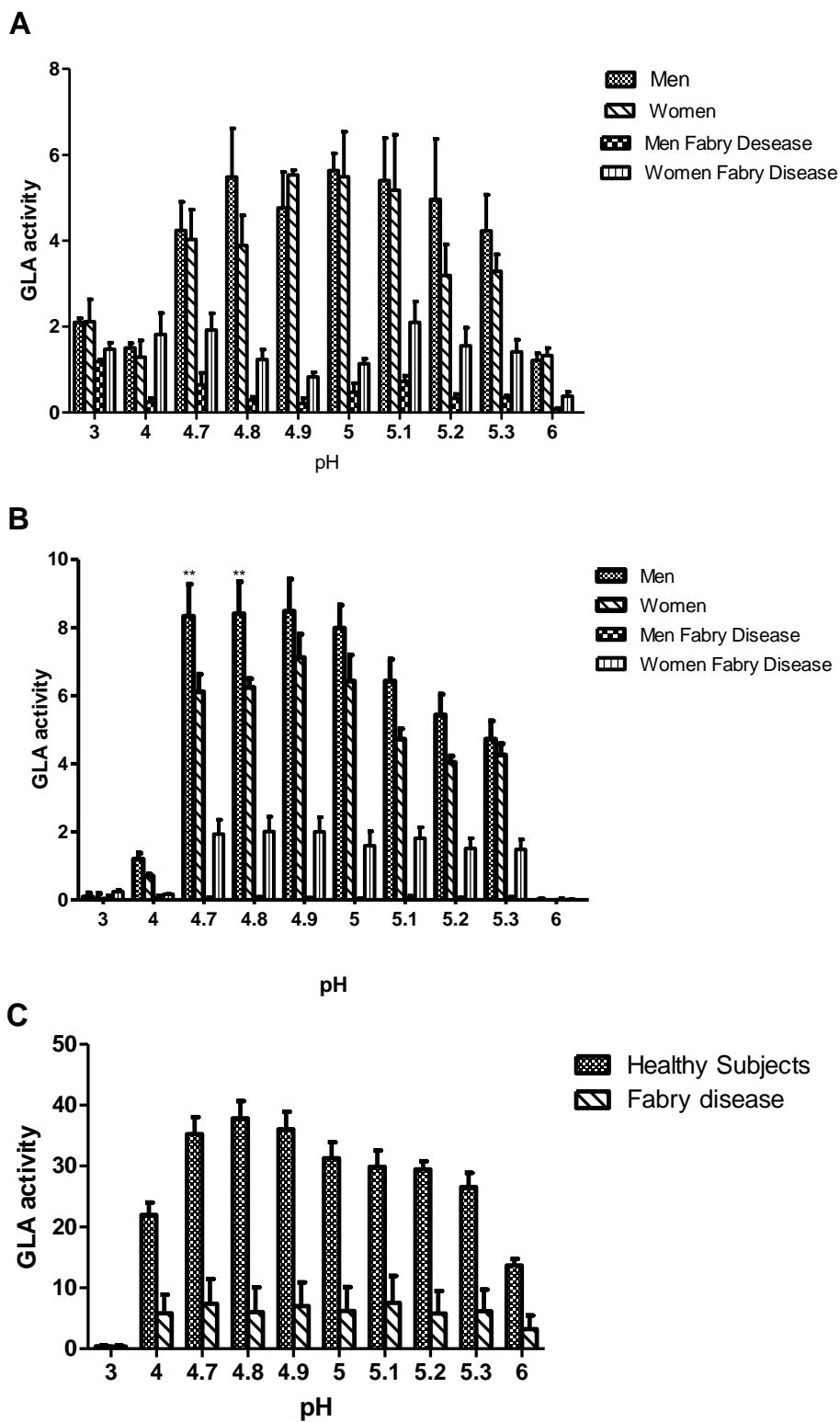
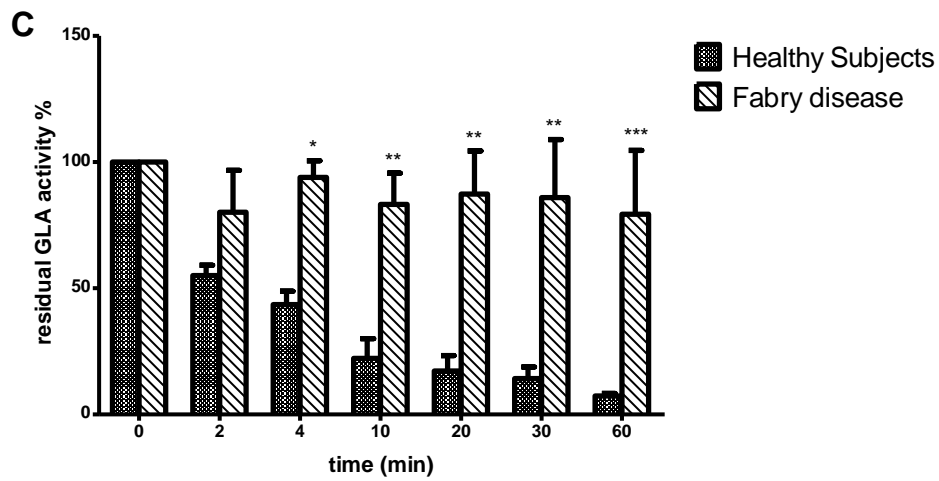
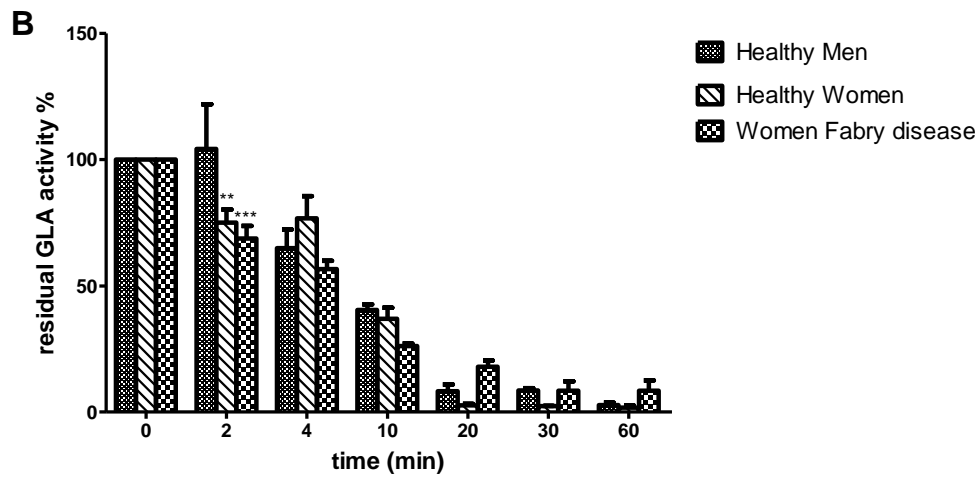
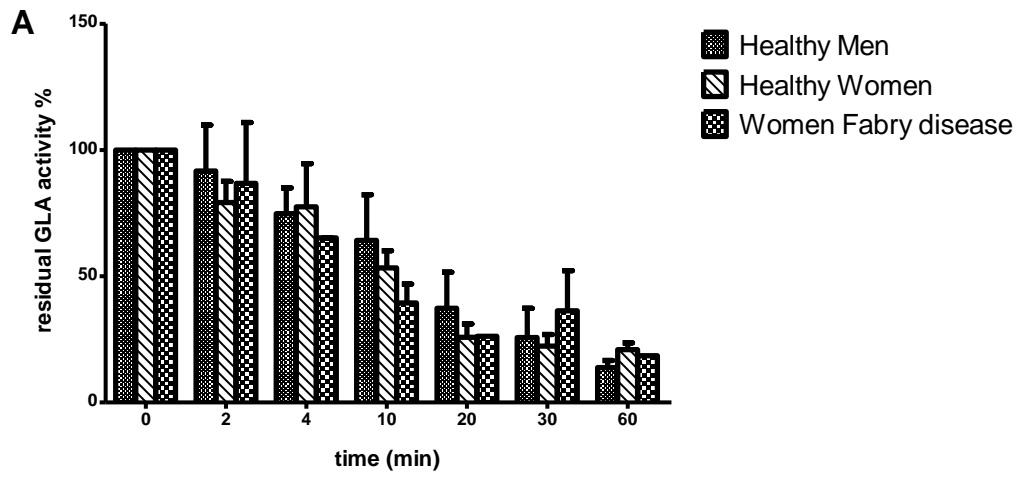


Figure 2



4. CAPÍTULO 2

Artigo: *Effect of N-acetylgalactosamine on alpha-galactosidase A activity in dried blood spot, plasma, and leukocytes from Fabry disease patients and healthy individuals.*

Status: *Submetido ao periódico Clinical Biochemistry*

Effect of N-acetylgalactosamine on alpha-galactosidase A activity in dried blood spot, plasma,
and leukocytes from Fabry disease patients and healthy individuals.

Vanessa Vitcoski Daitx¹, Jamila Mezzalira¹, Vitória da Costa Moraes¹, Ana Carolina Breier¹,
Jaqueline Cé¹, Janice Carneiro Coelho^{1,2*}

¹ *Department of Biochemistry and* ²*Graduate Program in Biology – Biochemistry, Instituto de*
Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS,
Brazil.

* Corresponding Author

Address Correspondence to:

Prof^ª Dra. Janice Carneiro Coelho

Departamento de Bioquímica

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rua Ramiro Barcelos, 2600 anexo

90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil.

Telefone: +55 51 33085546

Fax: +55 51 33085535

E-mail: janice.coelho@ufrgs.br

ABSTRACT

Objectives: Assess the use of N-acetylgalactosamine (GalNAc) in assays to measure alpha-galactosidase A (GLA) activity in dried blood spot (DBS), plasma, and leukocyte samples from Fabry disease (FD) patients and healthy individuals.

Design and Methods: Fluorometric assays were carried out to measure GLA activity using different GalNAc concentrations in DBS, plasma, and leukocyte samples from FD patients and healthy controls.

Results: A significant difference was found between the alpha-galactosidase activity when GalNAc was absent or present, at all inhibitor concentrations tested, for DBS samples from female FD patients and for plasma samples from male FD patients. In plasma, the residual activity in healthy controls, both male and female, differed in assays using 50 mM of GalNAc, while the residual activity in male FD patients was significantly lower compared to healthy males for all inhibitor concentrations tested. In leukocytes, no difference was found in the activity at different GalNAc concentrations or among the groups studied.

Conclusion: Using GalNAc may contribute to FD diagnosis by reducing the number of false negatives, mainly when DBS or plasma samples are used. In leukocytes, using the inhibitor does not seem necessary.

Keywords: Alpha-galactosidase A; Alpha-galactosidase B; N-acetylgalactosamine; Fabry disease

Abbreviations

FD – Fabry disease

LSD – Lysosomal storage disorders

GalNAc – N-acetylgalactosamine

GLA – Alpha-galactosidase A

GLB – Alpha-galactosidase B

DBS – Dried blood spot

1. Introduction

Macromolecules, such as glycoproteins and glycolipids, are degraded by hydrolases present in lysosomes. In humans, deficiencies in these enzymes cause the accumulation of the excess non-degraded substrate, which leads to the development of lysosomal storage disorders (LSDs). Fabry disease (FD) is an LSD linked to chromosome X and is caused by the deficiency in the enzyme alpha-galactosidase A (GLA), which is responsible for degrading neutral glycosphingolipids with terminal alpha-galactosyl moieties. FD causes the progressive accumulation of these glycosphingolipids, especially globotriaosylceramide. Such accumulation takes place mainly in the endothelial, kidney, heart, and nervous cells, leading to a series of symptoms such as acroparesthesia, angiokeratomas, sight impairment, and irreversible tissue fibrosis in the kidneys and heart (Desnick et al., 2001).

FD is usually diagnosed through enzymatic assays to determine GLA activity by using the artificial fluorescent substrate 4-Methylumbelliferyl- α -D-galactoside (Desnick et al., 2001). However, it has been observed that another lysosomal enzyme, alpha-N-acetylgalactosaminidase, is also able to hydrolyze this same substrate. In humans, this enzyme was initially considered a GLA isoenzyme and was called alpha-galactosidase B (GLB) (Beutler and Kuhl, 1972). In healthy controls, only 10-20% of the total alpha-galactosidase activity in different tissues correspond to GLB (Beutler and Kuhl, 1972; Ho et al., 1972; Wood and Nadler, 1972; Desnick et al., 1973). In FD patients, who have residual or no GLA activity, GLB activity is normal and may be increased in some individuals (Rietra et al., 1975; Desnick et al., 2001).

Both human enzymes have similar properties and share 50% of their amino acid composition. The natural substrates are also very similar, differing only for the presence of a hydroxyl or N-acetyl portion bound to the carbon 2 of galactose. However, later kinetic,

inhibition, immunology, and genetic mapping studies have shown that GLA and GLB have different substrate specificities and are genetically different. GLA is coded by a gene linked to chromosome X, while GLB is coded by a gene located in chromosome 22. Thus, these studies showed that GLB is actually an alpha-N-acetylgalactosaminidase (Dean et al., 1977; Schram et al., 1977; Dean and Sweeley, 1979b).

In 1978, Kusiak et al. (Kusiak et al., 1978) tested a series of carbohydrate to verify whether they inhibited GLA and GLB. It was then found that the hydrolysis of the artificial substrate 4-Methylumbelliferyl- α -D-galactoside by GLB was highly inhibited by N-acetylgalactosamine (GalNAc), while the hydrolysis by GLA was not affected. Based on these results, Mayes et al. (Mayes et al., 1981) proposed a technique to measure GLA activity in human fibroblasts by using GalNAc as a GLB inhibitor. Such procedure allowed the two enzymes to be differentiated, which enhanced the methodology used in FD diagnosis.

After these studies were published, GalNAc started being used as a GLB inhibitor even when GLA activity was measured using other types of samples instead of fibroblasts. Nevertheless, the concentration used varied among the authors using the inhibitor, which could potentially affect the results and influence FD diagnosis (Chamoles et al., 2001; Desnick et al., 2003; Winchester and Young, 2006; Kalkan Ucar et al., 2012). Moreover, not all researchers started using this inhibitor routinely in their analysis for FD diagnosis and screening studies using the different types of sample (Spada et al., 2006; Terryn et al., 2008).

Although FD diagnosis through enzymatic assays to determine GLA activity is definitive in men when plasma and/or leukocyte samples are used, some FD patients have residual GLA activity, which makes diagnosis more difficult. Since FD's genetic inheritance is linked to chromosome X, female FD patients (heterozygote) may have GLA activity at the same range as healthy controls. In these cases, molecular analysis of the GLA gene is indicated for a definitive

diagnostic (Linthorst et al., 2005). However, molecular diagnosis is very time consuming and costly, given the large number of mutations described and the lack of common mutations for FD (Germain, 2010). Other factors, such as the difference in GLA activity between male and female FD patients (Germain, 2010), may also contribute to a more difficult differentiation between male and female FD patients and healthy individuals.

In view of how important and difficult the biochemical FD diagnosis still is and the different techniques proposed in the literature with or without GLB inhibitor use, this study aimed to assess the use of GalNAc in assays to measure GLA activity in DBS, plasma, and leukocyte samples from healthy controls and FD patients.

2. Materials and Methods

2.1 Samples

The blood samples used as healthy controls were collected from blood donors at the blood bank of the Clinics Hospital of Porto Alegre by the team in charge of blood collection. A total of 10 samples were collected from men and women at equal gender distribution since Fabry disease's genetic inheritance pattern is linked to chromosome X. These samples were properly identified with numbers so as to preserve the identity of the donors, who had no knowledge of the results and had their identities concealed throughout the research.

9 mL of blood were drawn from each volunteer donor. The blood was collected into Vacutainer sodium heparin tubes (Becton and Dickinson, São Paulo, SP, Brazil, www.bd.com/brasil). For the DBS samples, a drop of homogenized heparinized blood was placed in each circle of the Whatman 903® filter paper card. After the DBS cards dried at room temperature overnight, they were stored at 4 °C until processed and at -20 °C after that.

In order to separate the plasma, the heparinized blood was centrifuged at 2000 rpm at room temperature for 10 min. The remaining blood was used to separate leukocytes following the technique described by Skoog and Beck (Skoog and Beck, 1956). The process yielded a leukocyte pellet, which was then diluted in distilled water, sonicated, and analyzed for total protein content through the miniaturized colorimetric technique by Lowry et al. (Lowry et al., 1951) using clear bottom 96-well plates (Techno Plastic Products AG-TTP, Switzerland). Both the plasma and the leukocyte samples were stored at -20 °C until processed and then stored at -80 °C. All samples were processed within 15 days.

The samples from FD patients came from previously diagnosed plasma and/or leukocyte samples and DBS cards and were stored the same way as those from healthy individuals. Seven samples from FD patients were used, being four from men and three from women. The blood was collected from patients by the medical team and was then sent to the laboratory by a shipping company specialized in biological samples.

2.2 Enzyme assays for alpha-galactosidase A

GLA enzyme activity was determined through fluorometric assays on the different sample types according to Civallero et al. (Civallero et al., 2006) and Chamoles (Chamoles et al., 2001) for DBS and according to Desnick et al. (Desnick et al., 1973) for plasma and leukocytes. The assays were carried out with a reduced volume in a 96-well plate according to Castilhos et al. (de Castilhos et al., 2011) for DBS and to Daitx et al. (Daitx et al., 2012) for plasma and leukocytes. All assays used the artificial substrate 4-Methylumbelliferyl- α -D-galactoside and N-acetyl-D-galactosamine, both provided by Sigma (St. Louis, MO, USA, www.sigma.com). The samples were incubated in a stirring incubator at 37 °C and the fluorescence was read in a microplate

reader fluorometer at 365 nm excitation and 450 nm emission. The samples were analyzed in duplicate in all assays.

In the DBS assays, three 1.2 mm DBS punches were taken (Harris Uni-Core 1.2 mm punch - St. Louis, MO, USA, www.sigma.com) from the blood-stained filter paper, being one of them used as the sample blank. To each punch, 10 μL of 0 to 100 nM N-acetyl-D-galactosamine, 25 μL of 5 mM substrate solution diluted with 0.15 M citrate-phosphate buffer (pH 5), and 150 μL of 0.1 ethylenediamine (pH 11.4) were added before the reagents to the blanks and at the end of incubation to the remaining samples. Incubation lasted for 20 h at 37 °C.

A solution with 10 mM substrate diluted in 0.5 M sodium acetate buffer (pH 4.9) was prepared for the plasma assays, in which N-acetyl-D-galactosamine at 0 to 400 mM was diluted. 25 μL of the solution containing substrate and inhibitor and the same volume of sample were added to each well. After incubation for 2 h at 30 °C, 200 μL of 1 M glycine buffer (pH 10.4) were added to all wells and 25 μL of sample were added to the blanks.

For leukocytes, a blank in duplicate was used for each assay, to which the same volume of water instead of sample was added. 5 μL of the sample and 30 μL of the solution containing 5 mM substrate and inhibitor at concentrations ranging from 0 to 100 mM diluted in 0.5 mM citrate-phosphate buffer (pH 4.8) were added to each well. After incubation at 37 °C for 2 h, 200 μL of 0.5 M glycine-NaOH buffer (pH 10.3) were added to interrupt the reaction through protein denaturation.

2.3. Statistical Analysis

Two groups were compared using Student's T-test and more than two groups were compared using one- or two-way ANOVA followed by Tukey's or Bonferroni tests, respectively, when the differences were significant. The data were expressed as a percentage of the residual

activity compared to the total alpha-galactosidase activity without using GalNAc as GLB inhibitor (100% activity) and the results were considered statistically significant when $p < 0.05$. All analyses were developed using the software GraphPad Prism 5.

3. Results

The results of the GalNAc effect on alpha-galactosidase activity in the groups and the samples analyzed were expressed as a percentage of the initial activity (without inhibitor). The initial activity (without inhibitor) was considered as 100% of the enzyme activity.

Figure 1 shows the results of residual activity of alpha-galactosidase in DBS samples from healthy controls and FD patients using different GalNAc concentrations.

The results of men and women were analyzed separately in accordance with Daitx et al. (Daitx et al., 2012). Without inhibitor, the mean alpha-galactosidase activities in DBS samples from healthy men and women were 7.56 ± 2.88 and 7.94 ± 4.31 nmol/h/mL, respectively. For healthy men, the activity ranged from 5.21 to 12.33 nmol/h/mL. In samples from healthy women, the activity ranged from 3.43 to 13.78 nmol/h/mL. As shown in Figure 1A and 1B, no significant reduction was found in enzyme activity when using GalNAc in samples from healthy men or women.

In male FD patients, the mean enzyme activity in assays without GalNAc was 0.27 ± 0.11 nmol/h/mL, with the activity ranging from 0.15 to 0.38 nmol/h/mL. Female FD patients, at the same assay conditions, had mean activity of 1.25 ± 0.14 nmol/h/mL, and the activity ranged between 1.15 and 1.35 nmol/h/mL. In DBS samples from female FD patients, the mean alpha-galactosidase activity in assays using GalNAc was significantly lower ($p < 0.05$) than in assays without the use of the inhibitor for all concentrations tested (Figure 1D). For samples from male

FD patients, the use of GalNac did not significantly reduce alpha-galactosidase activity compared to the assays in DBS without the use of the inhibitor, although a lower enzyme activity is seen when higher GalNac concentrations were used (Figure 1C).

As in DBS, the results in plasma were also divided according to the gender of the subjects. The effect of different GalNac concentrations in the assays using plasma samples from healthy controls and FD patients is shown in Figure 2.

The mean alpha-galactosidase activity in assays without the inhibitor using plasma samples from healthy males was 7.75 ± 0.59 nmol/h/mL, between 7.32 and 8.17 nmol/h/mL. In healthy women, the activity ranged from 10.27 to 11.46 nmol/h/mL, with a mean of 10.86 ± 0.84 nmol/h/mL. In these two groups, no significant reduction is seen in the activity when using the inhibitor (Figure 2A and 2B).

In plasma samples from FD patients, in assays carried out without GalNac, the average activities in men and women were 0.58 ± 0.23 and 2.72 ± 1.57 nmol/h/mL, respectively. The activities in FD patients ranged from 0.29 to 0.82 nmol/h/mL for men and from 0.99 to 4.05 nmol/h/mL for women.

In plasma samples from male FD patients, the mean alpha-galactosidase activity in assays using GalNac was significantly lower ($p < 0.01$) than in assays without the use of the inhibitor for all concentrations tested (Figure 2C). The use of GalNac did not reduce alpha-galactosidase activity in plasma samples from female FD patients (Figure 2D).

The results of the effect of different GalNac concentrations in assays with leukocyte samples were not divided by gender since there is no difference between men and women for GLA activity in this type of sample (Daitx et al., 2012). The activity of healthy individuals ranged from 6.34 to 71.06 nmol/h/mg of protein, with a mean of 34.42 ± 33.20 nmol/h/mg of protein. For FD patients, the mean alpha-galactosidase activity without GalNac was 3.26 ± 3.03

nmol/h/mg of protein, with activities ranging from 1.19 to 6.73 nmol/h/mg of protein. Both in controls and in FD patients, no significant reduction in enzyme activity was found when using different GalNAc concentrations (Figure 3A and 3B).

After the effect of GalNAc concentration on alpha-galactosidase activity was studied, the residual activity with and without the inhibitor was compared among all groups (Figure 4).

In assays using DBS, no significant difference was found between the residual alpha-galactosidase activity among the groups studied (Figure 4A). Thus, the effect of different GalNAc concentrations was similar in male and female controls and FD patients.

Only with 50 mM of GalNAc (Figure 4B) was alpha-galactosidase activity in plasma samples from healthy women significantly lower than that from healthy men ($p < 0.05$). At this concentration onwards, alpha-galactosidase activity in male FD patients is significantly lower ($p < 0.001$) than the one in healthy men and women and female FD patients.

The residual alpha-galactosidase activity at different GalNAc concentrations used in the assays with leukocyte samples was not different between healthy controls and FD patients (Figure 4C).

4. Discussion

Measuring GLA activity in assays using plasma and leukocyte samples is the standard method for the biochemical diagnosis of FD, while the DBS assays are commonly used in screening studies in high-risk populations. The fluorescent artificial substrate 4-Methylumbelliferyl- α -D-galactoside has been widely used for these purposes for over 40 years (Kint, 1970), since measuring GLA activity using this substrate is a simple, sensitive, and cost-effective method to diagnose FD. However, this substrate is not specific for GLA and may also

be hydrolyzed by GLB, an enzyme that may have normal or even higher activity in FD patients. Therefore, using GalNAc, a GLB activity inhibitor, in the assays to determine GLA activity represents a very important tool.

Although many authors use GalNAc in assays to determine GLA activity, there is no consensus regarding its use in the different materials used in the analysis or regarding the inhibitor concentration to be used (Chamoles et al., 2001; Desnick et al., 2003; Spada et al., 2006; Winchester and Young, 2006; Terryn et al., 2008; Kalkan Ucar et al., 2012). In face of the factors presented, this study assessed the effect of different GalNAc concentrations on measuring alpha-galactosidase activity by verifying the influence of this factor on FD diagnosis.

Alpha-galactosidase activity in DBS samples from female FD patients decreased when GalNAc was added. However, no significant difference was observed between the enzyme activity when different inhibitor concentrations were used, which shows that even the lowest concentrations, such as 5 mM, were able to inhibit GLB. For the male and female controls and male FD patients, no significant effect of using GalNAc in the enzyme assays was found. However, a decreasing trend in activity with higher GalNAc concentrations in male FD patients was observed.

The literature reports the use of GalNAc in DBS at concentrations of 100 mM (Linthorst et al., 2005), 250 mM (Linthorst et al., 2005), and 300 mM (Linthorst et al., 2005). The present results show that using GalNAc at 5 mM concentration would be enough to inhibit GLB and identify female FD patients.

The influence of GLB favors the production of false-negative results. Since the female FD patient (heterozygote) group has a greater variation in GLA activity, potentially having results in the same range as healthy controls, using GalNAc in enzymatic assays to measure GLA, and the consequent reduction in enzyme activity of this group, improves the differentiation of female FD

patients from the controls. Although no significant difference was found in the alpha-galactosidase activities among the GalNAc concentrations used for male FD patients, this group's activity is close to zero even without adding the inhibitor, which enables them to be well differentiated from healthy individuals.

In the assays using plasma samples, adding GalNAc significantly impacted only GLA activity in male FD patients. In this group, GLA activity was lower at all inhibitor concentrations tested. The GalNAc concentration used in the literature for plasma samples is 100 to 500 mM (Desnick et al., 2003; Winchester and Young, 2006; Kalkan Ucar et al., 2012). Using concentrations of 100 mM is more common and match the results presented in this study. Some researchers suggest that plasma assays are less reliable than leukocyte assays for FD diagnosis (Hoffmann et al., 2005; Andrade et al., 2008). However, according to Desnick and Iannou (Desnick et al., 2001), using the inhibitor provides a reliable diagnosis for men who develop the classic FD phenotype. The use of the inhibitor along with establishing specific reference values for women (Daitx et al., 2012) may contribute to the reliability of results in plasma samples.

In leukocyte samples from healthy individuals and FD patients, no significant effect of using GalNAc in the enzyme assays was found. However, a decreasing trend in activity with higher GalNAc concentrations in FD patients was observed. According to these results, the inhibitor would not need to be used in FD diagnosis assays using leukocyte samples. Winchester and Young (Winchester and Young, 2006) recommend using the inhibitor in assays carried out with leukocyte samples despite acknowledging that the influence of GLB in this material is not more than 10% of the total enzyme activity. Andrade et al. (Andrade et al., 2008) reported that the influence of GLB in leukocyte samples ranged from 0 to 7.6%. Besides the present research having not found a significant difference when using GalNAc, which matches the literature, no

studies are known that report difficulties in differentiating GLA activity in leukocyte samples from healthy individuals and FD patients with or without the use of the inhibitor.

When the groups studied were compared for the effect of different GalNAc concentrations on the residual alpha-galactosidase activity, a significant difference among the groups was found only for the assays carried out with plasma samples.

In DBS, even at a GalNAc concentration of 100 mM, the healthy controls of both genders remained with 100% initial alpha-galactosidase activity, i.e., without using the inhibitor. Unlike the healthy controls, the residual activity in DBS samples from FD patients was around 84% and 52% for men and women, respectively, when 100 mM of GalNAc were used, although this difference was not statistically significant. These results, along with the other results obtained in the present study for DBS samples, suggest that GalNAc may need to be used in assays with this type of sample.

In plasma, the residual alpha-galactosidase activity from male FD patients was lower than the activity from healthy men at all inhibitor concentrations tested. At 200 mM GalNAc concentration, the residual activity in male FD patients was around 15%, while in healthy men it was around 96%. The present results match those from Desnick and Iannou (Desnick et al., 2001) since they suggest that using the inhibitor in assays with plasma samples enables a reliable diagnosis of male FD patients.

In leukocytes, at 100 mM GalNAc concentration, the residual activity in healthy individuals and FD patients was around 80% and 57%, respectively. Even though no significant difference was observed, using the inhibitor in assays with leukocyte samples may contribute to reducing the number of false negatives, mainly for heterozygote women, whose GLA activity varies more.

Overall, the present results showed that the effect of GalNAc was greater in patients than in FD controls. This effect may be explained by the fact that GLB activity may be enhanced in FD patients. However, even if GLB activity is not enhanced in FD patients, this enzyme's activity will represent a higher percentage of the total alpha-galactosidase activity since GLA is deficient in these patients.

5. Conclusions

The present results suggest that using GalNAc as a GLB inhibitor in assays to determine GLA activity as a tool in FD diagnosis may contribute to fewer false negatives especially when DBS and plasma samples are used. In leukocytes, the use of the inhibitor seems to be unnecessary, although it may contribute to diagnose female FD patients.

Acknowledgements

The authors thank CNPq and FAPERGS for the financial support, the Rio Grande do Sul Association of Fabry Disease Patients and Relatives (AGPPDFF) and the donors and staff of the blood bank of the Clinics Hospital of Porto Alegre for the blood samples used in this study.

References

- [1] Desnick RJ, Ioannou YA, Eng CM, Alpha-galactosidase A deficiency: Fabry disease. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al., editors. *The metabolic & molecular bases of inherited disease*. New York ; London: McGraw-Hill, 2001: 3733-3774.
- [2] Beutler E, Kuhl W. Purification and properties of human alpha-galactosidases. *J Biol Chem* 1972; 247:7195-7200.
- [3] Wood S, Nadler HL. Fabry's disease: absence of an -galactosidase isozyme. *Am J Hum Genet* 1972; 24:250-255.
- [4] Desnick RJ, Allen KY, Desnick SJ, Raman MK, Bernlohr RW, Krivit W. Fabry's disease: enzymatic diagnosis of hemizygotes and heterozygotes. Alpha-galactosidase activities in plasma, serum, urine, and leukocytes. *J Lab Clin Med* 1973; 81:157-171.
- [5] Ho MW, Beutler S, Tennant L, O'Brien JS. Fabry's disease: evidence for a physically altered -galactosidase. *Am J Hum Genet* 1972; 24:256-266.
- [6] Rietra PJ, Van den Bergh FA, Tager JM. Properties of the residual alpha-galactosidase activity in the tissues of a Fabry hemizygote. *Clin Chim Acta* 1975; 62:401-413.
- [7] Dean KJ, Sung SS, Sweeley CC. The identification of alpha-galactosidase B from human liver as an alpha-N-acetylgalactosaminidase. *Biochem Biophys Res Commun* 1977; 77:1411-1417.
- [8] Schram AW, Hamers MN, Tager JM. The identity of alpha-galactosidase B from human liver. *Biochim Biophys Acta* 1977; 482:138-144.
- [9] Dean KJ, Sweeley CC. Studies on human liver alpha-galactosidases. II. Purification and enzymatic properties of alpha-galactosidase B (alpha-N-acetylgalactosaminidase). *J Biol Chem* 1979; 254:10001-10005.
- [10] Kusiak JW, Quirk JM, Brady RO. Purification and properties of the two major isozymes of alpha-galactosidase from human placenta. *J Biol Chem* 1978; 253:184-190.
- [11] Mayes JS, Scheerer JB, Sifers RN, Donaldson ML. Differential assay for lysosomal alpha-galactosidases in human tissues and its application to Fabry's disease. *Clin Chim Acta* 1981; 112:247-251.
- [12] Chamoles NA, Blanco M, Gaggioli D. Fabry disease: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. *Clin Chim Acta* 2001; 308:195-196.
- [13] Kalkan Ucar S, Sozmen E, Duman S, Basci A, Coker M. Alpha-galactosidase A activity levels in Turkish male hemodialysis patients. *Ther Apher Dial* 2012; 16:560-565.
- [14] Desnick RJ, Brady R, Barranger J, et al. Fabry disease, an under-recognized multisystemic disorder: expert recommendations for diagnosis, management, and enzyme replacement therapy. *Ann Intern Med* 2003; 138:338-346.
- [15] Winchester B, Young E. *Biochemical and genetic diagnosis of Fabry disease*. 2006.
- [16] Spada M, Pagliardini S, Yasuda M, et al. High incidence of later-onset fabry disease revealed by newborn screening. *Am J Hum Genet* 2006; 79:31-40.
- [17] Terryn W, Poppe B, Wuyts B, et al. Two-tier approach for the detection of alpha-galactosidase A deficiency in a predominantly female haemodialysis population. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23:294-300.
- [18] Linthorst GE, Vedder AC, Aerts JM, Hollak CE. Screening for Fabry disease using whole blood spots fails to identify one-third of female carriers. *Clin Chim Acta* 2005; 353:201-203.
- [19] Germain DP. Fabry disease. *Orphanet J Rare Dis* 2010; 5:30.

- [20] Skoog WA, Beck WS. Studies on the fibrinogen, dextran and phytohemagglutinin methods of isolating leukocytes. *Blood* 1956; 11:436-454.
- [21] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-275.
- [22] Civallero G, Michelin K, de Mari J, 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.
- [23] de Castilhos CD, Mezzalira J, Goldim MP, Coelho JC. Influence of pre-analytical factors on alpha-galactosidase A, arylsulfatase B and alpha-glucosidase activities measured on dried blood spots on filter paper. *Clin Biochem* 2011; 44:922-926.
- [24] Daitx VV, Mezzalira J, Goldim MP, Coelho JC. Comparison between alpha-galactosidase A activity in blood samples collected on filter paper, leukocytes and plasma. *Clin Biochem* 2012; 45:1233-1238.
- [25] Kint JA. Fabry's disease: alpha-galactosidase deficiency. *Science* 1970; 167:1268-1269.
- [26] Andrade J, Waters PJ, Singh RS, et al. Screening for Fabry disease in patients with chronic kidney disease: limitations of plasma alpha-galactosidase assay as a screening test. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; 3:139-145.
- [27] Hoffmann B, Georg Koch H, Schweitzer-Krantz S, Wendel U, Mayatepek E. Deficient alpha-galactosidase A activity in plasma but no Fabry disease--a pitfall in diagnosis. *Clin Chem Lab Med* 2005; 43:1276-1277.

FIGURE CAPTIONS

Figure 1

Alpha-galactosidase activity in DBS samples from healthy (A) men (n=5) and (B) women (n=4) and (C) male and (D) female FD patients (n=3) using different N-acetylgalactosamine concentrations. Activity expressed as a percentage of the initial activity (100%, without GalNAc = 7.56 ± 2.88 nmol/h/mL (A); 7.94 ± 4.31 nmol/h/mL (B), 0.27 ± 0.11 nmol/h/mL (C) and 1.25 ± 0.14 nmol/h/mL (D)). * Significantly different from the group without GalNAc ($p < 0.05$). One-way ANOVA followed by Tukey's test.

Figure 2

Alpha-galactosidase activity in plasma samples (n=3) from healthy (A) men and (B) women and (C) male (n=4) and (D) female (n=3) FD patients using different N-acetylgalactosamine concentrations. Activity expressed as a percentage of the initial activity (100%, without GalNAc = 7.75 ± 0.59 nmol/h/mL (A); 10.86 ± 0.84 nmol/h/mL (B), 0.58 ± 0.23 nmol/h/mL (C) and 2.72 ± 1.57 nmol/h/mL (D)). *** Significantly different from the group without GalNAc ($p < 0.001$). One-way ANOVA followed by Tukey's test.

Figure 3

Alpha-galactosidase activity in leukocyte samples (n=3) from (A) healthy controls and (B) FD patients using different N-acetylgalactosamine concentrations. Activity expressed as a percentage of the initial activity (100%, without GalNAc = 34.42 ± 33.2 nmol/h/mg prot (A) and 3.26 ± 3.03 nmol/h/mg prot (B)).

Figure 4

Effect of different N-acetylgalactosamine concentrations on the alpha-galactosidase activity in healthy controls and FD patients using (A) DBS (n=3), (B) plasma (n=3), and (C) leukocyte (n=4) samples. Activity expressed as a percentage of the initial activity (without GalNAc). *Significantly different from healthy men ($p < 0.05$). ***Significantly different from healthy men and women and female FD patients ($p < 0.001$). Two-way ANOVA followed by Bonferroni test.

Figure 1

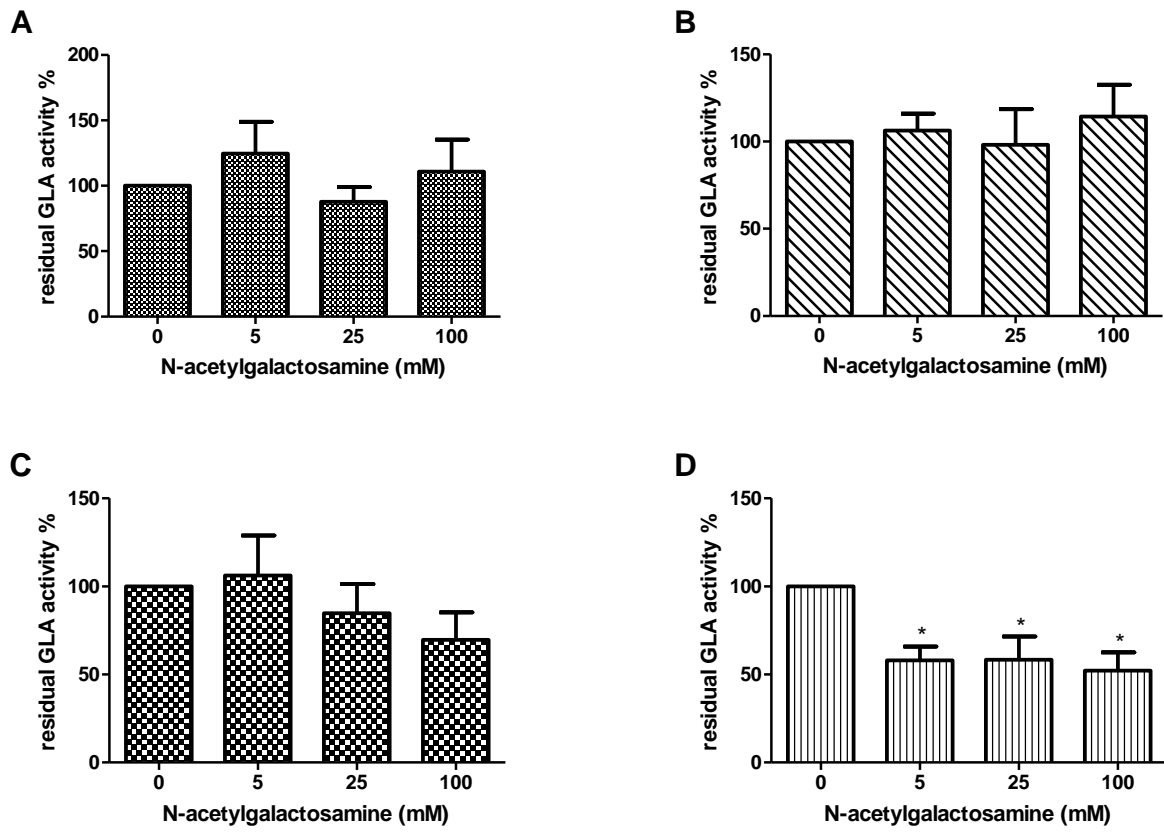


Figure 2

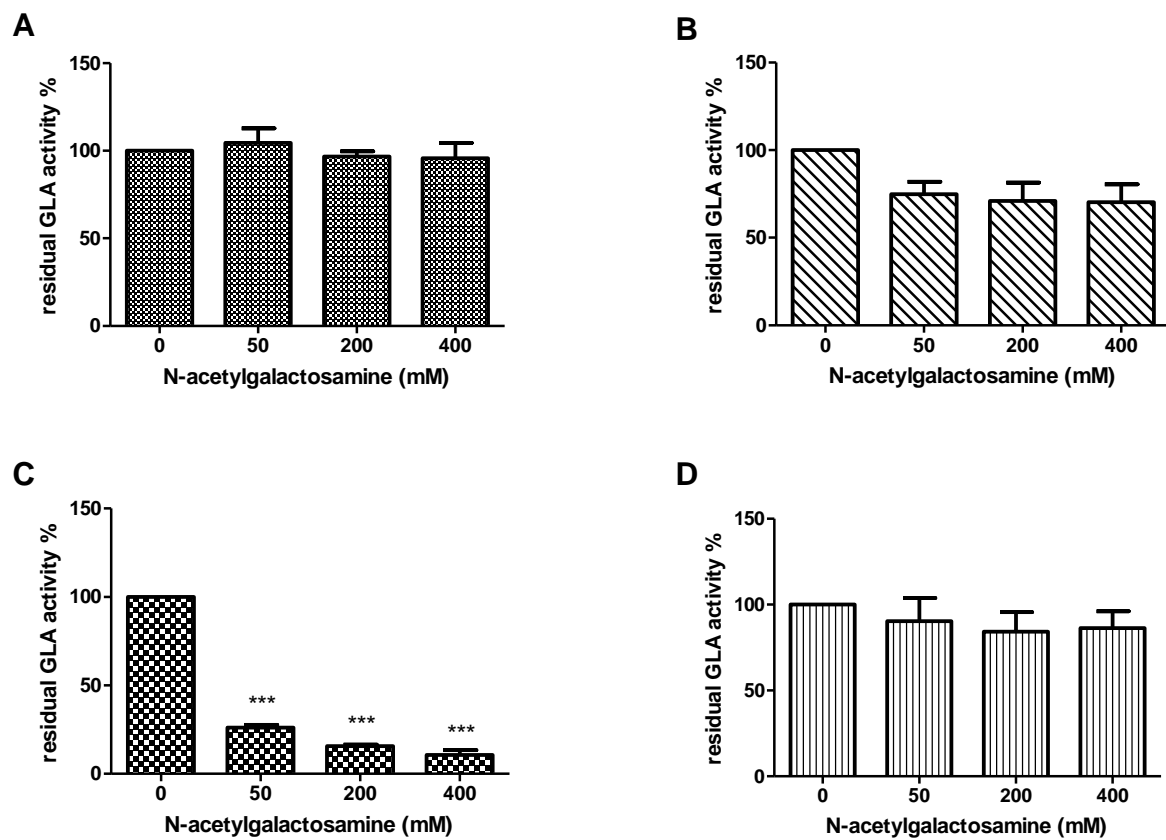


Figure 3

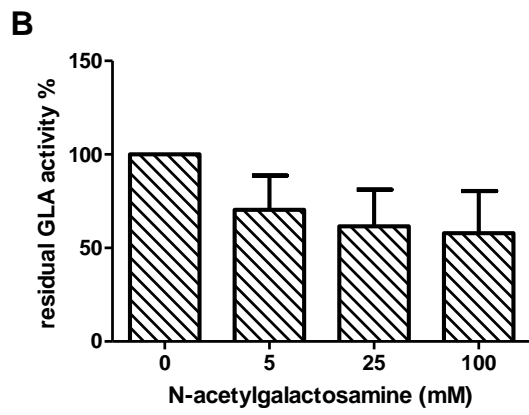
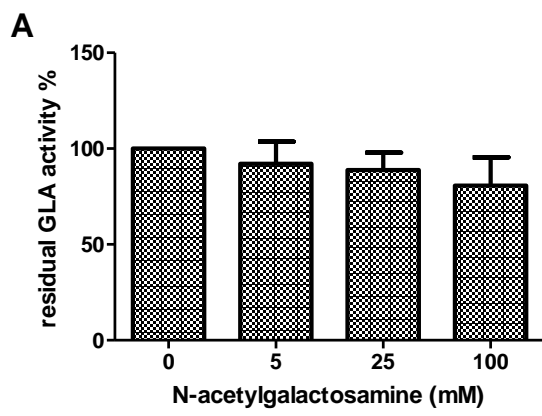
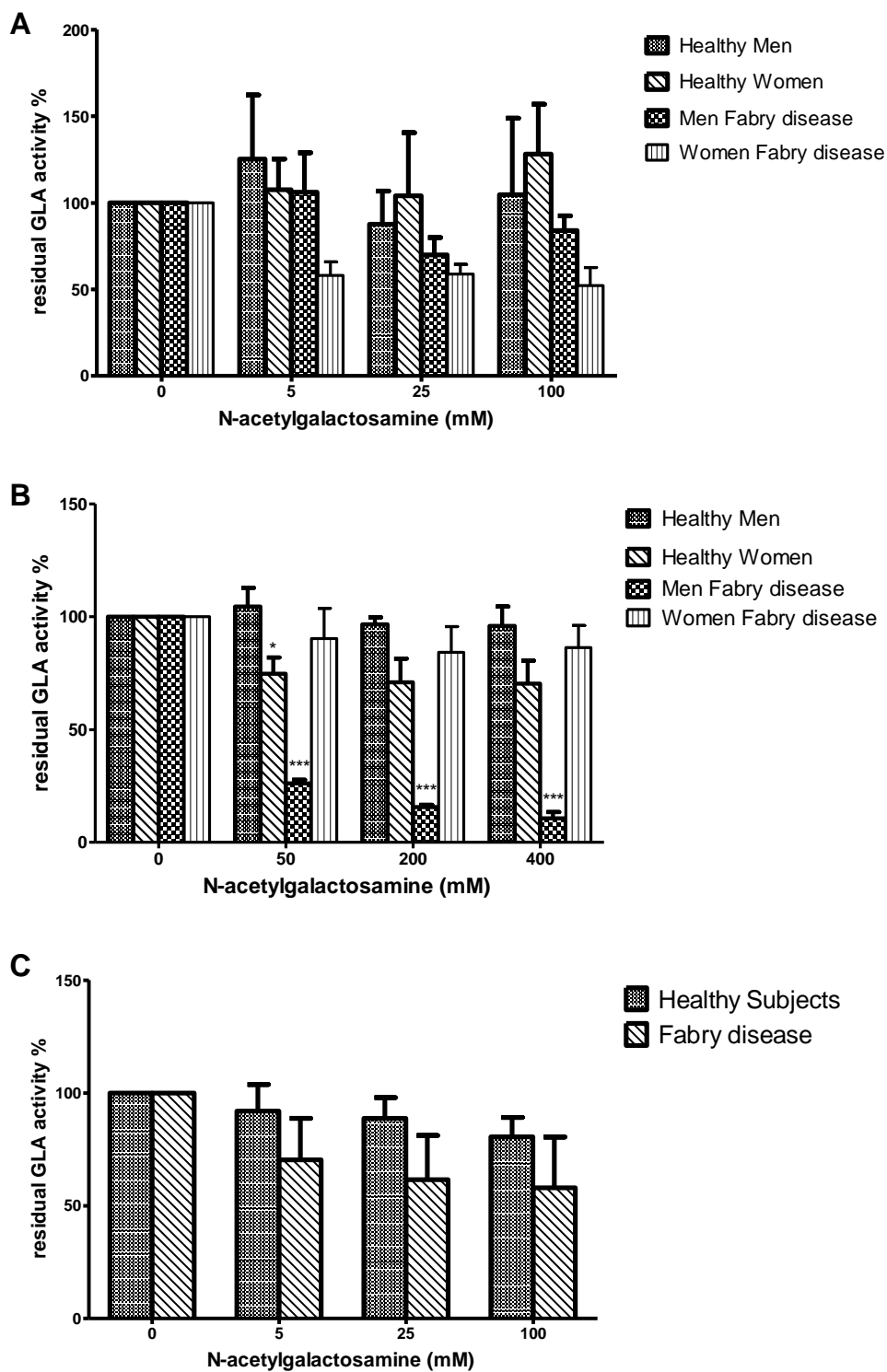


Figure 4



5. DISCUSSÃO

A medida da atividade da GLA em amostras de plasma e leucócitos é o principal método de diagnóstico bioquímico da DF, enquanto os ensaios em SPF são comumente utilizados em estudos de triagem em populações de alto risco. Embora o diagnóstico em plasma e leucócitos seja definitivo para indivíduos do sexo masculino, alguns pacientes podem apresentar atividade da GLA residual, que ultrapassa os valores estabelecidos para pacientes com DF. As mulheres com DF (heterozigotas) possuem maior variação na atividade da GLA, e apresentam, com frequência, resultados na mesma faixa dos controles saudáveis (Linthorst et al., 2005). Nestes casos, é indicada a análise molecular do gene da GLA para o estabelecimento do diagnóstico definitivo. Entretanto, o diagnóstico molecular é bastante demorado e tem custo elevado, devido a grande quantidade de mutações descritas e também à ausência de mutações comuns para DF.

Lukas e colaboradores (2013) demonstraram que a medida da atividade da GLA pode ser utilizada, também, como ferramenta na previsão do fenótipo da DF. Dessa forma, a utilização de metodologia adequada para o diagnóstico bioquímico da DF também poderá contribuir para a determinação da gravidade do fenótipo do paciente diagnosticado com a doença.

Embora o diagnóstico bioquímico apresente vantagens se comparado ao diagnóstico molecular, sendo amplamente utilizado, existe a necessidade de aprimoramento das técnicas utilizadas, visando uma melhor diferenciação entre os pacientes com DF do sexo feminino e masculino e indivíduos saudáveis. Dessa forma, o estudo das propriedades bioquímicas da GLA pode contribuir para aperfeiçoar este tipo de diagnóstico, tornando-o mais preciso. Assim, com o intuito de buscar parâmetros que possam auxiliar na diferenciação entre sujeitos saudáveis e pacientes com DF, nós estudamos as seguintes propriedades bioquímicas e cinéticas da GLA: pH ótimo, K_m , $V_{máx}$ e termoestabilidade. Além disso, também avaliamos o efeito de diferentes concentrações de GalNAc sobre a medida da atividade da alfa-galactosidase, verificando a influência deste fator no diagnóstico da DF.

Quanto à precisão dos resultados obtidos, os resultados de coeficientes de variação intra-ensaio, interensaio e interpessoal demonstraram a precisão e confiabilidade de todas as técnicas utilizadas neste trabalho. Segundo vários autores, um coeficiente de variação aceitável é aquele até 20% (Olivova et al., 2009; Muller et al., 2010; Lukacs et al., 2011). Todos os nossos resultados de coeficiente de variação ficaram abaixo ou igual a 20%, sendo os resultados em amostras de SPF os que tiveram maior variação. Embora os coeficientes de variação em SPF tenham sido mais altos, estão de acordo com os resultados encontrados em outros trabalhos que utilizam este tipo de amostra (Olivova et al., 2009; de Castilhos et al., 2011).

Em todos os tipos de amostra a atividade da GLA foi significativamente maior em controles que em pacientes com DF. Quando os resultados em amostras de SPF e plasma foram divididos por gênero também foi possível distinguir os grupos controle dos grupos de pacientes com DF. Os resultados utilizando amostras de SPF e de plasma foram divididos por gênero, devido à diferença significativa encontrada entre a atividade da GLA em amostras de SPF e plasma de indivíduos saudáveis do sexo masculino e feminino, da mesma forma que já observado por Daitx e colaboradores (2012).

Praticamente não houve casos de sobreposição de valores de atividade da GLA. Apenas em amostras de SPF foi observada atividade da GLA de mulheres com DF na faixa de variação dos controles do sexo feminino. Com exceção da média da atividade da GLA em amostras de SPF de homens saudáveis, todas as médias das atividades dos controles ficaram dentro da faixa de valores de referência para controles saudáveis estabelecidas por nosso grupo de pesquisa em trabalho anterior (Daitx et al., 2012). A média da atividade da GLA em amostras de SPF de homens saudáveis foi $8,784 \pm 2,852$, acima dos valores de referência estabelecidos anteriormente. Esta diferença pode ser explicada pela mudança do pH utilizado nos ensaios, uma vez que foi utilizado o pH 5 (pH em que a média da atividade da GLA foi mais alta em SPF) ao invés do pH

4,4 (utilizado no trabalho anterior e nos ensaios usuais com fins de diagnóstico da DF). Os valores de atividade da GLA para os tipos de amostra empregados foram semelhantes aos descritos na literatura (Chamoles et al., 2001; Desnick et al., 2001; Hoffmann et al., 2005; Civallero et al., 2006; Andrade et al., 2008; Castilhos et al., 2014).

Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre a atividade da GLA em pHs adjacentes para todos os tipos de amostra. Por este motivo, o pH em que a média da atividade da GLA em amostras de indivíduos saudáveis foi mais alta foi utilizado para realizar os demais ensaios enzimáticos do trabalho. Nos ensaios utilizando amostras de plasma foi observada diferença significativa entre a atividade da GLA de homens e mulheres saudáveis nos pHs 4,7 e 4,8. Esse pode ser um dos fatores que contribuiu para a diferença encontrada entre a atividade da GLA em plasma de homens e mulheres saudáveis, uma vez que em Daitx e colaboradores (2012) os ensaios em plasma foram realizados em pH 4,8. Para os ensaios enzimáticos da GLA nestes pHs, portanto, faz-se necessário o uso de valores de referência específicos para cada gênero.

Como citamos anteriormente, os valores de K_m para GLA do tipo selvagem (normal) purificada a partir de fígado humano (Dean and Sweeley, 1979a), células COS-7 transfectadas (Ishii et al., 2007) e células HEK293H transfectadas (Lukas et al., 2013), foram estabelecidos em 2,8 mM (Ishii et al., 2007) e em 2,9 (Dean and Sweeley, 1979a) e (Lukas et al., 2013). O K_m da GLA em amostras de plasma de indivíduos saudáveis (3,1 mM) obtido no nosso trabalho foi aquele que mais se aproximou dos valores de K_m estabelecidos pelos grupos citados acima. Acreditamos que o valor de K_m nas demais amostras de indivíduos saudáveis (0,56 mM, e 1,38, para leucócitos e SPF, respectivamente) por nós determinados foram diferentes daqueles dos autores anteriores, pois estes autores utilizaram amostras com a enzima purificada. Entretanto, a purificação da enzima a partir de pequenas alíquotas de sangue humano é inviável, tornando este método impraticável para o diagnóstico de DLs. Como nosso objetivo estava relacionado à

identificação de parâmetros que poderiam auxiliar no diagnóstico rápido da DF, a diferença dos resultados aqui mostrados e aqueles obtidos pelos autores acima mencionados não deve comprometer nossos resultados. Além disso, no presente estudo, não foi encontrada diferença significativa entre os valores de Km para a GLA de controles saudáveis e pacientes com DF, em nenhum tipo de amostra utilizada, o que tornou este parâmetro inadequado para distinguir os grupos estudados.

Em relação aos valores das V_{máx}, foi encontrada diferença significativa entre controles saudáveis e pacientes com DF para todos os tipos de amostra. Em SPF, não foi possível diferenciar os grupos de acordo com o sexo. Para a V_{máx} em plasma praticamente o grupo de pacientes masculinos e femininos tiveram média significativamente menor que os grupos controle masculino e feminino, como mostrado na Tabela 5 do capítulo 1 (Artigo 1). A única exceção foi o grupo de mulheres com DF, cuja V_{máx} não diferiu da V_{máx} das mulheres saudáveis. Dessa maneira, observamos que os grupos de indivíduos saudáveis e de pacientes com DF podem ser distinguidos com base neste parâmetro, utilizando qualquer tipo de amostra.

Em relação aos estudos de termoestabilidade, o comportamento da GLA foi semelhante entre os grupos controle e pacientes com DF, tanto utilizando amostras de SPF quanto de plasma. Em plasma, a atividade residual da GLA após 2 minutos de pré-incubação a 40 °C de mulheres saudáveis e mulheres com DF foi significativamente menor que a dos controles do sexo masculino. Entretanto, nos demais tempos de pré-incubação não foi observada diferença entre estes grupos.

Em leucócitos, a enzima de controles e pacientes com DF apresentou comportamento significativamente diferente a partir de 4 minutos de pré-incubação. Embora a atividade média da GLA entre os pacientes com Fabry tenha sido baixa, a enzima deste grupo pareceu ser mais termoestável que a GLA do grupo controle. Após uma hora de pré-incubação à 50 °C, a enzima

manteve 79% da atividade da GLA de amostras não submetidas à pré-incubação. Dessa forma, os estudos de termoestabilidade da GLA em amostras de leucócitos permitiram diferenciar os grupos controle e pacientes com DF.

O substrato artificial fluorescente 4-Metilumbeliferil- α -D-galactosídeo é amplamente utilizado para fins de diagnóstico bioquímico da DF há mais de 40 anos (Kint, 1970), uma vez que a medida da atividade da GLA utilizando este substrato é um método simples, sensível e barato para o diagnóstico da DF. Entretanto, este substrato não é específico para GLA, podendo também ser hidrolisado pela GLB, enzima que pode apresentar atividade normal ou até mais alta em pacientes com DF. Dessa forma, o uso de GalNAc, inibidor da atividade da GLB, nos ensaios para determinar a atividade da GLA se constitui uma ferramenta muito importante.

Embora muitos autores utilizem a GalNAc em ensaios para determinar a atividade da GLA, não existe um consenso em relação a sua utilização nos diversos materiais empregados na análise e nem à concentração de inibidor a ser utilizada (Chamoles et al., 2001; Desnick et al., 2003; Spada et al., 2006; Winchester and Young, 2006; Terryn et al., 2008; Kalkan Ucar et al., 2012). Por este motivo, avaliamos o efeito de diferentes concentrações de GalNAc sobre a medida da atividade da alfa-galactosidase.

A atividade da alfa-galactosidase em amostras de SPF de mulheres com DF diminuiu com a adição de GalNAc, porém não foi observada diferença significativa entre a atividade da enzima na presença das diferentes concentrações do inibidor, demonstrando que mesmo em concentrações mais baixas, como 5mM, a GLB foi inibida. Para os grupos controle masculino e feminino e homens com DF, não foi observado efeito significativo do uso de GalNAc nos ensaios enzimáticos. Entretanto, pode-se observar uma tendência à diminuição da atividade com o aumento da concentração de GalNAc em homens com DF.

Em SPF é relatado na literatura o uso de GalNAc nas concentrações de 100 mM (Linthorst et al., 2005), 250 mM (Chamoles et al., 2001) e 300 mM (Olivova et al., 2009). Nossos resultados mostram que o uso de GalNAc na concentração de 5 mM seria suficiente para inibir a GLB e identificar mulheres com DF.

A influência da GLB favorece a produção de resultados falso-negativos. Uma vez que o grupo de mulheres com DF (heterozigotas) apresenta maior variação na atividade da GLA, podendo apresentar resultados na faixa dos indivíduos saudáveis, a utilização de GalNAc nos ensaios enzimáticos para medida da GLA, e a consequente diminuição da atividade da enzima neste grupo, favorece a diferenciação das mulheres com DF do grupo controle. No grupo com DF masculino, não foi encontrada diferença significativa entre a atividade da alfa-galactosidase em diferentes concentrações de GalNAc. Entretanto, independentemente do uso de GalNAc, a atividade da alfa-galactosidase neste grupo é aproximadamente zero. Assim, este grupo pode ser facilmente diferenciado do grupo de indivíduos saudáveis, mesmo sem adição do inibidor.

Nos ensaios utilizando amostras de plasma, a adição de GalNAc influenciou significativamente apenas a atividade da GLA de homens com DF. Neste grupo, a atividade da GLA foi menor em todas as concentrações testadas do inibidor. A concentração de GalNAc utilizada na literatura para amostras de plasma é de 100 a 500 mM (Desnick et al., 2003; Winchester and Young, 2006; Kalkan Ucar et al., 2012). A utilização da concentração 100 mM é a mais comum e está de acordo com os resultados aqui apresentados. Alguns trabalhos sugerem que ensaios realizados em plasma são menos confiáveis que os ensaios utilizando amostras de leucócitos para fins de diagnóstico da DF (Hoffmann et al., 2005; Andrade et al., 2008). Entretanto, de acordo com Desnick e Iannou (Desnick et al., 2013), o uso do inibidor permite o diagnóstico confiável para homens que desenvolvem o fenótipo clássico da DF. O uso do inibidor

aliado ao estabelecimento de valores de referência específicos para mulheres (Daitx et al., 2012) pode contribuir para a confiabilidade dos resultados em amostras de plasma.

Em amostras de leucócitos de indivíduos saudáveis e pacientes com DF, não foi observado efeito significativo do uso de GalNAc nos ensaios enzimáticos. Entretanto, pode-se observar uma tendência à diminuição da atividade com o aumento da concentração de GalNAc em pacientes com DF. Segundo estes resultados, não haveria necessidade do uso do inibidor nos ensaios para fins de diagnóstico de DF realizados em leucócitos. Winchester e Young (Winchester and Young, 2006) recomendam o uso do inibidor em ensaios realizados com amostras de leucócitos, mesmo reconhecendo que a influência da GLB neste material não ultrapassa 10% da atividade enzimática total. Andrade e colaboradores (Andrade et al., 2008) observaram que a influência da GLB em amostras de leucócitos variou entre 0 e 7,6%. Além de não termos encontrado diferença significativa com o uso de GalNAc, o que está de acordo com a literatura, não conhecemos trabalhos que relatem dificuldades para diferenciar a atividade da GLA em amostras de leucócitos de indivíduos saudáveis e pacientes com DF, com ou sem o uso do inibidor.

Quando foi feita a comparação entre os grupos estudados quanto ao efeito de diferentes concentrações da GalNAc na atividade residual da alfa-galactosidade, apenas para ensaios realizados com amostras de plasma foi encontrada diferença significativa entre eles.

Em SPF, mesmo na concentração de 100 mM de GalNAc, os controles saudáveis, tanto do sexo masculino quanto feminino, continuaram com cerca de 100% da atividade da alfa-galactosidase inicial, ou seja, sem o uso do inibidor. Diferente dos controles saudáveis, a atividade residual em amostras de SPF de pacientes com DF foi em torno de 84% e 52% para homens e mulheres, respectivamente, quando utilizado 100mM de GalNAc. Estes resultados,

somados aos demais resultados obtidos neste trabalho para amostras de SPF, indicam, provavelmente, a necessidade de uso de GalNAc em ensaios com este tipo de amostra.

Em plasma, a atividade residual da alfa-galactosidase de homens com DF foi menor que a atividade de homens saudáveis, em todas as concentrações testadas do inibidor. Na concentração de 200 mM de GalNAc, a atividade residual em pacientes com DF do sexo masculino foi em torno de 15%, enquanto em homens saudáveis foi em torno de 96%. Nossos resultados estão de acordo com o descrito por Desnick e Iannou (Desnick et al., 2013), que indicam que o uso do inibidor em ensaios realizados com amostras de plasma, permite diferenciar confiavelmente os homens com DF.

Em leucócitos, na concentração de 100 mM de GalNAc, a atividade residual em indivíduos saudáveis e pacientes com DF foi cerca de 80% e 57%, respectivamente. Embora não tenha sido observada diferença significativa, o uso do inibidor em ensaios com amostras de leucócitos talvez possa contribuir para diminuição de casos falso-negativos, principalmente no caso de mulheres heterozigotas, cuja atividade da GLA é mais variável.

Em geral, nossos resultados demonstraram que o efeito da GalNAc foi maior em pacientes do que em controles com DF. Este efeito pode ser explicado pelo fato de que a atividade da GLB pode estar elevada em pacientes com DF (Rietra et al., 1975). Entretanto, mesmo que a atividade da GLB não esteja elevada nos pacientes com DF, a atividade desta enzima representará uma porcentagem maior na atividade total da alfa-galactosidase, uma vez que a GLA é deficiente nestes pacientes.

De acordo com nossos resultados, a GLA de pacientes com DF e de indivíduos saudáveis difere não somente quanto à atividade em amostras de SPF, plasma e leucócitos, mas também quanto à $V_{m\acute{a}x}$ e termoestabilidade. A diferença entre a $V_{m\acute{a}x}$ da GLA pode ser utilizada para diferenciar pacientes e controles em ensaios realizados com SPF, plasma e leucócitos. Apenas

amostras de leucócitos podem ser utilizadas para separar o grupo controle dos pacientes com DF através de estudos de termoestabilidade. A pré-incubação à 50°C por 1 hora é uma maneira bastante prática de diferenciar os pacientes com DF, devido à simplicidade deste método.

Os dados obtidos neste trabalho podem ser utilizados como ferramenta auxiliar para o diagnóstico da DF, especialmente nos casos de pacientes cuja atividade da GLA se encontra dentro dos limites considerados normais. Além disso, a utilização de GalNAc como inibidor da GLB em ensaios para determinar a atividade da GLA, utilizados como ferramenta no diagnóstico da DF, pode contribuir para diminuir os casos de resultados falso-negativos, principalmente quando utilizado amostras de SPF e plasma. Em leucócitos, o uso do inibidor parece não ser necessário, embora talvez possa contribuir para o diagnóstico de mulheres com DF.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os objetivos estabelecidos neste trabalho, as seguintes conclusões foram obtidas ao final do estudo:

- a) A enzima GLA de indivíduos saudáveis e pacientes com DF foi caracterizada bioquimicamente através da determinação do pH ótimo, K_m , $V_{m\acute{a}x}$ e termoestabilidade da enzima em amostra de SPF, plasma e leucócitos.
- b) As propriedades bioquímicas e cinéticas de indivíduos normais e pacientes com DF diferiram quanto: à atividade, à $V_{m\acute{a}x}$ e à termoestabilidade em amostras de SPF, plasma e leucócitos
- c) Homens e mulheres diferiram entre as seguintes propriedades da GLA: atividade em SPF e plasma, atividade em ensaios realizados em pH 4,7 e 4,8, $V_{m\acute{a}x}$ e atividade residual em amostras de plasma após 2 minutos de pré-incubação a 40°C.
- d) A GLB influenciou os ensaios para a medida da alfa-galactosidase em SPF e plasma. A concentração de GalNac 5 mM e 50 mM, para SPF e plasma, respectivamente, pode ser utilizada para diferenciar adequadamente os pacientes com DF. Em leucócitos não foi observada nenhuma diferença significativa na atividade da alfa-galactosidase utilizando-se o inibidor.
- e) Para diferenciar os grupos de indivíduos saudáveis e pacientes com DF, pode ser utilizada a $V_{m\acute{a}x}$ da GLA em amostras de SPF, plasma e leucócitos. A inativação da GLA pelo calor em amostras de leucócitos é um método simples que também pode ser utilizado como ferramenta auxiliar no diagnóstico da DF.

7. REFERÊNCIAS

- Aerts JM, Groener JE, Kuiper S, Donker-Koopman WE, Strijland A, Ottenhoff R, van Roomen C, Mirzaian M, Wijburg FA, Linthorst GE, Vedder AC, Rombach SM, Cox-Brinkman J, Somerharju P, Boot RG, Hollak CE, Brady RO, Poorthuis BJ. 2008. Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:2812-2817.
- Andrade J, Waters PJ, Singh RS, Levin A, Toh BC, Vallance HD, Sirrs S. 2008. Screening for Fabry disease in patients with chronic kidney disease: limitations of plasma alpha-galactosidase assay as a screening test. *Clin J Am Soc Nephrol* 3:139-145.
- Bekri S, Lidove O, Jaussaud R, Knebelmann B, Barbey F. 2006. The role of ceramide trihexoside (globotriaosylceramide) in the diagnosis and follow-up of the efficacy of treatment of Fabry disease: a review of the literature. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 4:289-297.
- Beutler E, Kuhl W. 1972. Purification and properties of human alpha-galactosidases. *J Biol Chem* 247:7195-7200.
- Boustany RM. 2013. Lysosomal storage diseases--the horizon expands. *Nat Rev Neurol* 9:583-598.
- Brady RO, Gal AE, Bradley RM, Martensson E, Warshaw AL, Laster L. 1967. Enzymatic defect in Fabry's disease. Ceramidetrihexosidase deficiency. *N Engl J Med* 276:1163-1167.
- 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 (Sao Paulo)* 68:1469-1473.
- Campos D, Monaga M, Gonzalez EC, Herrera D. 2013. Identification of mucopolysaccharidosis I heterozygotes based on biochemical characteristics of L-iduronidase from dried blood spots. *Clin Chim Acta* 430C:24-27.
- Castilhos CD, Mezzalira J, Goldim MP, Daitx VV, Garcia Cda S, Andrade CV, Breier AC, Ce J, Mello AS, Coelho JC. 2014. Determination of the lysosomal hydrolase activity in blood collected on filter paper, an alternative to screen high risk populations. *Gene* 536:344-347.
- Chamoles NA, Blanco M, Gaggioli D. 2001. Fabry disease: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. *Clin Chim Acta* 308:195-196.

- Chamoles NA, Blanco M, Gaggioli D, Casentini C. 2002. Gaucher and Niemann-Pick diseases-- enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper: retrospective diagnoses in newborn-screening cards. *Clin Chim Acta* 317:191-197.
- Childs B, Valle D, Jimenez-Sanchez G. 2013. The Inborn Error and Biochemical Individuality. In: Valle D, Beaudet AL, Vogelstein B, Kinzler KW, Antonarakis SE, Ballabio A, Gibson K, Mitchell G, editors. *OMMBID - The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*. New York: NY: McGraw-Hill.
- Civallero G, Michelin K, de Mari J, Viapiana M, Burin M, Coelho JC, Giugliani R. 2006. Twelve different enzyme assays on dried-blood filter paper samples for detection of patients with selected inherited lysosomal storage diseases. *Clin Chim Acta* 372:98-102.
- Daitx VV, Mezzalira J, Goldim MP, Coelho JC. 2012. Comparison between alpha-galactosidase A activity in blood samples collected on filter paper, leukocytes and plasma. *Clin Biochem* 45:1233-1238.
- de Castilhos CD, Mezzalira J, Goldim MP, Coelho JC. 2011. Influence of pre-analytical factors on alpha-galactosidase A, arylsulfatase B and alpha-glucosidase activities measured on dried blood spots on filter paper. *Clin Biochem* 44:922-926.
- De Jesus VR, Zhang XK, Keutzer J, Bodamer OA, Muhl A, Orsini JJ, Caggana M, Vogt RF, Hannon WH. 2009. Development and evaluation of quality control dried blood spot materials in newborn screening for lysosomal storage disorders. *Clin Chem* 55:158-164.
- Dean KJ, Sung SS, Sweeley CC. 1977. The identification of alpha-galactosidase B from human liver as an alpha-N-acetylgalactosaminidase. *Biochem Biophys Res Commun* 77:1411-1417.
- Dean KJ, Sweeley CC. 1979a. Studies on human liver alpha-galactosidases. I. Purification of alpha-galactosidase A and its enzymatic properties with glycolipid and oligosaccharide substrates. *J Biol Chem* 254:9994-10000.
- Dean KJ, Sweeley CC. 1979b. Studies on human liver alpha-galactosidases. II. Purification and enzymatic properties of alpha-galactosidase B (alpha-N-acetylgalactosaminidase). *J Biol Chem* 254:10001-10005.

- Desnick RJ, Allen KY, Desnick SJ, Raman MK, Bernlohr RW, Krivit W. 1973. Fabry's disease: enzymatic diagnosis of hemizygotes and heterozygotes. Alpha-galactosidase activities in plasma, serum, urine, and leukocytes. *J Lab Clin Med* 81:157-171.
- Desnick RJ, Brady R, Barranger J, Collins AJ, Germain DP, Goldman M, Grabowski G, Packman S, Wilcox WR. 2003. Fabry disease, an under-recognized multisystemic disorder: expert recommendations for diagnosis, management, and enzyme replacement therapy. *Ann Intern Med* 138:338-346.
- Desnick RJ, Ioannou YA, Eng CM. 2001. Alpha-galactosidase A deficiency: Fabry disease. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, editors. *The metabolic & molecular bases of inherited disease*, 8th ed. New York ; London: McGraw-Hill. p 3733-3774.
- Desnick RJ, Ioannou YA, Eng CM. 2013. α -Galactosidase A Deficiency: Fabry Disease. In: Valle D, Beaudet AL, Vogelstein B, Kinzler KW, Antonarakis SE, Ballabio A, Gibson K, Mitchell G, editors. *OMMBID - The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*. New York: NY: McGraw-Hill.
- Elstein D, Schachamov E, Beerli R, Altarescu G. 2012. X-inactivation in Fabry disease. *Gene* 505:266-268.
- Garman SC, Garboczi DN. 2004. The molecular defect leading to Fabry disease: structure of human alpha-galactosidase. *J Mol Biol* 337:319-335.
- Germain DP. 2010. Fabry disease. *Orphanet J Rare Dis* 5:30.
- Ho MW, Beutler S, Tennant L, O'Brien JS. 1972. Fabry's disease: evidence for a physically altered -galactosidase. *Am J Hum Genet* 24:256-266.
- Hoffmann B, Georg Koch H, Schweitzer-Krantz S, Wendel U, Mayatepek E. 2005. Deficient alpha-galactosidase A activity in plasma but no Fabry disease--a pitfall in diagnosis. *Clin Chem Lab Med* 43:1276-1277.
- Hwu WL, Chien YH, Lee NC, Chiang SC, Dobrovolny R, Huang AC, Yeh HY, Chao MC, Lin SJ, Kitagawa T, Desnick RJ, Hsu LW. 2009. Newborn screening for Fabry disease in Taiwan reveals a high incidence of the later-onset GLA mutation c.936+919G>A (IVS4+919G>A). *Hum Mutat* 30:1397-1405.

- Ishii S, Chang HH, Kawasaki K, Yasuda K, Wu HL, Garman SC, Fan JQ. 2007. Mutant alpha-galactosidase A enzymes identified in Fabry disease patients with residual enzyme activity: biochemical characterization and restoration of normal intracellular processing by 1-deoxygalactonojirimycin. *Biochem J* 406:285-295.
- Jimenez-Sanchez G, Childs B, Valle D. 2013. The Effect of Mendelian Disease on Human Health. In: Valle D, Beaudet AL, Vogelstein B, Kinzler KW, Antonarakis SE, Ballabio A, Gibson K, Mitchell G, editors. *OMMBID - The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*. New York: NY: McGraw-Hill.
- Kalkan Ucar S, Sozmen E, Duman S, Basci A, Coker M. 2012. Alpha-galactosidase A activity levels in Turkish male hemodialysis patients. *Ther Apher Dial* 16:560-565.
- Kint JA. 1970. Fabry's disease: alpha-galactosidase deficiency. *Science* 167:1268-1269.
- Kornfeld S. 1987. Trafficking of lysosomal enzymes. *FASEB J* 1:462-468.
- Kusiak JW, Quirk JM, Brady RO. 1978. Purification and properties of the two major isozymes of alpha-galactosidase from human placenta. *J Biol Chem* 253:184-190.
- Lampe C, Bellettato CM, Karabul N, Scarpa M. 2013. Mucopolysaccharidoses and other lysosomal storage diseases. *Rheum Dis Clin North Am* 39:431-455.
- Lee K, Jin X, Zhang K, Copertino L, Andrews L, Baker-Malcolm J, Geagan L, Qiu H, Seiger K, Barngrover D, McPherson JM, Edmunds T. 2003. A biochemical and pharmacological comparison of enzyme replacement therapies for the glycolipid storage disorder Fabry disease. *Glycobiology* 13:305-313.
- Lin HY, Chong KW, Hsu JH, Yu HC, Shih CC, Huang CH, Lin SJ, Chen CH, Chiang CC, Ho HJ, Lee PC, Kao CH, Cheng KH, Hsueh C, Niu DM. 2009. High incidence of the cardiac variant of Fabry disease revealed by newborn screening in the Taiwan Chinese population. *Circ Cardiovasc Genet* 2:450-456.
- Linthorst GE, Vedder AC, Aerts JM, Hollak CE. 2005. Screening for Fabry disease using whole blood spots fails to identify one-third of female carriers. *Clin Chim Acta* 353:201-203.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.

- Lukacs Z, Nieves Cobos P, Keil A, Hartung R, Mengel E, Beck M, Deschauer M, Hanisch F, Santer R. 2011. Dried blood spots in the diagnosis of lysosomal storage disorders--possibilities for newborn screening and high-risk population screening. *Clin Biochem* 44:476.
- Lukas J, Giese AK, Markoff A, Grittner U, Kolodny E, Mascher H, Lackner KJ, Meyer W, Wree P, Saviouk V, Rolfs A. 2013. Functional characterisation of alpha-galactosidase a mutations as a basis for a new classification system in fabry disease. *PLoS Genet* 9:e1003632.
- 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* 50:142-162.
- Mandelli J, Wajner A, Pires R, Giugliani R, Coelho JC. 2001. Detection of mucopolysaccharidosis type I heterozygotes on the basis of the biochemical properties of plasma alpha-L-iduronidase. *Clin Chim Acta* 312:81-86.
- Mandelli J, Wajner A, Pires RF, Giugliani R, Coelho JC. 2002. Detection of mucopolysaccharidosis type I heterozygotes based on the biochemical characteristics of leukocyte alpha-L-iduronidase. *Arch Med Res* 33:20-24.
- Mayes JS, Scheerer JB, Sifers RN, Donaldson ML. 1981. Differential assay for lysosomal alpha-galactosidases in human tissues and its application to Fabry's disease. *Clin Chim Acta* 112:247-251.
- Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. 1999. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA* 281:249-254.
- Michelin K, Wajner A, Bock H, Fachel A, Rosenberg R, Pires RF, Pereira ML, Giugliani R, Coelho JC. 2005. Biochemical properties of beta-glucosidase in leukocytes from patients and obligated heterozygotes for Gaucher disease carriers. *Clin Chim Acta* 362:101-109.
- Michelin K, Wajner A, Goulart Lda S, Fachel AA, Pereira ML, de Mello AS, Souza FT, Pires RF, Giugliani R, Coelho JC. 2004. Biochemical study on beta-glucosidase in individuals with Gaucher's disease and normal subjects. *Clin Chim Acta* 343:145-153.
- Muller KB, Rodrigues MD, Pereira VG, Martins AM, D'Almeida V. 2010. Reference values for lysosomal enzymes activities using dried blood spots samples - a Brazilian experience. *Diagn Pathol* 5:65.

- Nakamura K, Hattori K, Endo F. 2011. Newborn screening for lysosomal storage disorders. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 157:63-71.
- Olivova P, van der Veen K, Cullen E, Rose M, Zhang XK, Sims KB, Keutzer J, Browning MF. 2009. Effect of sample collection on alpha-galactosidase A enzyme activity measurements in dried blood spots on filter paper. *Clin Chim Acta* 403:159-162.
- Pasqualim G, Simon L, Sperb-Ludwig F, Burin MG, Michelin-Tirelli K, Giugliani R, Matte U. 2014. Fabry disease: A new approach for the screening of females in high-risk groups. *Clin Biochem.*
- Pastores GM, Maegawa GH. 2013. Clinical neurogenetics: neuropathic lysosomal storage disorders. *Neurol Clin* 31:1051-1071.
- Pollitt RJ, Green A, McCabe CJ, Booth A, Cooper NJ, Leonard JV, Nicholl J, Nicholson P, Tunaley JR, Virdi NK. 1997. Neonatal screening for inborn errors of metabolism: cost, yield and outcome. *Health Technol Assess* 1:i-iv, 1-202.
- Rietra PJ, Van den Bergh FA, Tager JM. 1975. Properties of the residual alpha-galactosidase activity in the tissues of a Fabry hemizygote. *Clin Chim Acta* 62:401-413.
- Rodrigues MD, de Oliveira AC, Muller KB, Martins AM, D'Almeida V. 2009. Chitotriosidase determination in plasma and in dried blood spots: a comparison using two different substrates in a microplate assay. *Clin Chim Acta* 406:86-88.
- Sakuraba H, Murata-Ohsawa M, Kawashima I, Tajima Y, Kotani M, Ohshima T, Chiba Y, Takashiba M, Jigami Y, Fukushige T, Kanzaki T, Itoh K. 2006. Comparison of the effects of agalsidase alfa and agalsidase beta on cultured human Fabry fibroblasts and Fabry mice. *J Hum Genet* 51:180-188.
- Sanchez-Nino MD, Sanz AB, Carrasco S, Saleem MA, Mathieson PW, Valdivielso JM, Ruiz-Ortega M, Egido J, Ortiz A. 2011. Globotriaosylsphingosine actions on human glomerular podocytes: implications for Fabry nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 26:1797-1802.
- Schram AW, Hamers MN, Tager JM. 1977. The identity of alpha-galactosidase B from human liver. *Biochim Biophys Acta* 482:138-144.

- Scriver CR. 2008. Garrod's Croonian Lectures (1908) and the charter 'Inborn Errors of Metabolism': albinism, alkaptonuria, cystinuria, and pentosuria at age 100 in 2008. *J Inherit Metab Dis* 31:580-598.
- Skoog WA, Beck WS. 1956. Studies on the fibrinogen, dextran and phytohemagglutinin methods of isolating leukocytes. *Blood* 11:436-454.
- Sopelsa AM, Severini MH, Da Silva CM, Tobo PR, Giugliani R, Coelho JC. 2000. Characterization of beta-galactosidase in leukocytes and fibroblasts of GM1 gangliosidosis heterozygotes compared to normal subjects. *Clin Biochem* 33:125-129.
- Spada M, Pagliardini S, Yasuda M, Tukul T, Thiagarajan G, Sakuraba H, Ponzzone A, Desnick RJ. 2006. High incidence of later-onset fabry disease revealed by newborn screening. *Am J Hum Genet* 79:31-40.
- Staretz-Chacham O, Lang TC, LaMarca ME, Krasnewich D, Sidransky E. 2009. Lysosomal storage disorders in the newborn. *Pediatrics* 123:1191-1207.
- Sweeley CC, Klionsky B. 1963. Fabry's Disease: Classification as a Sphingolipidosis and Partial Characterization of a Novel Glycolipid. *J Biol Chem* 238:3148-3150.
- Terryn W, Poppe B, Wuyts B, Claes K, Maes B, Verbeelen D, Vanholder R, De Boeck K, Lameire N, De Paepe A, De Schoenmakere G. 2008. Two-tier approach for the detection of alpha-galactosidase A deficiency in a predominantly female haemodialysis population. *Nephrol Dial Transplant* 23:294-300.
- Vedder AC, Linthorst GE, van Breemen MJ, Groener JE, Bemelman FJ, Strijland A, Mannens MM, Aerts JM, Hollak CE. 2007. The Dutch Fabry cohort: diversity of clinical manifestations and Gb3 levels. *J Inherit Metab Dis* 30:68-78.
- Wajner A, Michelin K, Burin MG, Pires RF, Pereira ML, Giugliani R, Coelho JC. 2004. Biochemical characterization of chitotriosidase enzyme: comparison between normal individuals and patients with Gaucher and with Niemann-Pick diseases. *Clin Biochem* 37:893-897.
- Wajner A, Michelin K, Burin MG, Pires RF, Pereira ML, Giugliani R, Coelho JC. 2007. Comparison between the biochemical properties of plasma chitotriosidase from normal individuals and from patients with Gaucher disease, GM1-gangliosidosis, Krabbe disease and heterozygotes for Gaucher disease. *Clin Biochem* 40:365-369.

- Watts RW. 2003. A historical perspective of the glycosphingolipids and sphingolipidoses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358:975-983.
- Wenger DA, Coppola S, Liu SL. 2003. Insights into the diagnosis and treatment of lysosomal storage diseases. *Arch Neurol* 60:322-328.
- Wilcox WR. 2004. Lysosomal storage disorders: the need for better pediatric recognition and comprehensive care. *J Pediatr* 144:S3-14.
- Winchester B, Young E. 2006. Biochemical and genetic diagnosis of Fabry disease.
- Wittmann J, Karg E, Turi S, Legnini E, Wittmann G, Giese AK, Lukas J, Golnitz U, Klingenhager M, Bodamer O, Muhl A, Rolfs A. 2012. Newborn screening for lysosomal storage disorders in hungary. *JIMD Rep* 6:117-125.
- Wood S, Nadler HL. 1972. Fabry's disease: absence of an -galactosidase isozyme. *Am J Hum Genet* 24:250-255.
- Young E, Mills K, Morris P, Vellodi A, Lee P, Waldek S, Winchester B. 2005. Is globotriaosylceramide a useful biomarker in Fabry disease? *Acta Paediatr Suppl* 94:51-54; discussion 37-58.

8. ANEXOS

8.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Único

Você está sendo convidado a participar de um trabalho intitulado *“Alfa-galactosidase A: Estudo das Propriedades Bioquímicas em Sangue Impregnado em Papel Filtro, Plasma e Leucócitos de Pacientes com Doença de Fabry e Indivíduos Normais”*, cujo objetivo é caracterizar a enzima alfa-galactosidase A. Ao estudar esta enzima, esperamos melhorar a diferenciação entre pacientes com Doença de Fabry e indivíduos normais e, assim, aprimorar e verificar a eficiência de técnicas de triagem e diagnóstico para doença de Fabry. Essa doença é causada pela deficiência da enzima alfa-galactosidase A (tema principal deste estudo) e seu diagnóstico é realizado através da medida da atividade dessa enzima em amostras de indivíduos com suspeita da doença.

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 (UFRGS). Os pesquisadores responsáveis pelo estudo são a profa. Dra. Janice Carneiro Coelho e a mestranda Vanessa Vitcoski Daitx 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, o projeto aqui referido foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS e a secretaria do mesmo, telefone (51) 33083629, 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 somente 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 consequências por parte dos pesquisadores. No caso de aceite, fica claro que não haverá benefício financeiro pela sua participação.

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.

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: Vanessa Vitcoski Daitx

Assinatura Pesquisador Responsável

Assinatura Voluntário

8.2 Parecer com aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa – UFRGS

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Universidade Federal do Rio Grande do Sul / Pró-Reitoria de Pesquisa - PROPESQ

PROJETO DE PESQUISA

Título: ESTUDO DAS PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS DA ALFA-GALACTOSIDASE A

Área Temática:

Pesquisador: Janice Carneiro Coelho

Versão: 2

Instituição: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CAAE: 05128312.4.0000.5347

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 78077

Data da Relatoria: 09/08/2012

Apresentação do Projeto:

O projeto encontra-se adequadamente descrito.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivos adequados e bem descritos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os benefícios que poderão advir desta pesquisa já estavam claros e adequadamente descritos na versão anterior do projeto. Na versão atual, modificada, os riscos foram apresentados como se segue: "Está sendo solicitada a doação de 9mL de sangue periférico. O desconforto causado será somente 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 consequências por parte dos pesquisadores. No caso de aceite, fica claro que não haverá benefício financeiro pela sua participação (tendo sido eliminada a frase: nem riscos ou prejuízos à saúde). Observa-se, também, apresentação do CLE em uma linguagem mais acessível ao participante doador.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Sem comentários.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A maior parte dos termos de apresentação obrigatória está anexada.

Recomendações:

Adequado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Adequado.

Situação do Parecer:

Aprovado



8.3 Termo de concordância - Banco de Sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Porto Alegre, 11 de maio 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 24 amostras de sangue contendo 10 ml cada, para a realização do projeto “Alfa-galactosidase A: Estudo das propriedades bioquímicas em sangue impregnado em papel filtro, plasma e leucócitos de pacientes com doença de Fabry e indivíduos normais.” que será desenvolvido pela mestrandia Vanessa Vitcoski Daitx 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 às 8h da manhã e na quantidade de 5 de cada vez, a fim de melhor atender o cronograma do projeto.

Atenciosamente,



Profª Janice Carneiro Coelho
Departamento de Bioquímica – ICBS – UFRGS

concordo e autorizo 06/06/2012

Responsável pelo Serviço de Hemoterapia do HCPA

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

8.4 Artigo submetido à *Clinica Chimica Acta*

Adding ORCID to Co-Authored submission

Clinica Chimica Acta <esubmissionsupport@elsevier.com>

2 de abr

para mim ▾

Dear Dr. Vanessa Daitx,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: **Clinica Chimica Acta**

Title: Comparing the alpha-galactosidase A biochemical properties from healthy individuals and Fabry disease patients

Corresponding Author: Janice Coelho

Co-Authors: Vanessa V Daitx, MSc; Jamila Mezzalira, MSc; Vitoria C Moraes, Student; Ana Carolina Breier, PhD; Jaqueline Cé, MSc;

We would like to invite you to link your ORCID to this submission. If the submission is accepted, then your ORCID will be transferred to ScienceDirect and CrossRef and will be updated on your ORCID account.

To go to a dedicated page in EES where you can link an existing ORCID, or sign-up for an ORCID, please click the following link:

<http://ees.elsevier.com/cca/l.asp?i=64360&l=71HYKKNQ>

Please note: If you did not co-author this submission, please do not follow the above link but instead contact the Corresponding Author of this submission at janice.coelho@ufrgs.br.

What is ORCID?

"ORCID is an open, non-profit, community-based effort to create and maintain a registry of unique researcher identifiers and a transparent method of linking research activities and outputs to these identifiers."

<http://www.ORCID.org>

More information on ORCID can be found on the ORCID website, <http://www.ORCID.org>, or on our ORCID help page: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/2210/p/7923

Thank you,

Clinica Chimica Acta

8.4 Artigo submetido à *Clinical Biochemistry*

Adding ORCID to Co-Authored submission

CLB (ELS) <clbi@elsevier.com>

7 de abr

para mim ▾

Dear Dr. Vanessa Daitx,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: **Clinical Biochemistry**

Title: Effect of N-acetylgalactosamine on alpha-galactosidase A activity in dried blood spot, plasma, and leukocytes from Fabry disease patients and healthy individuals

Corresponding Author: Janice Coelho

Co-Authors: Vanessa V Daitx, MSc; Jamila Mezzalira, MSc; Vitoria C Moraes, Student; Ana Carolina Breier, PhD; Jaqueline Cé, MSc;

We would like to invite you to link your ORCID to this submission. If the submission is accepted, then your ORCID will be transferred to ScienceDirect and CrossRef and will be updated on your ORCID account.

To go to a dedicated page in EES where you can link an existing ORCID, or sign-up for an ORCID, please click the following link:

<http://ees.elsevier.com/clb/l.asp?i=69537&l=02L6RQOC>

Please note: If you did not co-author this submission, please do not follow the above link but instead contact the Corresponding Author of this submission at janice.coelho@ufrgs.br.

What is ORCID?

"ORCID is an open, non-profit, community-based effort to create and maintain a registry of unique researcher identifiers and a transparent method of linking research activities and outputs to these identifiers."

<http://www.ORCID.org>

More information on ORCID can be found on the ORCID website, <http://www.ORCID.org>, or on our ORCID help page: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/2210/p/7923

Thank you,

Clinical Biochemistry