

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

**DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE HIDROLASES  
LISOSSÔMICAS EM SANGUE COLHIDO EM PAPEL FILTRO,  
UMA ALTERNATIVA PARA TRIAGEM EM POPULAÇÕES DE  
ALTO RISCO**

---

Cristina Dickie de Castilhos

**Tese de Doutorado**

Porto Alegre, 2011

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

**DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE HIDROLASES  
LISOSSÔMICAS EM SANGUE COLHIDO EM PAPEL FILTRO,  
UMA ALTERNATIVA PARA TRIAGEM EM POPULAÇÕES DE  
ALTO RISCO**

---

Cristina Dickie de Castilhos

**Orientador: Prof. Dra. Janice Carneiro Coelho**

**Porto Alegre, 2011**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas –  
Bioquímica, como requisito para a obtenção do grau de DOUTOR EM  
BIOQUÍMICA

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dra. Janice Carneiro Coelho pelo estímulo, confiança, paciência, ensinamentos e discussões científicas.

Aos meus bolsistas de iniciação científica Mariana P. S. Goldim, Frederico W. Guevara e Jamila Mezzalira pela dedicação, disponibilidade e trabalho executado nas diferentes etapas e áreas desta tese.

Aos tantos amigos que fiz e mantive no convívio do laboratório 25 durante esse período, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vera Maria Treis Trindade, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Magdolna, Alexandre, Viviane, Franciane, Vanessa, Cristina, Carla, Maria Inês, Daniela, Ana, Fernando e tantos outros.

Aos professores, colegas e funcionários do Departamento de Bioquímica da UFRGS pelo ambiente estimulante e pelo convívio.

Ao Banco de Sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo fornecimento de amostras controle.

A Giovana, Ana Paula e a todas as ex-colegas de trabalho e familiares pelo fornecimento de amostras durante o projeto piloto.

A equipe do Serviço de Genética Médica, pelos primeiros experimentos no Laboratório de Doenças Lisossômicas de Depósito. Especialmente a Dra. Maira Burim, Fernanda Bender, Jurema De Mari e Marli Viapiana.

A equipe do GPPG/HCPA pela oportunidade de trabalhar em pesquisa profissionalmente.

Aos orientadores e colegas do Projeto ELSA-RS pelo estímulo, apoio e perspectivas futuras.

Aos meus pais pela fé, estímulo, amor e ajuda inesgotável na rotina familiar.

Aos meus irmãos e famílias, aos meus sogros e todos os familiares pelo interesse, estímulo e ajuda nesta etapa de minha formação.

Ao amor da minha vida, Altair, por me apoiar e estimular na concretização de todos os meus sonhos. Aos meus filhos, Julio Augusto e Pietro pelos momentos de pura descontração e amor, inerentes a uma vida plena e produtiva.

Ao CNPq e ao GPPG/HCPA, pelo apoio financeiro.

## ÍNDICE

AGRADECIMENTOS .....	iii
PARTE I .....	7
RESUMO .....	8
ABSTRACT .....	9
I. INTRODUÇÃO.....	10
II. OBJETIVOS.....	20
Objetivo Geral.....	20
Capítulo I: .....	20
Capítulo II: .....	21
Capítulo III .....	21
PARTE II .....	22
III. MÉTODOS E RESULTADOS .....	23
III.1 CAPÍTULO 1.....	23
Effect of sample collection, temperature and time of storage on $\beta$ -galactosidase and total hexosaminidase activities in dried blood on filter paper .....	23
III.2 CAPÍTULO 2.....	42
Influence of pre-analytical factors on alpha-galactosidase A, arylsulfatase B and alpha-glucosidase activities measured on dried blood spots on filter paper .....	42
III.3 CAPÍTULO 3.....	64
Determinação da atividade de hidrolases lisossômicas em sangue colhido em papel filtro, uma alternativa para triagem em populações de alto risco.....	64

PARTE III .....	81
IV.DISSCUSSÃO.....	82
V. CONCLUSÕES.....	90
Conclusão Geral.....	90
Capítulo I: .....	90
Capítulo II: .....	91
Capítulo III .....	92
VI. PERSPECTIVAS .....	93
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94
VIII. ANEXOS .....	98
VIII.1 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	98
VIII.2 LISTA DE ABREVIATURAS .....	100
VIII.3 LISTA DE FIGURAS .....	101
VIII.4 LISTA DE TABELAS .....	102

## PARTE I

## RESUMO

As doenças lisossômicas de depósito (DLD) são erros inatos do metabolismo causadas pela deficiência de uma proteína, normalmente uma enzima, que resulta no depósito de lipídios nos lisossomos. Neste trabalho, nos propusemos a avaliar uma metodologia para a investigação bioquímica das DLDs. Amostras em papel filtro apresentam um menor volume de sangue coletado e uma maior facilidade quanto ao transporte e acondicionamento. Tivemos por objetivos estabelecer fatores pré-analíticos em amostras de sangue em papel filtro (SPF) tais como: efeito de anticoagulantes, temperatura de armazenamento e estabilidade ao longo do tempo para as enzimas b-galactosidase (b-gal), hexosaminidase total (Hex t), alfa-galactosidase (GLA), arilsulfatase B (ASB) e alfa-glicosidase (GAA). Também foi realizada a miniaturização e a correlação das metodologias em estudo. Descrevemos ainda nossa experiência no rastreamento das DLD em SPF em uma população de alto risco. Amostras de sangue de indivíduos normais (controles) foram coletadas em tubos com anticoagulantes EDTA, heparina, ou diretamente impregnados em papel filtro e armazenadas em diferentes temperaturas (-20, 4, 25 e 37°C) e tempos (3, 10, 17 e 180 dias). Através da determinação da atividade enzimática em SPF por técnicas fluorométricas chegamos aos seguintes resultados: não houve diferença significativa entre os diferentes métodos de coleta do estudo para nenhuma das enzimas pesquisadas. Com relação ao efeito da temperatura e do tempo foi possível determinar que aos três dias de armazenamento, em todas as temperaturas estudadas e para todas as enzimas, as atividades permaneceram estáveis. A partir deste tempo cada enzima demonstrou um efeito diferente ao longo do tempo para as diversas temperaturas estudadas. Existem aquelas que não sofrem variação em sua atividade até 180 dias de armazenamento nas temperaturas estudadas (Hex t e GLA), aquelas que só vão diminuir sua atividade aos 180 dias em todas as temperaturas (ASB) ou somente a 37°C (b-gal) ou ainda aquela que diminui constantemente sua atividade a partir de 10 dias de armazenamento em todas as temperaturas (GAA). Se o objetivo for medir a atividade de todas as enzimas no mesmo papel filtro, então o melhor será armazenar o papel filtro por no máximo 10 dias em qualquer uma das temperaturas estudadas. Este tempo pode ser estendido até 180 dias em qualquer das temperaturas se formos analisar somente as atividades enzimáticas da Hex t, GLA e b-gal. O estudo de correlação das amostras de papel filtro de 1,2mm e 3mm de diâmetro para as enzimas alfa-galactosidase, arilsulfatase B e alfa-glicosidase resultou nos coeficientes 0,994; 0,900 e 0,957; respectivamente. Isto demonstra que podemos diminuir o picote de papel sem perda da qualidade do ensaio. Por fim realizamos um rastreamento para as doenças de Pompe, Fabry, Mucopolissacaridose I e VI em 205 amostras de pacientes de alto risco, onde foi observado uma frequência de 2,9% para estas DLDs após a utilização da metodologia pesquisada. Nossos resultados mostram a viabilidade na medida da atividade enzimática em SPF, o que facilita a coleta, envio e armazenamento das amostras para a triagem destas doenças lisossômicas.



## ABSTRACT

Lysosomal storage diseases (LSD) are inborn errors of metabolism caused by deficiency of a protein, usually an enzyme, which results in storage of lipids in lysosomes. In this work, we have proposed a methodology for the biochemical investigation of LSD. Dried blood spot samples on filter paper (DBS) have a lower volume of blood collected and ease about the transport and storage. The aims of the study for pre-analytical factors on DBS were: to investigate the effect of anticoagulants, storage temperature and stability over time for the enzymes b-galactosidase (b-gal), total hexosaminidase (Hex t), alpha-galactosidase (GLA), arylsulfatase B (ASB) and alpha-glucosidase (GAA). We also made the miniaturization and the correlation of the methodologies under study. Also describe our experience in LSD screening on DBS in a high-risk population. Blood samples from normal individuals (controls) were collected in tubes with anticoagulant EDTA, heparin, either directly impregnated on filter paper and stored at different temperatures (-20, 4, 25 and 37°C) and times (3, 10, 17 and 180 days). The enzymatic activities in DBS were determined by fluorometric techniques and we achieved the following results: no significant difference between the different collection methods was observed for any of the enzymes. Regarding the effect of temperature and time it was determined that the three days of storage at all temperatures studied and for all the enzymes, the activity remained stable. From this time each enzyme showed a different effect over time for various temperatures. There are enzymes that do not suffer variations in their activity until 180 days of storage at temperatures studied (t-Hex and GLA), there are those that will slow down their activity after 180 days at all temperatures only (ASB) or only at 37°C (b-gal ) or only that is constantly decreasing its activity after 10 days of storage at all temperatures (GAA). If the goal is to measure the activity of all enzymes in the same DBS, then it is best to store the DBS for a maximum of 10 days in any of the temperatures studied. This time can be extended to 180 days in any of the temperatures if we consider only the enzymatic activities of t-Hex, GLA and b-gal. The correlation study of samples of DBS of 1.2 mm and 3 mm in diameter for the enzyme GLA, ASB and GAA resulted in the coefficients 0.994, 0.900 and 0.957, respectively. This shows that we can decrease the paper punch without losing the quality of the test. Finally we performed a screening for Pompe disease, Fabry disease, Mucopolysaccharidosis I and VI in 205 samples of DBS of high-risk patients. This screening revealed a frequency of 2.9% of these LSD after using the methodology researched. Our results demonstrated the feasibility for measurement of enzymatic activity in DBS, which facilitates the collection, sending and storage of samples for the screening of these lysosomal disorders.

## I. INTRODUÇÃO

Os erros inatos do metabolismo (EIM) foram conceituados por Sir Archibald Garrod, em 1908, observando inicialmente quatro doenças; a alcaptonúria, a cistinúria, a pentosúria e o albinismo (Scriver *et al.*, 2001). Garrot observou que cada uma destas condições, embora benignas para toda a vida, geralmente crônicas, não melhoravam com o tratamento disponível da época e respeitavam os princípios mendelianos para herança recessiva (Scriver *et al.*, 2001).

O interesse de pediatras pelo estudo dos EIM foi crescente e o surgimento de novas técnicas possibilitou novos diagnósticos que impulsionaram ainda mais as pesquisas na área do metabolismo (Wilcox, 2004).

Já foram descritos mais de 500 EIM, a maioria deles envolvendo processos de síntese, degradação, transporte ou armazenamento de moléculas no organismo (Scriver *et al.*, 2001). Os Erros Inatos do Metabolismo são doenças raras se analisadas individualmente, mas em seu conjunto afetam aproximadamente 1 a cada 500 a 1000 nascidos vivos (Baric *et al.*, 2001). Em dois estudos que descrevem dados importantes da América do Sul (Chamoles *et al.*, 1994; Coelho *et al.*, 1997) a frequência encontrada foi de aproximadamente 6,5% de afetados dentro de populações de alto risco.

Segundo Saudubray e Charpentier (2001), os EIM podem ser classificados em duas grandes categorias:

Categoria 1 – afetam apenas um órgão ou sistema.

Categoria 2 – afetam uma via metabólica comum a diversos órgãos.

Nesta segunda categoria estão incluídas as Doenças Lisossômicas de Depósito (DLDs).

Os lisossomos são compartimentos celulares responsáveis, entre outras funções, pela degradação de macromoléculas através de enzimas contidas em seu interior. Quando existe um defeito em uma destas enzimas, em seu transporte ou em proteínas que modulam sua atividade, produz-se um acúmulo lisossomal de macromoléculas ou de intermediários metabólicos, conhecido como Doença Lisossômica de Depósito (Alberts *et al.*, 1994; Mueller *and* Young, 2001). Existem mais de 50 enzimas lisossômicas incluindo proteases, nucleases, glicosilases, lipases, fosfolipases, etc. São todas hidrolases ácidas que tem uma atividade ótima em pH entre 4 e 5 na luz lisossomal (Alberts *et al.*, 1994; Desnick *and* Schuchman, 2002).

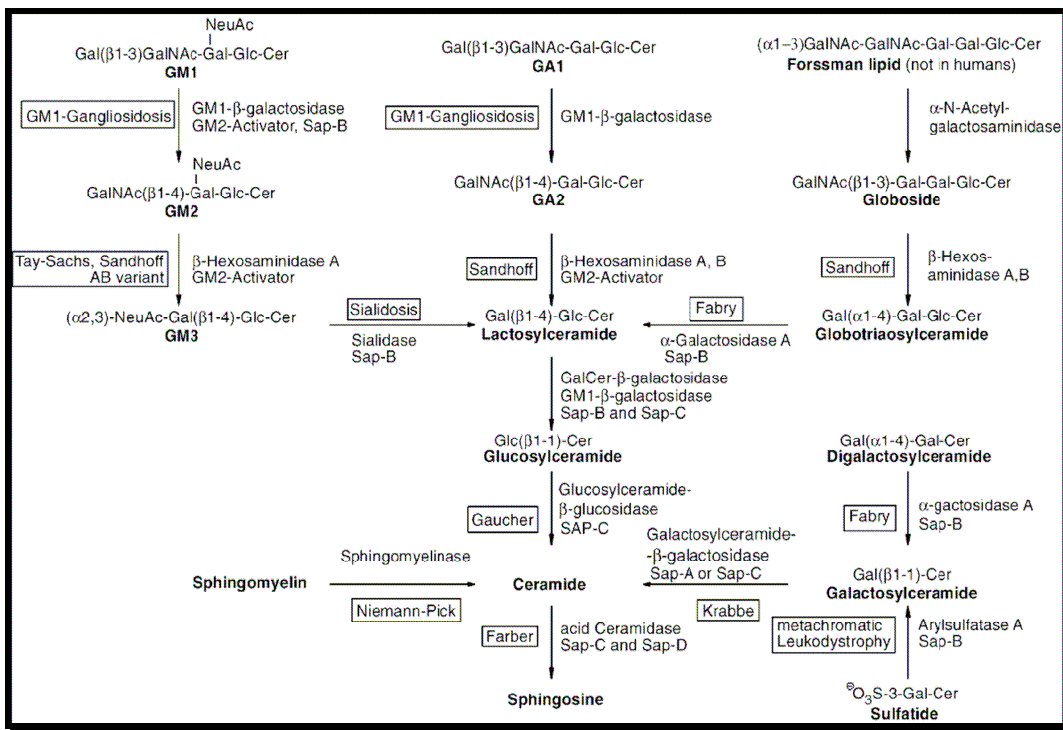
Atualmente são descritas em torno de 50 DLDs, na maioria autossômicas recessivas, com exceção da Doença de Fabry, de Danon e da Doença de Hunter (Mucopolissacaridose tipo II), que têm herança recessiva ligada ao cromossomo X (Wilcox, 2004).

Diversos dados sobre a incidência das DLD são descritos variando entre 7 a 45:100.000 nascimentos (Meikle *et al.*, 1999; Poorthuis *et al.*, 1999; Applegarth *et al.*, 2000; Schulze *et al.*, 2003; Sanderson *et al.*, 2006; Dionisi-Vici *et al.*, 2006; Meikle *et al.*, 2006; Moammar *et al.*, 2010). No Brasil a frequência relativa de DLD encontrada em uma população de alto risco foi de 59,8% (Coelho *et al.*, 1997). Acredita-se que com a possibilidade de diagnóstico em larga escala, as incidências venham a ter valores mais próximos da realidade.

As DLDs dividem-se em cinco grupos, de acordo com a principal substância acumulada: esfingolipidoses, mucopolissacaridoses,

glicoproteínes, mucopolídoses e outras DLDs (Karam *et al.*, 2001). Destacamos neste trabalho, cinco doenças sendo três esfingolípídoses, a Doença de Fabry, a Gangliosidose GM1 e a Gangliosidose GM2; uma mucopolissacaridose, a Doença de Marotoux-Lamy (MPS VI) e uma glicogenose, a Doença de Pompe.

As esfingolípídoses, as quais podem ser vistas na figura 1, são decorrentes do acúmulo de algum tipo de lipídio pertencente à rota de degradação dos esfingolípídios.



**Figura 1.** Degradação de glicosfingolípídios nos lisossomos humanos: enzimas envolvidas e enzimas relacionadas às doenças de depósito.

Fonte: Kolter *and* Sandhorff, 2006.

A Doença de Fabry está relacionada com o defeito no gene GLA, localizado no cromossomo X na região Xq-21.33 Xq-22 que já foi completamente seqüenciado (Kornreich *et al.*, 1989). Devido a mutações neste gene, a enzima lisossômica  $\alpha$ -galactosidase A (GLA) apresenta atividade diminuída ou ausente, resultando na deposição de glicosfingolipídios nos lisossomos de muitos tipos de células. Este acúmulo é o responsável pelo aparecimento de sinais precoces, na infância ou adolescência de hemizigotos masculinos: dor nas extremidades (acroparestesias), aparecimento de lesões cutâneas (angioqueratomas) e hipoidrose. Em alguns casos os sinais e sintomas podem ser mais tardios, aparecendo somente na segunda ou terceira década de vida (Desnick *et al.*, 2001). Em função do modo de herança, todos os homens são detectados através da diminuição da atividade enzimática da GLA em plasma, leucócitos ou fibroblastos cultivados. Em contraste, mulheres com a DF podem ter atividade normal da enzima o que pode dificultar o diagnóstico. Testes de biologia molecular são os mais indicados para a triagem e o diagnóstico, em mulheres com suspeita de DF, embora exista heterogeneidade nas mutações responsáveis pela deficiência enzimática, aumentando ainda mais os custos de investigação (Shabbeer *et al.*, 2002). A incidência estimada desta doença é entre 1:40.000 – 1:60.000 indivíduos do sexo masculino e sabe-se que é pan-étnica (Wozniak *et al.*, 2010).

A Gangliosidose GM1 é causada pela deficiência da enzima  $\beta$ -galactosidase, sendo uma doença rara, mas com uma frequência de 1:17.000 nascidos vivos no sul do Brasil (Severini *et al.*, 1999). É classificada em três subtipos de acordo com a idade de início dos sintomas e a gravidade das manifestações clínicas: a forma infantil ou tipo 1, a forma juvenil ou tipo 2 e a

forma adulta ou tipo 3. Clinicamente os pacientes apresentam graus variáveis de neurodegeneração e anormalidades esqueléticas, sendo que existe uma correlação inversa entre a gravidade da doença e a atividade residual da enzima (Suzuki *et al.*, 2001). A deficiência da enzima  $\beta$ -galactosidase é expressa clinicamente em três diferentes doenças: Gangliosidose GM1, Doença de Morquio B (mucopolissacaridose IV B) e Galactosialidose. Esta última, diferente das outras, é caracterizada pela deficiência secundária da  $\beta$ -galactosidase devido a falta da proteína protetora Catepsina A que confere estabilidade à enzima madura (Suzuki *et al.*, 2001). Optamos por trabalhar com a Gangliosidose GM1 em virtude da alta frequência em nossa região.

A Gangliosidose GM2 é um grupo de doenças causadas pelo acúmulo lisossomal de gangliosídeo GM2, entre outros glicolipídios, particularmente nas células neuronais. A hidrólise enzimática do gangliosídeo GM2 requer duas isoenzimas da  $\beta$ -hexosaminidase: a hexosaminidase A, constituída de duas subunidades  $\alpha$  e duas  $\beta$  e a hexosaminidase B, um homodímero de subunidades  $\beta$ . Os principais tipos de Gangliosidose GM2 são:

1. doença de Tay-Sachs e suas variantes, onde existe a deficiência da hexosaminidase A devido a mutações na subunidade alfa desta enzima;
2. doença de Sandhoff e suas variantes, onde a deficiência das hexosaminidases A e B são devido a mutações patogênicas no gene que codifica a subunidade beta dessas enzimas.

3. deficiência do cofator GM2 - Variante AB é caracterizada pela disfunção do complexo ativador GM2 mesmo com as hexosaminidases A e B íntegras.

Estas doenças têm ocorrência nas fases infantil, juvenil e adulta, sendo que as mais comuns são as de forma infantil. A doença de Tay-Sachs está presente quase que exclusivamente em judeus Ashkenazi levando a deterioração psicomotora e macrocefalia progressiva a partir do sexto mês de vida. Já na doença de Sandhoff, além do quadro neurológico, os pacientes apresentam hepatoesplenomegalia e alterações ósseas. Leucócitos e plasma são as amostras mais freqüentemente utilizadas para a determinação da atividade das hexosaminidases (Chamoles *et al.*, 2002). Neste trabalho realizamos a análise da hexosaminidase total, que determina, quando deficiente, o diagnóstico da doença de Sandhoff.

As mucopolissacaridoses (MPS) são DLDs causadas pela deficiência de qualquer uma das enzimas envolvidas na degradação dos glicosaminoglicanos (GAGs) (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação das MPS: enzimas envolvidas e GAGs relacionados às doenças de depósito

Tipo de enzima	Sigla	GAGs	Epônimo
Deficiente MPS		Acumulados	
I $\alpha$ -L-iduronidase	IDUA	ds/hs	Hurler Hurler-Scheie Scheie
II Iduronato-L-sulfatase	IDS	ds/hs	Hunter
IIIA heparan-N-sulfatase	SGSH	hs	
IIIB $\alpha$ -N-acetilglicosaminidase	NAGLU	hs	Sanfilippo
IIIC AcCoA: $\alpha$ -glicosamina Acetiltransferase	GNAT	hs	
IIID N-acetilglicosamina 6-sulfatase	G6S	hs	
IVA Galactose 6-sulfatase	GALNS	qs	Morquio
IVB $\beta$ -galactosidase	GLB1	qs	
VI N-acetilgalactosamina 4-sulfatase	ARSB	ds	Maroteaux-Lamy
VII $\beta$ -glicuronidase	GUSB	ds/hs	Sly

Fonte: Adaptado de Schwartz *et al.*, 2001.

A Síndrome de Marotoux-Lamy, é uma das MPS mais raras no mundo, mas que parece ser freqüente no Brasil (Coelho *et al.*, 1997). Possui uma incidência estimada que varia entre 1:43.261 e 1:1.505.160 (Valayannopoulos *et al.*, 2010). A enzima arilsulfatase B (ASB) é responsável pela remoção da molécula de sulfato terminal de dois tipos de glicosaminoglicanos: o dermatan sulfato e o condroitin sulfato. As mutações no gene da ASB resultam em redução ou ausência da atividade da ASB com conseqüente acúmulo de glicosaminoglicanos em órgãos e tecidos. Os pacientes apresentam inteligência normal e anormalidades esqueléticas similares à MPS I (Neufeld *et al.*, 2001).



A Doença de Pompe é uma doença de herança autossômica recessiva onde a deficiência da  $\alpha$ -glicosidase ou maltase ácida, leva ao acúmulo de glicogênio em um ou mais tecidos, especialmente o miocárdio, músculo esquelético e fígado. Esta doença também apresenta três formas de manifestação: a forma infantil, a juvenil e a adulta, sendo que a incidência combinada de todas as formas da doença de Pompe varia muito conforme a etnia e a região geográfica (Hirschhorn *et al.*, 2001).

Após muitos anos sem um tratamento efetivo para estas doenças, a terapia de reposição enzimática tem sido aplicada com sucesso em pacientes com doenças como Pompe (deficiência de  $\alpha$ -glicosidase), Gaucher (deficiência de  $\beta$ -glicosidase), MPS I (deficiência de  $\alpha$ -iduronidase) e Fabry (deficiência  $\alpha$ -galactosidase) (Angelini *and* Semplicini, 2010; Koskenvuo *and* Kantola, 2010; Pastores, 2010) e vem sendo desenvolvida atualmente para outras DLDs (Schiffmann, 2010).

A capacidade crescente das técnicas celulares, moleculares e bioquímicas é o que propicia uma grande quantidade de novas informações. Assim, existe a perspectiva de identificar o defeito bioquímico para a maioria ou todos os milhares de fenótipos de doenças catalogados por McKusick em *Mendelian Inheritance in Man* (Scriver *et al.*, 2001, OMIM).

O diagnóstico precoce dos indivíduos afetados tornou-se um tópico crucial para o sucesso das terapias disponíveis (Civallero *et al.*, 2006). A triagem neonatal para DLDs utilizando espectrometria de massa in tandem foi descrita inicialmente por Li e colaboradores (2004) outros grupos também

descrevem suas experiências com esta metodologia (Gelb *et al.*, 2006; Marsden *et al.*, 2010; Lehotay *et al.*, 2010).

Para o diagnóstico das DLDs utilizam-se estudos bioquímicos e moleculares. Os estudos bioquímicos geralmente iniciam com testes simples que buscam identificar metabólitos em excesso e continuam com a pesquisa de deficiências enzimáticas. Nos estudos moleculares pode-se fazer a busca de mutações específicas, quando existe uma mutação mais freqüente, sendo possível realizar até o sequenciamento completo do gene quando não existe apenas uma mutação responsável pela deficiência enzimática.

Embora o diagnóstico destas doenças seja baseado em técnicas enzimáticas específicas executadas no plasma, leucócitos e fibroblastos, nos últimos anos, amostras de sangue impregnado em papel-filtro também estão sendo utilizadas para este fim, conforme vem sendo demonstrado por alguns pesquisadores (Umaphysivam *et al.*, 2001; Chamoles *et al.*, 2001; Chamoles *et al.*, 2002 a; Chamoles *et al.*, 2002 b).

Neste trabalho, propomos avaliar esta metodologia para a investigação bioquímica das DLDs. Amostras em papel filtro apresentam um menor volume de sangue coletado e uma maior facilidade quanto ao transporte e acondicionamento. Este tipo de material é de fundamental importância quando consideramos as grandes dimensões do nosso país e os custos de transporte e materiais de coleta. Fatores pré-analíticos como efeito de anticoagulantes, temperatura de armazenamento e estabilidade ao longo do tempo necessitam ser melhor conhecidos. Soma-se a isto o avanço tecnológico dos equipamentos de detecção, que permitem atualmente, a miniaturização das metodologias em estudo, fato que determina uma maior agilidade no processamento e análise

das amostras sendo crucial para a introdução do tratamento, quando este está disponível. Dessa forma a determinação da atividade enzimática em amostras de sangue impregnado em papel-filtro poderia facilitar a detecção de pacientes afetados, pois a coleta e seu transporte são mais fáceis (Chamoles *et al.*, 2001) e a análise retrospectiva nestas amostras é uma possibilidade (Chamoles *et al.*, 2002 b).

## II. OBJETIVOS

### ***Objetivo Geral***

Considerando que o diagnóstico e o rastreamento das DLDs é realizado apenas em centros de referência que determinam a atividade de Hidrolases Lisossômicas, somada a disponibilidade de tratamento crescente e possibilidade de aconselhamento genético e ainda que a identificação precoce pode ter benefícios diretos para os afetados e seus familiares, o objetivo geral do nosso estudo foi determinar a viabilidade do uso do sangue impregnado em papel filtro e algumas condições pré-analíticas nas enzimas hexosaminidase total,  $\beta$ -galactosidase,  $\alpha$ -glicosidase, arilsulfatase B e  $\alpha$ -galactosidase.

Este trabalho foi dividido em três capítulos com os seguintes objetivos específicos:

### ***Capítulo I:***

- Testar a influência de anticoagulantes (ausência ou presença de heparina e EDTA) na determinação das atividades das enzimas hexosaminidase total e  $\beta$ -galactosidase em amostras de sangue impregnado em papel filtro.
- Estabelecer parâmetros de qualidade das amostras em papel filtro como: efeito do tempo e da temperatura de armazenamento sobre as atividades da hexosaminidase total e  $\beta$ -galactosidase.

## **Capítulo II:**

- Testar a influência de anticoagulantes (ausência ou presença de heparina e EDTA) na determinação das atividades das enzimas  $\alpha$ -glicosidase, arilsulfatase B e  $\alpha$ -galactosidase em amostras de sangue impregnado em papel filtro.
- Estabelecer parâmetros de qualidade das amostras em papel filtro como: efeito do tempo e da temperatura de armazenamento sobre as atividades da  $\alpha$ -glicosidase, arilsulfatase B e  $\alpha$ -galactosidase.
- Miniaturizar as técnicas para as enzimas  $\alpha$ -glicosidase, arilsulfatase B e  $\alpha$ -galactosidase para a realização dos ensaios em microplacas.
- Comparar os resultados encontrados com a técnica previamente descrita na literatura ( picotes de 3,0mm de diâmetro) com aqueles encontrados nas técnicas miniaturizadas (picotes de 1,2mm de diâmetro).

## **Capítulo III**

- Realizar uma triagem para as doenças lisossômicas de depósito selecionadas, em população de alto risco, a partir de material coletado em sangue em papel filtro.

## PARTE II

### III. MÉTODOS E RESULTADOS

#### *III.1 CAPÍTULO 1*

**Effect of sample collection, temperature and time of storage on  $\beta$ -galactosidase and total hexosaminidase activities in dried blood on filter paper**

Cristina D. de Castilhos, Jamila Mezzalira, Mariana P. S. Goldim, Frederico G. Werlang, Janice C. Coelho

Artigo aceito

Clinical Chemistry and Laboratory Medicine

**Effect of sample collection, temperature and time of storage on  
 $\beta$ -galactosidase and total hexosaminidase activities in dried  
blood on filter paper**

Cristina D. de Castilhos, Jamila Mezzalira, Mariana P. S. Goldim, Frederico G.  
Werlang, Janice C. Coelho\*

Department of Biochemistry and Post-graduate Program on Biochemistry –  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

Short title:  $\beta$ -galactosidase and total hexosaminidase activities in DBS

Number of Words of Manuscript: 1913

Number of References: 19

Number of Figures: 02

**\*Corresponding author**

Janice C. Coelho, PhD  
Department of Biochemistry  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Rua Ramiro Barcelos, 2600, anexo  
90035-003 – Porto Alegre – RS  
Brazil  
Phone: 55 51 33085546  
janice.coelho@ufrgs.br



**List of abbreviations**

LSD: Lysosomal storage diseases

DBS: Dried blood spots on filter paper

$\beta$ -gal:  $\beta$ -galactosidase

t-Hex: total hexosaminidase

CV: coefficient of variation

**Keywords:** 4-methylumbelliferyl fluorescent assay; Dried blood spots on filter paper; Inborn Errors of Metabolism; Lysosomal enzymes.

## Abstract

**Background:** Dried blood spots (DBS) on filter paper is a valuable sampling technique in clinical chemistry, but the stability of enzymes suitable as diagnosis of Lysosomal Storage Diseases (LSDs) has to be evaluated.

**Methods:** In a first experiment, blood from 20 subjects was collected using a syringe without additives and distributed to EDTA tubes, heparin tubes, and spotted on filter paper for comparison of sampling effects. In a second experiment, blood from 30 healthy subjects were spotted on filter paper and analyzed for  $\beta$ -galactosidase and total hexosaminidase activities after storage of the samples at different temperatures for up to 180 days.

**Results:** Initially we observed that enzyme activities were the same, independently of collection method. When DBS was stored at 37°C the activity of  $\beta$ -galactosidase dropped to 85% of the initial value, after 180 days ( $p < 0.05$ ). At all other temperatures (-20°C, 4°C and 25°C), the results were within the methodological error. Total hexosaminidase activity did not change significantly during the whole study period and at different storage temperature.

**Conclusions:** The two enzymes investigated in the present study may be stored for up to 17 days ( $\beta$ -galactosidase) or 180 days (total hexosaminidase) until analysis without loss of activity.

## Introduction

Lysosomal storage diseases (LSD) are inborn errors of metabolism caused by a deficiency in a protein, usually an enzyme, which results in a deposit of lipids in lysosomes. As a whole, this group of diseases occurs in 1 in every 7,700 live births (1, 2).

Gangliosidoses are LSD characterized by a deposit of gangliosides in lysosomes. GM1 gangliosidosis is a rare autosomal recessive disorder caused by a deficiency of  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal: E.C.3.2.1.23) due to mutations in the *GLB1* gene. This enzyme catalyzes the breakdown of ganglioside GM1, apart from other substrates, and when deficient this ganglioside is stored in neuronal tissues. GM1 gangliosidosis is classified into three types, according to the onset and severity of symptoms involved: type I (early infantile), type II (late infantile), and type III (adult) (3).

Hexosaminidases (t-Hex: E.C. 3.2.1.52) catalyze the hydrolysis of  $\beta$ -glycosidically linked N-acetylglucosamine and N-acetylgalactosamine residues from the nonreducing end of a number of glycoconjugates (4). These enzymes play a very important role in the catabolism of glucosphingolipids present in the membranes of eukaryotic cells (5). A deficiency in these enzymes is associated to severe neurodegenerative conditions, like Sandhoff disease (6).

The diagnosis of these diseases is based on enzyme activity measurement in plasma, leukocytes or fibroblasts. In recent years, dried blood spots (DBS) on filter paper have been used to measure the activity of these enzymes by fluorometry or by Tandem mass spectrometry.

Since DBS affords simple collection of samples, it has facilitated the diagnosis of these conditions. Moreover, the fact that the technique does

not require a tube for collection also reduces the risks of contamination to health professionals (7).

Molecular diagnosis is also an excellent method to detect LSD, although it becomes unfeasible in many health centers due to high costs associated with its protocol (8). In this scenario, the use of DBS as a screening method has been proposed by several diagnostic centers. As a new method to diagnose this group of diseases, some aspects should be standardized and characterized, like the best method of blood collection and the best period and temperature for storage of samples.

This paper analyzes three collection methods for sampling peripheral blood: collection using EDTA, collection using sodium heparin, and direct spotting on filter paper. In addition, we also assessed the best period and temperature for storage of samples, considering the preservation of the activity of two lysosomal hydrolases deficient in LSDs:  $\beta$ -gal and t-Hex.

## **Materials and methods**

This study was approved by the research and ethics committee from Federal University of Rio Grande do Sul and the participants have signed an informed consent.

### **Blood collection methods**

Twenty healthy individuals provided 10-mL venous blood samples collected in a plastic syringe with no anticoagulant agents. This volume was immediately divided into three aliquots: (1) direct spotted onto filter paper (S&S Grade 903, Schleicher and Schuell, Whatman, Kent, UK) with no anticoagulant

agent; (2) transferred to tubes containing EDTA (Vacutainer, Becton and Dickinson, São Paulo, SP, Brazil); and (3) transferred to heparinized tubes (Vacutainer, Becton and Dickinson, São Paulo, SP, Brazil). Aliquots (2) and (3) were inverted and spotted (100  $\mu$ L) on filter paper within one hour after collection. All spots were dried overnight at room temperature and stored in airtight bags with desiccant for not longer than 72 h, upon conduction of enzyme analyses.

### **Storage time and temperature of dried blood spots**

Thirty healthy individuals provided 3-mL venous blood samples collected in a syringe with no anticoagulant agents. Samples were immediately spotted onto filter paper (100  $\mu$ L), and left to dry overnight at room temperature. After that, samples were stored in airtight bags with desiccant in a freezer for at least 24 h until analysis. This moment was here called T0. Next, filter paper sheets were divided into four sections, the sections being stored at different temperatures: -20, 4, 25 and 37°C. These paper sections provided material for the analysis of enzyme activity 3, 10, 17, and 180 days after T0, (called T3, T10, T17 and T180, respectively).

### **Enzyme assay**

Activity of  $\beta$ -gal (EC 3.2.1.23) and t-Hex (EC 3.2.1.30) were analyzed according to a method previously described (9).

The substrates utilized contained the radical 4-methylumbelliferyl and were provided by Sigma (St. Louis, MO, USA). All chemicals and reagents were of analytical grade. A paper punch (Harris Unicore 3.0-mm, Sigma, St.

Louis, MO, USA) was employed to cut the filter paper used in all experiments. All analyses were carried out in duplicate utilizing 3.0-mm round filter paper punches. According to Civallero et al. (8) and Rodrigues et al. (9) each such paper punch contains approximately 3.6  $\mu\text{L}$  blood. After incubation at 37°C under specific conditions for each enzyme, reactions were stopped and the samples were centrifuged at 6,000  $g$  for 10 min at 4°C. Fluorescence was measured in a spectrofluorimeter (Hitachi F2000) at an excitation frequency of 365 nm and emission frequency of 450 nm. Enzyme activities were expressed as nmol of hydrolyzed substrate per hour and milliliter of blood. Molar product quantities were determined using blank subtraction. DBS from a single venous blood specimen were included as internal quality control samples in all assays.

### **Statistical analysis**

Data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (blood collection) or mean  $\pm$  inter-assay CV (time and temperature storage) and compared using a one-way analysis of variance for repetitive measurements (ANOVA) supplemented by a Duncan test, in cases where statistically significant differences were observed. All analyses were conducted using the SPSS 16 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) in a compatible PC. Statistical significance was defined as  $p < 0.05$ .

### **Results**

### **Precision evaluation**

Multiple repeat assays of identical samples were performed to determine the precision of the method. Three samples were assayed in duplicate for 10 days by two operators. Intra-assay and inter-assay coefficient of variation (CV) from healthy controls for  $\beta$ -gal were 11.5 and 15.3%, respectively. For t-Hex, intra-assay CV was 18.2% and inter-assay CV was 20.8%.

### **Blood collection methods**

No significant change was observed in  $\beta$ -gal activity in DBS collected with no anticoagulant agent ( $50.72 \pm 6.39$  nmol/h. mL<sup>-1</sup>), EDTA ( $53.08 \pm 6.16$  nmol/h.mL<sup>-1</sup>) or heparin ( $52.18 \pm 6.16$  nmol/h.mL<sup>-1</sup>). Similarly, no statistically significant differences were observed in t-Hex activity in samples collected on DBS with no anticoagulant agent ( $80.31 \pm 5.79$  nmol/h.mL<sup>-1</sup>), EDTA ( $94.21 \pm 10.9$  nmol/h.mL<sup>-1</sup>) or heparin ( $80.36 \pm 4.34$  nmol/h.mL<sup>-1</sup>).

### **Storage time and temperature of dried blood spots**

We did not observe differences in the activity of  $\beta$ -gal (Figure 1) in any of the studied temperatures up to 17 days. However, after 180 days of storage, the enzyme activity at 37°C decreased significantly when compared to other temperatures ( $p < 0.027$ ).

[Insert Figure 1 here]

There was no significant change in t-Hex activity at any of the storage temperatures for the whole study period. However, at T180 and storage at 37°C the variation was higher than usual (Figure 2).

[Insert Figure 2 here]

## **Discussion**

The use of DBS as a screening method for LSDs has been proposed by many authors and several enzymatic activity measurement methods have been suggested (11-15). Although the analyses conducted in DBS have been well validated and yielded low rates of false positive and negative results, some experimental conditions still have to be appropriately adjusted for each enzyme tested. Among the relevant parameters, three are particularly important: the best collection method, the best storage temperature and best storage period. In the present study we analyzed the influence of these conditions in  $\beta$ -gal and t-Hex activities.

To assess whether the collection methods described in the literature may interfere with enzymatic activity, we chose three methods to collect blood: with no anticoagulant agents, with EDTA and with heparin. Our study revealed that the blood sample collection method used for DBS preparation does not influence  $\beta$ -gal and t-Hex activities. Therefore, all the collection methods using DBS evaluated in this study may be used in the screening of GM1 and GM2 gangliosidosis.

The literature does not report any comparison between different



blood sample collection methods and the influence that they may have on  $\beta$ -gal and t-Hex DBS activities. However, both methods, which are compared in this work, are usually adopted in blood sample collection routines. Satisfactory results were obtained in a previous study that utilized blood collected in heparin to measure  $\alpha$ -glucosidase and  $\beta$ -gal activities in DBS (16). Nevertheless, a study with  $\alpha$ -galactosidase activity on DBS revealed that blood samples collected with no anticoagulant agent presented lower enzymatic activity as compared to samples collected in EDTA (8). That study also observed that the concentration of EDTA used and the collection method (lancet or syringe) does not influence the results.

Although our results demonstrated that  $\beta$ -gal and t-Hex activities do not suffer any influence of collection method, this may not be valid for other enzymes.

Another parameter analyzed in the present work was the stability of enzymatic activity in terms of sample storage period and temperature.

We observed that  $\beta$ -gal activity remained constant until T17 in all samples stored at the temperatures tested. A markedly significant drop in the enzymatic activity was only detected in T180 in samples stored at 37°C.

A study conducted by Gasparotto et al. (16) demonstrated that the activity of  $\beta$ -gal significantly diminished when the DBS was kept at -20°C and -80°C only after 260 days of storage. The fact of the  $\beta$ -gal activity remains constant for 180 days when the samples were stored at -20 ° C, as observed here, confirms these results. That study also revealed a significant loss of enzyme activity in samples that had been stored at room temperature and 37°C after one week. This drop in activity under these conditions was not observed in

our results, which showed a significant decrease in  $\beta$ -gal activity only at 37°C in T180.

In another investigation,  $\beta$ -gal activity has also been reported to remain constant when samples on DBS were kept at 50°C for 3 h (17). In that study, the authors state that  $\beta$ -gal — as well as other enzymes — is not affected by environmental conditions, which makes it possible to send DBS samples by mail across long distances.

Other studies that also endeavored to shed more light on lysosomal hydrolases activities in DBS samples, did not observe significant decreases in enzymatic activity from samples stored for over 24 h. For example,  $\alpha$ -galactosidase activity did not vary within 72 h at 4°C (8), and has also been shown to remain stable for one week at room temperature (18). Other enzymes ( $\alpha$ - and  $\beta$ -glucosidase, galactocerebrosidase and acid sphingomyelinase) are stable in DBS at -20 and 4°C, with minimal enzymatic activity loss (19). In this last work, storage at 37 and 45°C resulted in lower activity values at 180 days of storage.

In the present study, t-Hex activity showed a different biochemical behavior as compared to  $\beta$ -gal, and remained unchanged throughout the period analyzed.

Our results are in accordance with Lukacs et al (17). These authors showed that the DBS t-Hex activity was also stable at room temperature and was not affected even by exposure to elevated temperatures.

In summary,  $\beta$ -gal and t-Hex activities may be analyzed in DBS stored for up to 17 days and 180 days after blood collection, respectively, with no loss of activity. This length of time is enough to sending of samples by mail

to be analyzed in a specialized laboratory. Moreover, since temperature does not influence the enzyme activity within this time frame, samples may be transported without refrigeration, even if they arrive at their destination at a temperature of 37°C, which happens in some regions of Brazil.

### **Conflict of interest statement**

**Authors' conflict of interest disclosure:** The authors stated that there are no conflicts of interest regarding the publication of this article. Research support played no role in the study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the report; or in the decision to submit the report for publication.

**Research funding:** The study was supported by CNPq and GPPG/HCPA.

### **References**

1. Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. Prevalence of lysosomal storage disorders. *Jama* 1999; 281:249-254.
2. Baric I, Fumic K, Hoffmann GF. Inborn errors of metabolism at the turn of the millennium. *Croat Med J* 2001; 42:379-383.
3. Suzuki Y, Oshima A, Nanba E. beta-galactosidase deficiency (beta-galactosidosis): GM1 gangliosidosis and Morquio B disease. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D editors. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill, 2001: 3775-3809.
4. Santamaria R, Chabás A, Coll MJ, Miranda CS, Vilageliu L, Grinberg D. Twenty-one novel mutations in the GLB1 gene identified in a large group of

- GM1-Gangliosidosis and Morquio B patients: possible common origin for the prevalent p.R59H mutation among gypsies. *Hum Mut* 2006; 922:online.
5. Kolter T, Sandhoff K. Sphingolipids—their metabolic pathways and the pathobiochemistry of neurodegenerative diseases. *Angew Chem Int Ed Engl* 1999; 38:1532–1568.
  6. Wendeler M, Sandhoff K. Hexosaminidase assays. *Glycoconj J* 2009; 26:945–952.
  7. Castro AC, Borges LG, Souza Rda S, Grudzinski M, D'Azevedo PA. Evaluation of the human immunodeficiency virus type 1 and 2 antibodies detection in dried whole blood spots (DBS) samples. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2008; 50:151-156.
  8. Olivova P, van der Veen K, Cullen E, Rose M, Zhang XK, Sims KB, Keutzer J, Browning MF. 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.
  9. Civallero G, Michelin K, de Mari J, Viapiana M, Burin M, Coelho JC, Giugliani R. 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.
  10. Rodrigues MDB, Oliveira AC, Müller KB, Martins AM, D'Almeida V. Chitotriosidase determination in plasma and in dried blood spots: A comparison using two different substrates in a microplate assay. *Clin Chim Acta* 2009; 406:86-88.

11. Chamoles NA, Niizawa G, Blanco M, Gaggioli D, Casentini C. Glycogen storage disease type II: enzymatic screening in dried blood spots on filter paper. *Clin Chim Acta* 2004; 347:97-102.
12. Chamoles NA, Blanco M, Gaggioli D, Casentini C. Gaucher and Niemann-Pick diseases—enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper: retrospective diagnoses in newborn-screening cards. *Clin Chim Acta* 2002; 317:191-197.
13. Chamoles NA, Blanco M, Gaggioli D. Fabry disease: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. *Clin Chim Acta* 2001; 308:195-196.
14. Lukacs Z, Cobos PN, Mengel E, Hartung R, Beck M, Deschauer M, Keil A, Santer R. Diagnostic efficacy of the fluorometric determination of enzyme activity for Pompe disease from dried blood specimens compared with lymphocytes—possibility for newborn screening. *J Inherit Metab Dis* 2010; 33:43–50.
15. Fuller M, Lovejoy M, Brooks DA, Harkin ML, Hopwood JJ, Meikle PJ. Immunoquantification of alpha-galactosidase: evaluation for the diagnosis of Fabry disease. *Clin Chem* 2004; 50:1979-1985.
16. Gasparotto N, Tomanin R, Frigo AC, Niizawa G, Pasquini E, Blanco M, Donati MA, Keutzer J, Zacchello F, Scarpa M. Rapid diagnostic testing procedures for lysosomal storage disorders:  $\alpha$ -glucosidase and  $\beta$ -galactosidase assays on dried blood spots. *Clin Chim Acta* 2009; 402:38–41.
17. Lukacs Z, Keil A, Peters V, Kohlschütter A, Hoffmann GF, Cantz M, Kopitz J. Towards quality assurance in the determination of lysosomal enzymes: A two-centre study. *J Inherit Metab Dis* 2003; 26:571-581.

18. Dajnoki A, Fekete G, Keutzer J, Orsini JJ, De Jesus VR, Chien Y-H, Hwu W-L, Lukacs Z, Mühl A, Zhang XK, Bodamer O. Newborn screening for Fabry disease by measuring GLA activity using tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta* 2010; *in press*.
19. De Jesus VR, Zhang XK, Keutzer J, Bodamer OA, Mühl A, Orsini JJ, Caggana M, Vogt RF, Hannon WH. Development and evaluation of quality control dried blood spot materials in newborn screening for lysosomal storage disorders. *Clin Chem* 2009; 55:158-164.

## Figures

**Figure 1 -  $\beta$ -gal activity (nmol/h.mL<sup>-1</sup>) on DBS in terms of sample storage temperature and period.**

-20°C (■), 4°C (□), 25°C (▣) and 37°C (▤). n = 30.

\* Statistically significant in comparison to the other storage periods for one same temperature ( $p < 0.027$ ).

**Figure 2: t-Hex activity (nmol/h.mL<sup>-1</sup>) on DBS in terms of sample storage temperature and period.**

-20°C (■), 4°C (□), 25°C (▣) and 37°C (▤). n = 30.

Figure 1

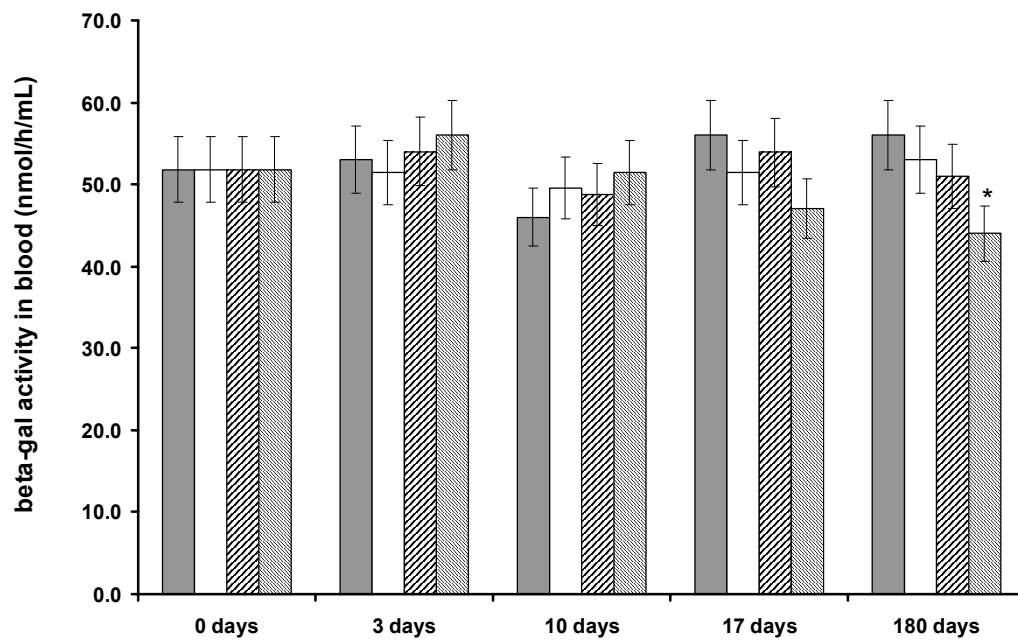
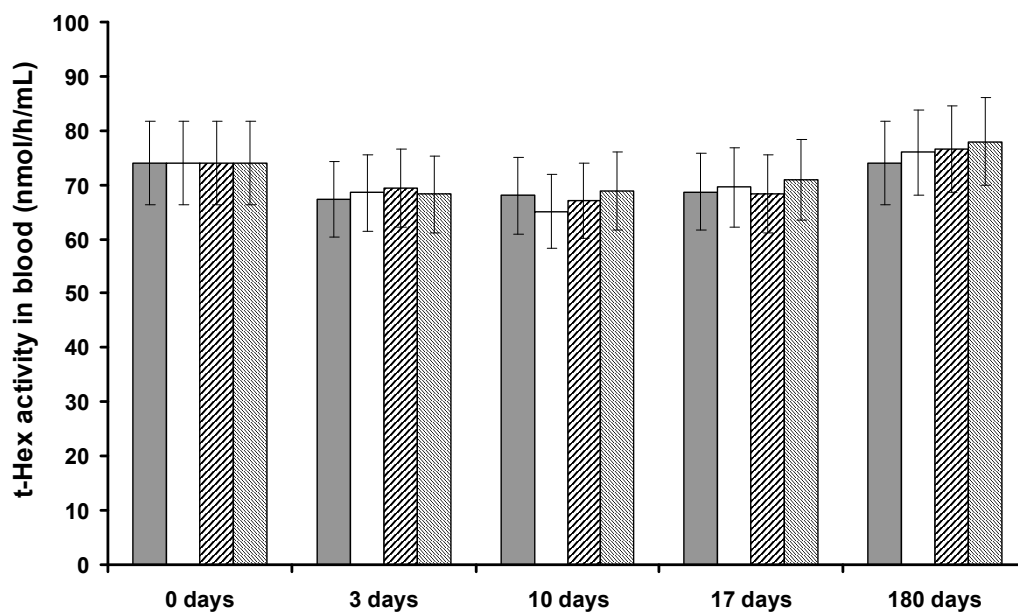




Figure 2



### **III.2 CAPÍTULO 2**

**Influence of pre-analytical factors on alpha-galactosidase A, arylsulfatase B and alpha-glucosidase activities measured on dried blood spots on filter paper**

Cristina D Castilhos, MSc; Jamila Mezzalira, Student; Mariana P Goldim, Post Graduation Student; Janice Carneiro Coelho, Ph.D.

**Artigo submetido**

Clinical Biochemistry

**Influence of pre-analytical factors on  $\alpha$ -galactosidase A, arylsulfatase B and  $\alpha$ -glucosidase activities measured on dried blood spots on filter paper**

Cristina D. de Castilhos, Jamila Mezzalira, Mariana P. S. Goldim, Janice C. Coelho

Departament and Program of Post-graduation in Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author:

Prof. Janice C. Coelho

Departamento de Bioquímica – ICBS

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rua Ramiro Barcelos, 2600, anexo

Porto Alegre, RS

Brasil

Phone: +55 51 33085546

Fax: + 55 51 33085535

Email: [janice.coelho@ufrgs.br](mailto:janice.coelho@ufrgs.br)

## List of abbreviations

LSD: Lysosomal storage diseases

DBS: Dried blood spots on filter paper

FD: Fabry disease

GLA:  $\alpha$ -galactosidase A

MPS VI: Mucopolysaccharidosis VI

ASB: arylsulfatase B

GSD II: Glycogen storage disease type II

GAA:  $\alpha$ -glycosidase

## **Abstract**

a) Objectives: To analyze the effect of blood collection and storage conditions on activity of  $\alpha$ -galactosidase A, arylsulfatase B and  $\alpha$ -glucosidase.

b) Design and Methods: Blood was collected in EDTA, heparin, or direct spotting on filter paper and stored at different temperatures (-20, 4, 25 and 37°C) and storage times (3, 10, 17 and 180 days). The influence of filter paper size was also assessed (3.0 and 1.2 mm).

c) Results: No statistically significant difference was observed between the three collection methods.  $\alpha$ -glucosidase A activity significantly decreased after the 10th day, while arylsulfatase B activity only differed significantly after the 180th day, and  $\alpha$ -galactosidase A activity remained constant throughout this storage time. Excellent correlation coefficients were observed for the two filter paper sizes used.

d) Conclusions: Both paper sizes may be employed. Filter paper specimens should be transported under refrigeration as soon as possible after blood collection.

**Keywords:** Lysosomal storage diseases;  $\alpha$ -glucosidase;  $\alpha$ -galactosidase; arylsulfatase A.

## 1. Introduction

Lysosomal storage disorders (LSDs) are a heterogeneous group of inherited metabolic diseases characterized by the impairment of the intralysosomal catabolic pathways [1]. Around 50 LSDs have been described [2], the majority of which associated to recessive autosomal inheritance (except for Fabry, Hunter and Danon diseases, which are caused by inheritance associated to the X chromosome). Enzyme replacement therapy has been licensed or is being used in trials for Fabry disease, glycogen storage disease type II, mucopolysaccharidosis type VI and other LSDs. In all cases, early diagnosis is crucial for the success of these therapies [3,4].

Fabry disease (FD) is a glycosphingolipidose characterized by the deficiency in the enzyme  $\alpha$ -galactosidase A (GLA, E.C. 3.2.1.22), which leads to a deposition of sphingolipids in several organs, mainly in the renal, neurological and cardiac systems. Since it is a disease associated to the X chromosome, a drop in GLA activity measured in plasma as well as in leukocytes or cultured fibroblasts is the diagnosis criterion for the male population. In turn, in women with FD the enzyme may however present normal activity levels, which makes the diagnosis more difficult for the gender. Molecular biology tests are the most reliable methods in screening and diagnosis of the disease in women suspected to have FD. Because the mutations responsible for this enzyme deficiency may vary, the costs of such investigations are very high [5].

Mucopolysaccharidosis VI (MPS VI), also known as Maroteaux-Lamy syndrome, is caused by the deficiency in N-acetylgalactosamine-4-sulfatase (arylsulfatase B, ASB, 3.2.6.12) and the resultant tissue storage of dermatan sulfate [6]. Clinical features and severity are variable, but usually include short

stature, hepatosplenomegaly, dysostosis multiplex, stiff joints, corneal clouding, cardiac abnormalities, and facial dysmorphism. Intelligence is usually preserved [7].

Glycogen storage disease type II (GSD II), or Pompe disease, is classified according to age at onset, organ involvement, severity, and progression [8]. Alpha-1,4-glucosidase (GAA; 3.2.1.20) is a lysosomal enzyme involved in the degradation of glycogen within cellular vacuoles.

The definitive diagnosis of these and other LSDs includes the determination of enzyme activity in plasma, leukocytes, or cultured fibroblasts [9]. In recent years, dried blood samples collected on filter paper have been increasingly utilized for a variety of purposes in the health industry, like monitoring of drug levels in blood, investigation of infectious agents, biochemical and molecular assay, among others. This technique offers a series of advantages, like the smaller volume of material to be handled, when compared to conventional sampling techniques, as well as the low transportation requirements — apart from the higher safety in handling as of all analysis processes — which explain the increasing preference it enjoys currently.

The year 2001 marked the beginning of the development of fluorimetry analyses in LSD screening using dried blood spotting (DBS) on filter paper [10,11,12]. However, several aspects remain to be addressed concerning the definition of the validation parameters of the methodologies used in LSD screening and diagnosis.

The aim of this paper was to analyze some pre-analytical experimental factors in dried blood filter paper samples. We analyzed three designs for blood collection on filter paper and assessed the effects of temperature and storage

time on these samples by measuring activity of three lysosomal hydrolases deficient in LSD patients:  $\alpha$ -galactosidase A (GLA), arylsulfatase B (ASB) and  $\alpha$ -glucosidase (GAA). We also compared enzyme activity in 3.0-mm against 1.2-mm diameter disks containing dried blood samples so as to assess the possibility to reduce material volume in these analyses.

## **2. Material and Methods**

This study was approved by the research and ethics committee, Federal University of Rio Grande do Sul in accordance with the World Medical Association Declaration Of Helsinki for Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. The participants have signed an informed consent.

### **2.1. Effect of blood collection methods**

Twenty five healthy individuals provided 10-mL whole peripheral blood samples collected without anti-clotting agents. This volume was divided into three aliquots: (1) DBS without anti-clotting agent (S&S Grade 903, Schleicher and Schuell, Whatman, Kent, UK, [www.whatman.com](http://www.whatman.com)); (2) blood transferred to tubes containing EDTA (Vacutainer, Becton and Dickinson, São Paulo, SP, Brazil, [www.bd.com/brasil](http://www.bd.com/brasil)); and (3) blood transferred to heparinized tubes (Vacutainer, Becton and Dickinson, São Paulo, SP, Brazil, [www.bd.com/brasil](http://www.bd.com/brasil)). Aliquots (2) and (3) were homogenized and poured on filter paper within 1 h of collection. All samples prepared on filter paper were dried at room temperature and stored in plastic bags containing desiccant for not longer than 72 h, upon conduction of enzyme analyses. This experiment was conducted in DBS specimens 3.0 mm in diameter.



## **2.2. Effect of time and temperature**

Twenty healthy individuals provided 3-mL whole peripheral blood samples collected without anti-clotting agents. Direct spotting was prepared on filter paper, which was left to dry overnight at room temperature. Samples were stored in plastic bags containing desiccant in a freezer for at least 24 h, upon conduction of enzyme activity analyses. This moment was called T0. Next, filter paper sheets were divided into four sections, each section being stored at a different temperature: -20, 4, 25 and 37°C. Sections provided material for the analysis of enzyme activity 3, 10, 17, and 180 days after T0, (called T3, T10, T17 and T180, respectively). This experiment was conducted in DBS specimens 1.2 mm in diameter.

## **2.3. Comparison between 1.2-mm and 3.0-mm specimens**

Ten healthy individuals provided 3-mL whole peripheral blood samples collected without anti-clotting agents. The same drying and storing experimental design as described in the previous sections was adopted. The analyses of the activities of the three were carried out in duplicate utilizing 1.2-mm and 3.0-mm DBS (paper punch Harris Unicore 1.2 mm and 3.0-mm, St. Louis, MO, USA, [www.sigma.com](http://www.sigma.com)) according to the techniques described in 2.4.

## **2.4. Enzyme assay**

ASB and GLA activity were measured according to the protocol described by Civallero et al (2006)[3]. A DBS punch was placed in a tube (3.0 mm) or in a plate (1.2 mm) and distilled water was added. A 10-min extraction process ensued. Then, to measure ASB the following were added to the

system: 15 mM lead acetate in 0.05 M sodium acetate buffer, pH 5.0 and 10 mM 4-methylumbelliferyl - sulfate in 0.05 mM sodium acetate buffer, pH 5.0. In turn, for the GLA assay, the following were added: 0.25 mM N-acetyl-D-galactosamine in distilled water and 5 mM 4-methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-galactoside, pH 4.4.

GAA activity was measured using a protocol based on Li et al (2004)[14] and Kallwass et al (2007)[13]. Enzyme reaction was performed at pH 4.0 and was carried out using a DBS punch placed in a tube or plate with distilled water and a reaction mix comprising 0.2 M citrate-phosphate (pH 4.0) with 0.6 g/L Triton X-100, 10 mM 4-methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-glicosídeo and 8 mm/L aqueous acarbose.

For all assays, incubation was performed for 20 h at 37°C in reaction tubes (3.0 mm diameter disk DBS) or in black 96-well assay plates (1.2 mm diameter disk DBS) (Corning 96 well black assay plates (non-binding)) in duplicate and one blank was assayed for each sample. Stopping buffer (0.1 M ethylenediamine, pH 11.4; 0.5 M glicine – NaOH, pH 10.3 or 0.085 M glicine – NaOH, pH 10.5 for GLA, GAA and ASB, respectively) was added to the blanks before substrate.

The substrates utilized contained the radical 4-methylumbelliferyl and were provided by Sigma (St. Louis, MO, USA, [www.sigma.com](http://www.sigma.com)). All chemicals and reagents were of analytical grade. The analyses were carried out in duplicate utilizing 1.2-mm round filter paper specimens, which contained approximately 1.44  $\mu$ L whole blood. When the analyses were conducted in 3.0-mm DBS the amount of total blood is estimated to be around 3.6  $\mu$ L. After incubation at 37°C under specific conditions for each enzyme, reactions were

stopped using alkaline buffer. Fluorescence was measured at an excitation frequency of 365 nm and emission frequency of 450 nm (fluorimeter Spectramax Multi-Mode Microplate reader Molecular Devices - M5). Enzyme activities were expressed as nmol hydrolyzed substrate per hour per milliliter of blood (nmoles/h.mL<sup>-1</sup>). Molar product quantities were determined using blank subtraction. DBS from a single venous blood specimen was included as internal quality control samples in all assays.

## **2.5. Statistical analysis**

Data were expressed as mean  $\pm$  standard error (SEM) and compared using an analysis of variance for repetitive measures (ANOVA) supplemented by a Duncan test, in cases where statistically significant differences were observed. All analyses were conducted using the SPSS 16 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) in a compatible PC. Statistical significance was defined as  $p < 0.05$ .

## **3. Results**

### **3.1 Effect of blood collection methods**

No statistically significant difference was observed between GAA activity ( $F=0.475$ ;  $p<0.624$ ) compared for DBS collected without anti-clotting agent ( $20.29 \pm 3.36$  nmoles/h.mL<sup>-1</sup>), EDTA ( $25.77 \pm 5.11$  nmoles/h.mL<sup>-1</sup>) or heparin ( $26.68 \pm 6.24$  nmoles/h.mL<sup>-1</sup>). Similarly, ASB activity ( $F=0.022$ ;  $p<0.977$ ) did not show statistically significant difference in DBS collected without anti-clotting agent ( $14.0 \pm 1.50$  nmoles/h.mL<sup>-1</sup>), EDTA ( $14.14 \pm 1.47$  nmoles/h.mL<sup>-1</sup>) or heparin ( $13.69 \pm 1.51$  nmoles/h.mL<sup>-1</sup>). No difference was observed in GLA activity ( $F=0.383$ ;  $p<0.684$ ) in DBS collected without anti-clotting agent ( $8.15 \pm$

1.71 nmoles/h.mL<sup>-1</sup>), EDTA (8.43 ± 3.09 nmoles/h.mL<sup>-1</sup>) or heparin (6.11 ± 1.12 nmoles/h.mL<sup>-1</sup>).

### 3.2. Effect of time and temperature

When the GAA activity is compared before storage (T0 = 20.04 nmoles/h.mL<sup>-1</sup>), it is possible to observe that it did not differ from that measured in samples stored at T3. When we compare the enzyme activity of samples stored along time, we observe that samples stored at -20°C (p<0.001) as well as those stored at 4°C (p<0.001), 25°C (p<0.001) and 37°C (p<0.001) presented a significant reduction in GAA activity at T10, T17 and T180 (figure 1).

Figure 2 shows that at T3, T10 and T17, the temperatures chosen did not influence ASB activity in comparison to the initial activity (T0 = 12.51 nmol/h.mL<sup>-1</sup>). At T180, a significant decrease was observed in enzyme activity at all temperatures analyzed (p<0.0002) in comparison to T0. Considering this storage time, a significant drop in ASB activity was observed with time, for each temperature -20°C (p<0.0005), 4°C (p<0.0007), 25°C (p<0.00007) and 37°C (p<0.00002).

GLA activity at T0 was 1.89 nmol/h.mL<sup>-1</sup>. This activity did not show statistically significant difference after 3, 10, 17 or 180 days in storage. For each storage time and along time, no statistically significant difference was observed in enzyme activities for the storage temperatures analyzed (figure 3).

### 3.3. Correlation between 1.2-mm and 3.0-mm samples

The results of the correlation analyses between the techniques developed with 1.2-mm and 3.0-mm samples for the enzymes GAA, ASB and GLA were 0.994, 0.900 and 0.957, respectively.

Several repeats of the same sample were conducted to determine the precision of the method (data not shown). The intra-assay and the inter-assay coefficient of variation (CV) from healthy controls for GAA, ASB and GLA activities were lower or equal to 12% and 15%, respectively.

#### **4. Discussion**

The use of DBS in LSDs screening has increased in recent years, and has been underlined and is being characterized by stability and validation studies for the techniques more commonly used by fluorometry and MS/MS in several diagnosis centers. The results so far described converge so as to enlarge the knowledge and overcome the limitations that this material presents. The present paper reports the results of the analysis of pre-analytical factors such as different collection conditions, stability along time and in the temperatures  $-20$ ,  $4$ ,  $25$  and  $37^{\circ}\text{C}$ , as well as the correlation between the determination of techniques for GAA, ASB and GLA DBS samples measuring 1.2 and 3 mm in diameter.

It is possible to observe that the three collection methods (direct spotting collection, EDTA or heparin collection) did not influence GAA, ASB and GLA activity. Thus, these materials may be used in the screening of Pompe, Fabry or Marotoux-Lamy diseases.

The current literature lists a few studies comparing the effect of collection methods on activity of the enzymes tested in the present paper. Olivova et al.

[15] observed a significant difference between GLA activities on DBS when comparing samples prepared using direct spotting methods and DBS prepared from blood collected into EDTA tubes. The mean GLA activity of samples prepared by direct blood spotting was significantly lower, when compared to that of samples using blood collected using EDTA tubes, for all subjects. With the same subject, GLA activity from blood collected in EDTA was up to 68% higher than blood spotted directly. Blood samples collected in tubes with EDTA are often employed in the diagnosis of Fabry disease, since molecular biology techniques are the methods of choice to diagnose the disease. So, it is possible to utilize the sample collected in the determination of enzyme activity as well as in molecular analysis. We agree with the conclusion by Olivova et al. [15] that suggests that the sampling method be included in the GLA activity report.

Other pre-analytical parameters investigated were stability along storage time as well as the optimal temperatures for storage of DBS samples.

In the present study, GAA activity was shown to remain stable for 3 days at all storage temperatures, though it decreased after T10. At T10, GAA activity was measured to be 39% of the initial activity at 37°C, and went down to 35% of the initial activity at T180.

Dajnoki et al. [16] had already reported GAA to remain stable upon 17 days after collection using the DBS technique. The authors observed the behavior of GAA activity on DBS stored for 28 days at different temperatures within the range -80 and 37°C, and observed a trend towards lower GAA activities when stored at room temperature and at 37 °C.

We observed a drop of nearly 30% in GAA activity at T180 in all temperatures analyzed. It is possible to hypothesize that such significant drop in

GAA activity may be imputed to the fact that this storage time is indeed quite long. A similar finding was observed by Chamoles et al. [12], who reported a 16% decrease in GAA activity after a 90-day storage period at 4°C. In that paper, the authors also reported a drop in enzyme activity in samples stored for 3 h at 50°C and for 14 days at 30°C. In another paper, Gasparotto et al. [17] also reported a decrease in GAA activity after a 4-day storage period at 37°C and after an 11-day storage at room temperature, which went down to 47% of the initial activity after a 200-day storage period, at that temperature.

Our results show that the longer the storage time, the greater the loss in GAA activity. This may be due to pre-analytical experimental designs or environmental variables other than those analyzed in the present study, like humidity or the analysis method used, which differed from those previously adopted.

The data obtained in the present study show that ASB activity is also affected by storage times and temperatures. ASB activity was shown to decrease significantly with storage time at all temperatures tested. At T180, ASB activity loses 39%, 65%, 72% and 76% of its activity at -20°C, 4°C, 25°C and 37°C, respectively. Similarly to GAA, a significant decrease in ASB activity takes place with time and that is even more pronounced in samples stored at higher temperatures.

In turn, GLA activity was shown to remain essentially constant after the 3-day storage period at all temperatures. Additionally, GLA activity remained unaltered upon T180. Similarly, De Jesus et al. [18] showed that GLA activity remained stable at -20 and 4°C, but a significant drop in the enzyme's activity was observed in comparison to T0, when DBS was stored at 25, 37 and 45°C.

The difference between our results and those obtained by De Jesus et al. [18] may be ascribed to the fact that low enzyme activity values maybe influenced by the creation of product molecules during sample introduction in to the mass spectrometer, the equipment used by the authors.

We obtained a good correlation between the results of GAA, ASB and GLA activities measured in 1.2- and 3-mm DBS specimens. This affords to reduce sample size and reaction by almost three times, which reduces the amount of material to be collected and to reduce costs of tests.

Intra and inter-assay CVs obtained here agree with those obtained by other authors [12,15] and express good reproducibility and precision of the method when 1.2-mm DBS is used.

Thus, our results afford to conclude that the method using smaller DBS specimens (1.2 mm) may be used to measure activity of these enzymes. Apart from this, since GAA and ASB activities decreased with time, we suggest that the analysis of GAA activity be conducted within 17 days when the sample is kept at 4°C and that the analysis of ASB activity be conducted within 17 days when the sample is kept at 25°C. Since GLA activity remained unchanged as measured in the method using smaller DBS specimens in microplate proposed here, DBS may be used to measure GLA activity after longer storage periods and higher storage temperatures. Our results indicate that DBS samples should be transported under refrigeration and within the shortest interval after collection.

## **Acknowledgements**



The authors thank GPPG-HCPA and CNPq for the financial support provided and the blood donors in Hospital de Clínicas de Porto Alegre for the blood samples utilized in the present study.

## References

- [1] S.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle, *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New-York: McGraw-Hill, 2001.
- [2] W.R. Wilcox, Lysosomal storage disorders: the need for better pediatric recognition and comprehensive care, *J. Pediatr.* 144 (2004) S3-S14.
- [3] G. Civallero, K. Michelin, J. de Mari, M. Viapiana, M. Burin, J.C. Coelho 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* 372 (2006) 98-102.
- [4] D.C. Lehotay, P. Hall, J. Lepage, J.C. Eichhorst, M.L. Etter, C.R. Greenberg, LC-MS/MS progress in newborn screening, *Clin. Biochem.*, in press, (2010).
- [5] J. Shabbeer, M. Yasuda, E. Luca, R.J. Desnick, Fabry disease: 45 novel mutations in the alpha-galactosidase A gene causing the classical phenotype, *Mol. Genet. Metab.* 76 (2002) 23-30.
- [6] E. F. Neufeld, J. Muenzer, *The Mucopolysaccharidoses*, in: C. Scriver, A. Beaudet, W. Sly (Eds.). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, McGraw Hill, New York, 2001, pp 3421-3452.
- [7] A.C. Azevedo, I.V. Schwartz, L. Kalakun, S. Brustolin, M.G. Burin, A.P. Beheregaray et al, Clinical and biochemical study of 28 patients with mucopolysaccharidosis type VI, *Clin. Genet.* 66(3) (2004) 208-213.

- [8] J.C. Llerena Jr, D.M. Horovitz, S.K. Marie, G. Porta, R. Giugliani, M.V. Rojas et al. The Brazilian consensus on the management of Pompe disease, *J. Pediatr.* 155(4 Suppl) (2009) S47-56.
- [9] E. Parkinson-Lawrence, M. Fuller, J.J. Hopwood, P.J. Meikle, D.A. Brooks, *Immunochemistry of lysosomal storage disorders*, *Clin. Chem.* 52(9) (2006)1660-1668.
- [10] N.A. Chamoles, M. Blanco, D. Gaggioli, Fabry disease: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper, *Clin. Chim. Acta.* 308 (2001) 195-196.
- [11] N.A. Chamoles, M. Blanco, D. Gaggioli, C. Casentini, Gaucher and Niemann-Pick diseases - enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper: retrospective diagnoses in newborn-screening cards, *Clin. Chim. Acta.* 317 (2002)191-197.
- [12] N.A. Chamoles, G. Niizawa, M. Blanco, D. Gaggioli, C. Casentini, Glycogen storage disease type II: enzymatic screening in dried blood spots on filter paper, *Clin. Chim. Acta* 347 (2004) 97-102.
- [13] H. Kallwass, C. Carr, J. Gerrein, M. Titlow, R. Pomponio, D. Bali et al, Rapid diagnosis of late-onset Pompe disease by fluorometric assay of alpha-glucosidase activities in dried blood spots. *Mol. Genet. Metab.* 90(4) (2007) 449-52. [Epub 2007 Jan 31. Erratum in: *Mol. Genet. Metab.* 92(3) (2007) 285].
- [14] Y. Li, C.R. Scott, N.A. Chamoles, A. Ghavami, B.M. Pinto, F. Turecek, M.H. Gelb. Direct multiplex assay of lysosomal enzymes in dried blood spots for newborn screening. *Clin Chem.* Oct;50(10):1785-96. 2004.
- [15] P. Olivova, K. van der Veen, E. Cullen, M. Rose, X.K. Zhang, K.B. Sims et al, Effect of sample collection on alpha-galactosidase A enzyme activity

measurements in dried blood spots on filter paper, *Clin. Chim. Acta* 403(1-2) (2009) 159-62. Epub 2009 Feb 24.

[16] A. Dajnoki, G. Fekete, J. Keutzer, J.J. Orsini, V.R. De Jesus, Y.H. Chien, et al., Newborn screening for Fabry disease by measuring GLA activity using tandem mass spectrometry, *Clin. Chim. Acta*, in press, 2010.

[17] N. Gasparotto, R. Tomanin, A.C. Frigo, G. Niizawa, E. Pasquini, M. Blanco, et al., Rapid diagnostic testing procedures for lysosomal storage disorders:  $\alpha$ -glucosidase and  $\beta$ -galactosidase assays on dried blood spots, *Clin. Chim. Acta*. 402 (2009) 38–41.

[18] V.R. De Jesus, X.K. Zhang, J. Keutzer, O.A. Bodamer, A. Muhl, J.J. Orsini, M. Caggana, R.F. Vogt, W.H. Hannon, Development and Evaluation of Quality Control Dried Blood Spot Materials in Newborn Screening for Lysosomal Storage Disorders, *Clin. Chem.* 55 (2009) 1158–164.

### Figure Legends:

Figure 1: GAA activity ( $\text{nmol/h.mL}^{-1}$ ) on DBS in terms of sample storage temperature and period (mean $\pm$ SEM).  $-20^{\circ}\text{C}$  (■),  $4^{\circ}\text{C}$  (▨),  $25^{\circ}\text{C}$  (▩) and  $37^{\circ}\text{C}$  (▣).

\* Statistically different from activity at T0 and along time for each temperature studied ( $p < 0.001$ ). Data  $n = 20$  healthy individuals.

Figure 2: ASB activity ( $\text{nmol/h.mL}^{-1}$ ) on DBS in terms of sample storage temperature and period (mean $\pm$ SEM).  $-20^{\circ}\text{C}$  (■),  $4^{\circ}\text{C}$  (▨),  $25^{\circ}\text{C}$  (▩) and  $37^{\circ}\text{C}$  (▣).

\* Statistically different from activity at T0 and along time for each temperature studied ( $p < 0.001$ ). Data  $n = 20$  healthy individuals.

Figure 3: GLA activity ( $\text{nmol/h.mL}^{-1}$ ) on DBS in terms of sample storage temperature and period (mean $\pm$ SEM).  $-20^{\circ}\text{C}$  (■),  $4^{\circ}\text{C}$  (▨),  $25^{\circ}\text{C}$  (▩) and  $37^{\circ}\text{C}$  (▣).

Data  $n = 20$  healthy individuals.

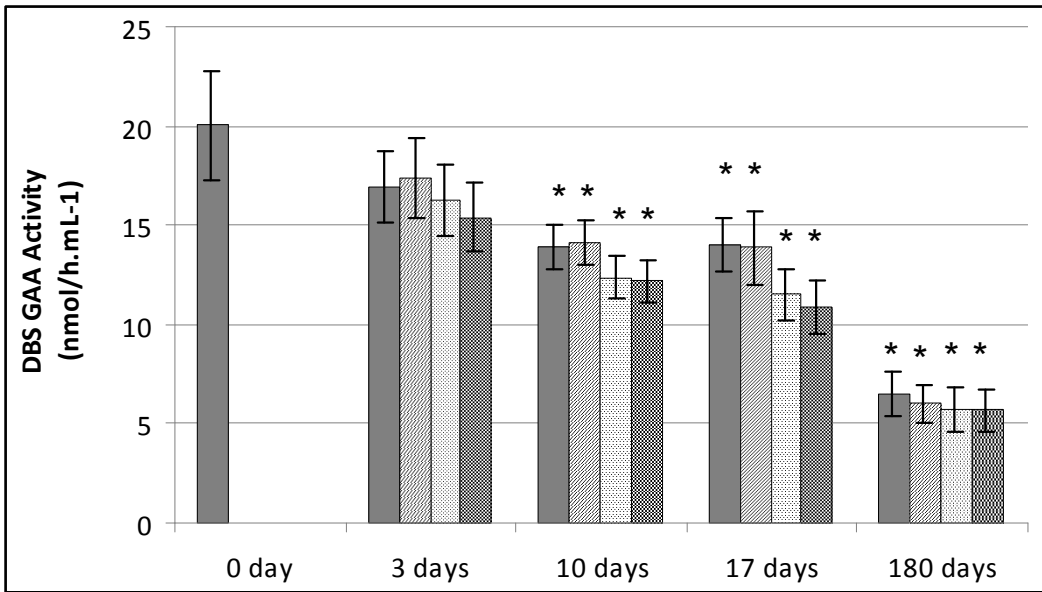


Figure 1

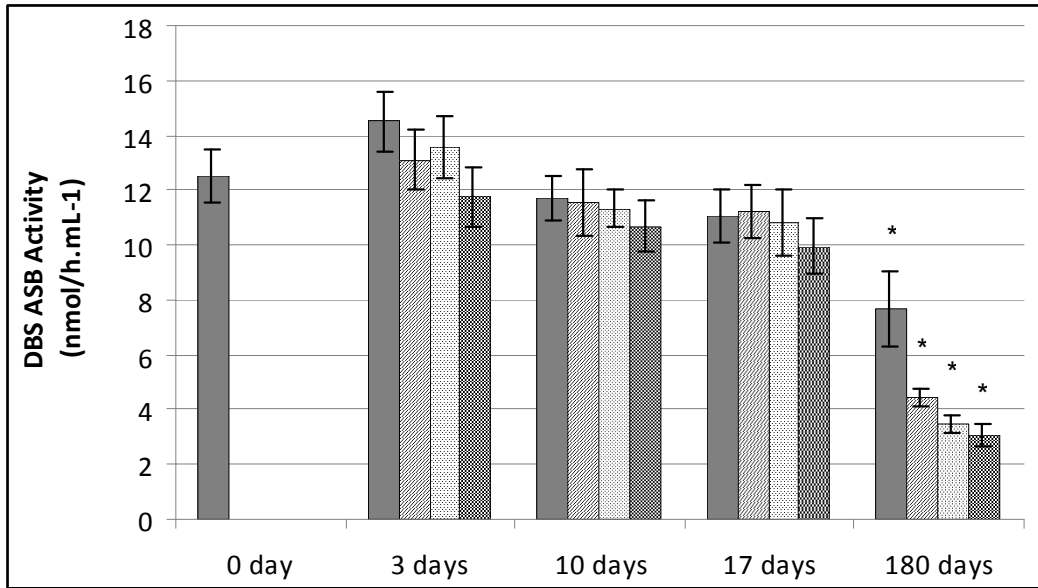


Figure 2

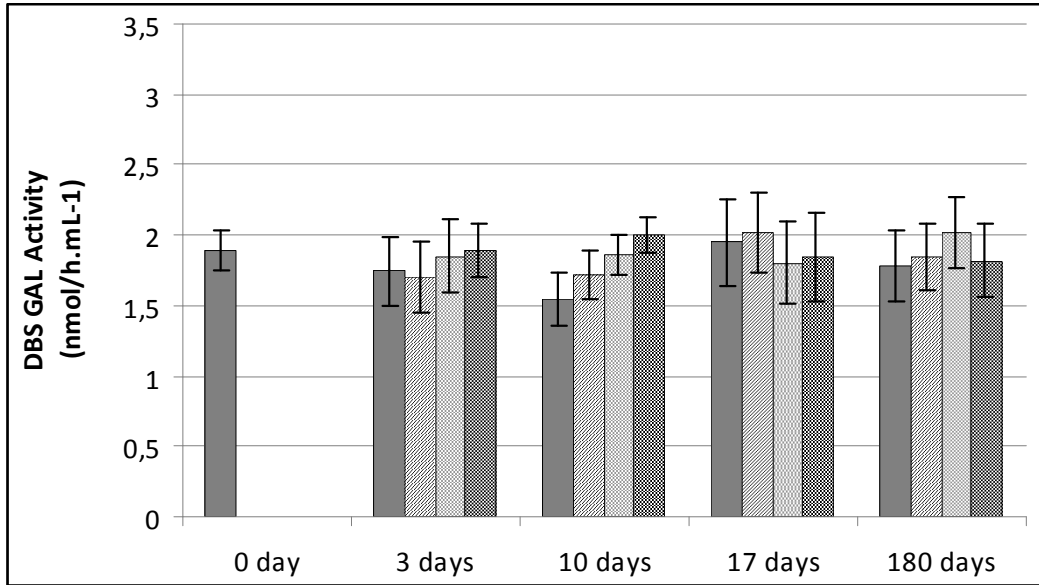


Figure 3

### **III.3 CAPÍTULO 3**

#### **Determinação da atividade de hidrolases lisossômicas em sangue colhido em papel filtro, uma alternativa para triagem em populações de alto risco**

Cristina D. de Castilhos, Jamila Mezzalira, Mariana P. S. Goldim, Vanessa V. Daitx, Cristina da Silva Garcia, Maria Inês Medeiros, Carla Vieira Andrade, Alexandre Mello e Janice C. Coelho



## **Lista de abreviações**

DLDs: Doenças lisossômicas de depósito

SPF: Sangue em papel filtro

GLA:  $\alpha$ -galactosidase A

MPS VI: Mucopolisacaridose tipo I

MPS VI: Mucopolisacaridose tipo VI

ASB: arilsulfatase B

GSD II: Glicogenose tipo II

GAA:  $\alpha$ -glicosidase

## **Resumo**

a) **Objetivo:** Rastrear uma população de alto risco através da determinação da atividade enzimática em amostras de sangue em papel filtro para as seguintes doenças lisossômicas: Fabry, Pompe, MPS I e VI.

b) **Materiais e Métodos:** Amostras de sangue em papel filtro foram utilizadas para o rastreamento de acordo com a hipótese clínica sugerida. Plasma, leucócitos e fibroblastos cultivados foram utilizados para a confirmação quando necessário.

c) **Resultados:** Das 205 amostras de SPF encaminhadas ao laboratório, 43 apresentaram resultados alterados. Foram re-encaminhados materiais confirmatórios de 16 indivíduos. A frequência de diagnósticos de DLDs encontrada foi de 2,9%.

d) **Conclusão:** O rastreamento em SPF é uma alternativa para populações de alto risco uma vez que o rápido estabelecimento do diagnóstico de doenças potencialmente tratáveis permite a implantação precoce do tratamento o que poderá melhorar a qualidade de vida de muitos pacientes.

**Palavras-chave:** sangue em papel filtro; Doença lisossômica de depósito; hidrolases lisossômicas; rastreamento em população de alto risco.

## **Introdução**

As doenças lisossômicas de depósito (DLDs) são um grupo de aproximadamente 50 patologias resultantes de um defeito em uma enzima, em seu transporte ou em proteínas que modulam sua atividade, produzindo um acúmulo lisossomal de macromoléculas ou de intermediários metabólicos (Mueller and Young, 2001). A maioria das DLDs é de herança autossômica recessiva, com exceção da Doença de Fabry, de Danon e da Doença de Hunter, que têm herança recessiva ligada ao cromossomo X (Wilcox, 2004). Estas doenças são raras, com uma incidência combinada ao redor de 1 em 7000 nascidos vivos (Fletcher, 2006). Acredita-se que com a possibilidade de rastreamento em maior escala, as incidências venham a ter valores mais próximos da realidade.

O diagnóstico das DLDs é realizado em plasma, leucócitos e fibroblastos (Parkinson-Lawrence et al, 2006) e na última década tem sido utilizado sangue periférico impregnado em papel filtro (SPF). Este material apresenta vantagens como menor quantidade de material coletado, facilidade de manipulação e transporte, menores riscos de contaminação biológica pelo pessoal do laboratório, etc (Li and Tse, 2010). Sendo assim diversos estudos vêm sendo realizados para assegurar que este material seja adequado para rastreamento e/ou diagnóstico das DLDs.

Existem vários métodos para a determinação da atividade das hidrolases lisossômicas em SPF (Umaphysivam et al, 2001, Carpenter et al, 2002, Fuller et al, 2004) e é importante considerar mais de um tipo de ensaio ou material para a confirmação do diagnóstico, quando estiver sendo realizada a investigação de indivíduos com suspeita clínica de uma DLD (Staretz-Chacham

et al, 2009). Em geral, as técnicas utilizam fluorometria ou cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS) (De Jesus et al, 2009, Olivova et al, 2009, Gasparotto et al, 2009, Civallero et al, 2006, Chamoles et al, 2001 ).

O objetivo deste estudo foi relatar a experiência de nosso laboratório no rastreamento e diagnóstico de DLDs a partir de triagem em sangue colhido em papel filtro.

### **Material e métodos**

Duzentos e cinco indivíduos com sinais ou sintomas de uma das Doenças lisossômicas de depósito (DLDs) selecionadas (Doença de Pompe, Mucopolissacaridose tipo I, Mucopolissacaridose tipo VI e Doença de Fabry) foram investigados neste estudo, de abril de 2010 a janeiro de 2011. Estes sinais ou sintomas estão descritos na tabela 1. Sangue em papel filtro (SPF), plasma, leucócitos ou fibroblastos cultivados foram utilizados para a determinação da atividade enzimática da alfa-galactosidase A (GAL, E.C. 3.2.1.22), alfa-glicosidase (GAA, E.C. 3.2.1.20), Arilsulfatase B (ASB, E.C. 3.2.6.12) ou alfa-iduronidase (IDUA E.C. 3.2.1.76).

Do total de indivíduos 46% eram do sexo masculino e 54% do sexo feminino. Todas as amostras foram encaminhadas por pediatras, neurologistas ou geneticistas de várias regiões do Brasil para o Laboratório de Doenças Lisossômicas de Depósito do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do RGS, no sul do Brasil.

Este estudo foi aprovado pelo comitê de pesquisa e ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul de acordo com a World Medical

Association Declaration Of Helsinki for Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects.

### **Métodos**

Foram encaminhadas ao laboratório, via correio, amostras de sangue periférico impregnado em papel filtro (S&S Grade 903, Schleicher and Schuell, Whatman, Kent, UK, [www.whatman.com](http://www.whatman.com)). Todas as amostras impregnadas em papel filtro foram secas em temperatura ambiente e estocadas em sacos plásticos contendo dessecante (para prevenir hidratação).

Os ensaios enzimáticos em SPF foram realizados de acordo com Civallero et al, (2006) com redução do volume das reações em 2,5 vezes (ASB, b-galactosidase) ou 4 vezes (alfa-galactosidase e alfa-iduronidase). Para a enzima alfa-glicosidase foi utilizado o método baseado em Li e colaboradores (2004), utilizando-se 8 mM de acarbose como inibidor da alfa-glicosidase neutra. Uma solução de ensaio composta por 0,2 M de tampão citrato-fosfato (pH 4,0) com 0,6 g/L Triton X-100 e o substrato 10 mM 4-methylumbelliferyl - $\alpha$ -D-glicosídeo foi utilizada. Também houve redução da reação na ordem de 2,5 vezes.

Todos os reagentes usados foram de grau analítico. Um picotador (Harris Unicore 1,2-mm, Sigma, St. Louis, MO, USA) foi utilizado para obter os picotes de papel filtro para todos os experimentos. Todas as análises foram realizadas em duplicata utilizando picotes de papel filtro de 1,2 mm de diâmetro, que contêm aproximadamente 1,44 $\mu$ L de sangue total. Foram utilizadas para a incubação placas para fluorometria de 96 poços (Corning 96 well black assay plates (non-binding)).

Após as incubações a 37°C em incubadora termostaticada (Marconi MA-127), as reações foram interrompidas pela adição de tampão alcalino. A fluorescência foi medida (excitação 365 nm; emissão 450 nm) em um fluorímetro Spectramax. (Multi-Mode Microplate reader Molecular Devices - M5). As atividades enzimáticas foram expressas em nanomol de substrato hidrolisado por hora e por mililitro de sangue (nmol/h.mL<sup>-1</sup>). As leituras foram corrigidas pela subtração de brancos e comparadas com uma curva padrão de metilumbeliferona. Uma amostra de SPF foi incluída em todos os experimentos como controle de qualidade interno da reação.

Quando o resultado foi alterado, solicitamos sangue (10mL de sangue total heparinizado) ou biópsia de pele (aproximadamente 3mm de biópsia de pele do antebraço). Amostras de 2 mL de sangue foram centrifugados a 2000 rotações por minuto para separação do plasma e 8mL foram utilizados para obtenção de leucócitos (Skoog e Beck, 1956). As amostras foram armazenadas em freezer até a realização das análises enzimáticas. As biópsias de pele foram cultivadas para obtenção de fibroblastos conforme Coelho e Giugliani, (2000) em meio Ham F-10 com 10% de soro bovino fetal, quando a atividade da enzima alfa-glicosidase em SPF encontrava-se com valores abaixo do intervalo de referência.

Nas amostras de leucócitos e fibroblastos foi dosada a proteína de acordo com Lowry e colaboradores, 1951. Foi realizado também ensaio para a beta-galactosidase para determinar a viabilidade de análise do material.

Para a enzima  $\alpha$ -glicosidase a técnica utilizada para a determinação da atividade em fibroblastos cultivados foi a descrita por Hermans e colaboradores (1991). Esta reação ocorre em meio acético tamponado (0,2M pH 4,0) e com o

substrato 2mM 4-methylumbeliferoyl- $\alpha$ -D-glicosideo após 1 hora de incubação a 37°C. A atividade da alfa-galactosidase foi medida em plasma conforme Morgan e colaboradores (1990) com incubação a 30°C por 2 horas com tampão acetato de sódio (0,5 M) em pH 4,8 enquanto a atividade da ASB foi medida em pH 6,0 sendo a amostra incubada por 1 hora e 30 min a 37°C conforme Kresse e colaboradores (1982). Esta reação ocorre com o substrato 4-nitrocatechol sulfato (Sigma) em presença de tampão acetato (pH 6,0). Para a determinação da atividade da enzima alfa-iduronidase em plasma utilizamos o substrato 2mM 4- methylumbeliferoyl-a-L-iduronide, cyclohexylammonium salt (Glicosynth) em presença de tampão formato de sódio pH 2.8 conforme Hopwood e colaboradores (1979).

Todas as reações foram realizadas em tubos de vidro e incubadas a 37°C em incubadora termostatizada (Marconi MA-127) e interrompidas pela adição de tampão alcalino, após a incubação. As reações foram realizadas em duplicata com um branco de reação que foi preparado pela adição de todos os reagentes exceto o substrato. As leituras foram realizadas em placas para fluorometria de 96 poços (Corning 96 well black assay plates (non-binding)) e medidas em frequências de 365 nm (excitação) e de 450 nm (emissão) (fluorimetro Spectramax Multi-Mode Microplate reader Molecular Devices - M5). As atividades enzimáticas foram expressas como nmol de substrato hidrolisado por hora por mililitro de plasma ou por miligrama de proteína (leucócitos e fibroblastos). As leituras foram corrigidas pela subtração de brancos de reação e comparadas com uma curva padrão de metilumbeliferona.

Para todas as técnicas utilizadas, tanto em SPF como em plasma, leucócitos ou fibroblastos, utilizamos material de 20 indivíduos normais para determinar o intervalo de normalidade (valores máximos e mínimos).

## **Resultados**

Os resultados obtidos na triagem das DLDs selecionadas podem ser acompanhados na figura 1, assim como o protocolo estabelecido para o estudo.

Podemos observar na figura 1 que 162 amostras de SPF encaminhadas apresentaram resultados normais e 43 alterados. Os resultados normais foram encaminhados aos médicos solicitantes com a indicação de que os mesmos reavaliassem o paciente e, se julgassem necessário, nos enviassem sangue heparinizado ou fibroblastos. Deste total de indivíduos somente 12 foram reencaminhados e todos apresentaram resultados enzimáticos normais.

Sangue heparinizado (n=34) ou biópsia de pele (n=9) foram solicitados daqueles indivíduos cujo resultado foi alterado no rastreamento em SPF. Deste grupo de indivíduos, recebemos sangue heparinizado de 9 indivíduos (26,5 % do total solicitado) e um pouco mais da metade das biópsias de pele (55,5%) para a investigação da Doença de Pompe.

Após análise deste material obtivemos 8 indivíduos normais e 6 indivíduos afetados com as seguintes doenças: 2 com Doença de Pompe, 2 com doença de Fabry e 2 com MPS tipo I.

A atividade da  $\beta$ -galactosidase foi determinada para ser utilizada como uma enzima controle da qualidade da amostra. Quando foram encontrados



valores abaixo de  $18,6 \text{ nmol/h.mL}^{-1}$  a amostra de SPF foi considerada inadequada para análise.

Após este estudo, foi possível determinar os intervalos de referência (valores máximos e mínimos) para indivíduos normais e afetados para quase todas as enzimas estudadas em diferentes materiais. Os valores encontrados para todas as enzimas nos diversos tipos de materiais analisados, estão descritos na tabela 2.

### **Discussão**

Diversos estudos têm sido realizados para o melhor conhecimento do SPF como uma ferramenta no rastreamento e no diagnóstico das DLDs tanto por fluorometria como por espectrofotometria em Tandem (LC-MS/MS) (Lukacs et al, 2003, Civallero et al, 2006, Olivova et al, 2009, De Jesus et al, 2009, Castilhos et al, 2011). Este conhecimento torna o uso do SPF, mais seguro e confiável, para a investigação das DLDs e demonstra sua importância no rastreamento e diagnóstico destas doenças na triagem neonatal assim como já está estabelecido em outras áreas das ciências da saúde.

A coleta da amostra, a preparação do SPF e o envio por meio postal devem ser claramente instruídos para que o material tenha qualidade garantida quando for analisado. Outra forma de garantir a qualidade da amostra em investigação é realizar a medida da atividade de uma enzima de referência como é feito quando se investigam amostras de leucócitos, fibroblastos e plasma. A determinação da atividade da  $\beta$ -galactosidase pode ser realizada para este fim, atestando assim a condição de análise do material recebido (Gasparotto et al, 2009, Lukacs et al, 2003, Chamoles et al, 2001).

A frequência de DLDs diagnosticadas neste estudo foi de 2,9%. Em dois estudos brasileiros realizados em 1997 e em 2001 com pacientes de alto risco para erros inatos do metabolismo, Coelho e colaboradores, utilizando amostras de sangue heparinizado, encontraram uma frequência para as doenças aqui analisadas, de 0,75% e 0,67%, respectivamente. Nossos resultados parecem indicar que houve uma melhor seleção da amostra estudada por parte dos médicos que encaminharam as mesmas. Talvez isto indique que com o passar destes anos a comunidade médica brasileira tenha sido melhor esclarecida quanto ao diagnóstico de uma DLD.

Dentro do grupo de amostras negativas em SPF, encontramos 02 mulheres com Doença de Fabry confirmada por análise molecular. Isto já era esperado, pois segundo Linthorst e colaboradores (2009) um terço de mulheres com DF não são identificadas pela medida da atividade da alfa-galactosidase. Isto nos mostra que a utilização da análise molecular em mulheres sintomáticas com atividade normal ou diminuída da alfa-galactosidase em SPF, e que não tenham a confirmação em plasma ou leucócitos, tem que ser estimulada.

Embora o protocolo utilizado tenha servido para o diagnóstico das DLDs mencionadas acima, a utilização do sangue colhido em papel filtro ainda indica muitos falsos positivos, pois das 14 amostras com resultados alterados que foram re-encaminhadas para avaliação, somente 6 (42,8%) confirmaram uma doença lisossômica. Atribuímos, em parte, o grande número de falsos positivos, à qualidade da amostra. Sabemos que a coleta e armazenamento da mesma antes do envio para o laboratório pode ser crucial para a análise.

Levando-se em conta que os testes apresentados aqui facilitaram a análise e diminuíram o custo e o tempo dos ensaios, a triagem destas DLDs

em SPF ainda parece ser uma alternativa viável. Com a facilidade de coleta e transporte do SPF, o número de casos deverá aumentar fazendo com que a real incidência destas DLDs na população seja melhor estimada, especialmente em países de grande superfície como o Brasil ou onde as condições de coleta e envio de amostras de sangue heparinizado sejam limitadas.

O rápido estabelecimento do diagnóstico de doenças potencialmente tratáveis permite a implantação precoce do tratamento o que poderá salvar ou mesmo melhorar a qualidade de vida de muitos pacientes.

### **Referências bibliográficas**

1. Carpenter KH, Wiley V. Application of tandem mass spectrometry to biochemical genetics and newborn screening. *Clin Chim Acta*. 322 (1–2):1 – 10. 2002.
2. Castilhos, C.D., Mezzalira, J. *et al*. Effect of sample collection, temperature and time of storage on  $\beta$ -galactosidase and total hexosaminidase activities in dried blood on filter paper. *Clin Chem Lab Med - in press*, 2011.
3. Chamoles, A., Blanco, M., Gaggioli, D. Fabry disease: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper, *Clin. Chim. Acta*. 308 195-196. 2001.
4. Civallo, G., Michelin, K., de Mari, J., Viapiana, M., Burin, M., Coelho J.C., *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* 372 98-102. 2006.

5. Coelho J.C., Giugliani R. Fibroblasts from skin biopsies as a tool the investigation of genetic diseases: Technical recommendations. *Gen Mol Biol.* 23:269–271. 2000.
6. Coelho, J.C., Burin, M.G. *et al.* Selective screening of 18,000 high-risk Brazilian patients for the detection of inborn errors of metabolism. *Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre*, v.21, n.3, Dez. 2001.
7. Coelho, J.C., Wajner, M. *et al.* Selective screening of 10,000 high-risk Brazilian patients for the detection of inborn errors of metabolism. *Eur J Pediatr*, v.156, n.8, Aug, p.650-4. 1997.
8. De Jesus, V.R., Zhang, X.K., Keutzer, J., Bodamer, O.A., Muhl, A., Orsini, J.J., Caggana, M., Vogt, R.F., Hannon, W.H. Development and Evaluation of Quality Control Dried Blood Spot Materials in Newborn Screening for Lysosomal Storage Disorders, *Clin. Chem.* 55 1158–164. 2009.
9. Fletcher JM. Screening for lysosomal storage disorders: a clinical perspective. *J Inherit Metab Dis.* 29 (2–3):405 –408. 2006.
10. Fuller M, Lovejoy M, Brooks DA, Harkin ML, Hopwood JJ, Meikle PJ. Immunoquantification of alpha-galactosidase: evaluation for the diagnosis of Fabry disease. *Clin Chem.* 50:1979-1985. 2004.
11. Gasparotto, N., Tomanin, R., Frigo, A.C., Niizawa, G., Pasquini, E., Blanco, M., *et al.* Rapid diagnostic testing procedures for lysosomal storage disorders:  $\alpha$ -glucosidase and  $\beta$ -galactosidase assays on dried blood spots, *Clin. Chim. Acta.* 402 38–41. 2009.
12. Hermans MM, Kroos MA, Beeumen J *et al.* Human lysosomal alpha-glucosidase. Characterization of the catalytic site. *J Biol Chem* 266:13507-12. 1991.

13. Hopwood JJ, Muller V, Smithson A, Baggett N. A fluorogenic assay using 4-methylumbelliferyl alpha-L-iduronide for the estimation of alpha-L-iduronidase activity and the detection of Hurler and Scheie syndromes. *Clin Chim Acta* 92:257-65. 1979.
14. Kresse H, Von Fugura K, Klein U, Glossi J, Paschke E, Pohlmann R. Enzymatic diagnosis of genetic mucopolissaccharide storage disorders. *Methods Enzimology*. 83 559-72. 1982.
15. Li W and Tse FL. Dried blood spot sampling in combination with LC-MS/MS for quantitative analysis of small molecules. *Biomed Chromatogr*. Jan;24(1):49-65. Review. 2010.
16. Li Y, Scott CR, Chamoles NA, Ghavami A, Pinto BM, Turecek F, Gelb MH. Direct multiplex assay of lysosomal enzymes in dried blood spots for newborn screening. *Clin Chem*. Oct;50(10):1785-96. 2004.
17. Linthorst, G.E., Bouwman, M.G. *et al*. Screening for Fabry disease in high-risk populations: a systematic review. *J Med Genet*. v.47, n.4, p.217-22, Apr. 2009.
18. Lowry OW, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275. 1951.
19. Lukacs Z, Keil A, Peters V, Kohlschütter A, Hoffmann GF, Cantz M, Kopitz J. Towards quality assurance in the determination of lysosomal enzymes: A two-centre study. *J Inherit Metab Dis*. 26:571-581. 2003.
20. Morgan SH, Young EP *et al*. The neurological complications of Anderson-Fabry Disease (alpha-galactosidase A deficiency) - investigation of symptomatic and presymptomatic patients. *QUART. J. MED*. 75,491-504. 1990.

21. Mueller, R.F and Young, I.D. Biochemical genetics. In: Emery's Elements of Medical Genetics, 11<sup>a</sup> ed., New York, Churchill Livingstone. 2001.
22. Olivova, P., van der Veen, K., Cullen, E., Rose, M., Zhang, X.K., Sims K.B., et al. Effect of sample collection on alpha-galactosidase A enzyme activity measurements in dried blood spots on filter paper, Clin. Chim. Acta 403(1-2). 2009. 159-62. Epub Feb 24. 2009.
23. Parkinson-Lawrence E, Fuller M, Hopwood JJ, Meikle PJ, Brooks DA. Immunochemistry of lysosomal storage disorders. Clin Chem. Sep;52(9):1660-8. 2006.
24. Skoog WA, Beck WS. Studies on the fibrinogen, dextran and phytohemagglutinin methods of isolating leukocytes. Blood. 11: 436-454; 1956.
25. Staretz-Chacham O, Lang TC, LaMarca ME, Krasnewich D, Sidransky E. Lysosomal storage disorders in the newborn. Pediatrics. Apr;123(4):1191-207. 2009.
26. Umapathysivam K., Hopwood J.J., Meikle P.J. Determination of acid alpha-glucosidase activity in blood spots as a diagnostic test for Pompe disease. Clin Chem. 47 (8):1378 –1383. 2001.
27. Wilcox, W.R. Lysosomal storage disorders: the need for better pediatric recognition and comprehensive care. The Journal of Pediatrics. 2004.

Tabela 1: Sinais e sintomas clínicos descritos nos formulários de encaminhamento das amostras (n=205)

Achados clínicos	%
Angioqueratoma	31
Dor em Extremidades	30
Alteração Cardíaca	23
Hipotonia	20
Hepatoesplenomegalia	10
Alteração Gastrointestinal	6
Alterações Neurológicas	6
Alterações Esqueléticas	5
Alteração Renal	4
Acidente vascular cerebral	4
Intolerância a Calor/Frio	2
Alteração Ocular	2
Alterações Hepáticas	2
Alterações Respiratórias	2
Dor Óssea	2
Alterações Hematológicas	1

Tabela 2 – Atividades enzimáticas em amostras de SPF, plasma e leucócitos para as hidrolases lisossômicas selecionadas

Enzima	n	Controles	n	Pacientes
Beta-galactosidase				
SPF	20	18,6 - 86,8		
Leucócitos	20	64,6 – 104,4		
Arilsulfatase B				
SPF	20	6,2 -15,2		
Alfa-galactosidase				
SPF	20	3,9 –10,0	2	1,6 – 2,0
Plasma	20	4,7 – 22,4	2	1,6 – 2,2
Alfa-glicosidase				
SPF	20	3,8 – 9,6	2	ND –1,0
Fibroblastos	20	38,2 – 212,0	2	0,1 – 4,6
Alfa-iduronidase				
SPF	20	2,6 - 9,4	2	ND – 0,3
Plasma	20	9,8 – 40,6	2	ND -1,2

Os intervalos correspondem aos valores máximos e mínimos

encontrados para cada enzima.

SPF: Atividade em  $\text{nmol/h.mL}^{-1}$

Plasma: Atividades em  $\text{nmol/h.mL}^{-1}$

Leucócitos e fibroblastos: Atividades em  $\text{nmol/h.mg}^{-1}$  de proteína



## PARTE III

#### IV.DISCUSSÃO

Geralmente, no laboratório de DLD do Departamento de Bioquímica da UFRGS, recebemos para investigação, amostras de sangue heparinizado para a obtenção de plasma e leucócitos. Muitas vezes recebemos também, somente amostras de sangue periférico com EDTA, em virtude de características particulares de diagnóstico, como no caso da Doença de Fabry, em que mulheres devem ser investigadas por técnicas de biologia molecular. E, nos últimos 6 anos, pela influência da tecnologia do papel filtro utilizada na triagem neonatal (teste do pezinho), amostras de sangue periférico diretamente impregnado em papel filtro (SPF), também são enviadas.

Como até o momento há, na literatura, poucos trabalhos com a descrição de parâmetros pré-analíticos para as medidas das atividades das enzimas em SPF, tivemos o interesse em trabalhar com alguns destes parâmetros buscando conhecer melhor o efeito sobre este material e definir as melhores condições de trabalho.

Nosso primeiro objetivo foi determinar se haveria interferência nas atividades enzimáticas após a impregnação em papel filtro a partir de três diferentes métodos de coleta de sangue. Outro aspecto importante que nos levou a testar esta hipótese, é que muitas vezes o volume de material obtido dos pacientes, é pequeno, em função da idade, condição física e clínica ou número de exames prescritos a serem realizados. Desta forma seria possível utilizar algumas gotas de sangue oriundo de qualquer uma das formas de coleta investigadas neste estudo.

Existem poucos trabalhos descritos na literatura científica a respeito da influência de anticoagulantes, em amostras de SPF, nas enzimas lisossômicas estudadas. Nenhum estudo comparando os diferentes métodos de coleta foi relatado ainda para as enzimas beta-galactosidase (b-gal), hexosaminidase total (hex T),  $\alpha$ -glicosidase (GAA) e arilsulfatase B (ASB). Entretanto, todos os métodos de coleta aqui apresentados, são adotados amplamente na obtenção de sangue para análise enzimática. Resultados satisfatórios foram obtidos em um estudo que empregou heparina como método de coleta para medir a atividade da GAA e b-gal em SPF (Gasparotto *et al.*, 2009).

Nossos resultados revelaram que os diferentes métodos de coleta aqui investigados não exercem qualquer influência sobre a atividade das enzimas b-gal, hex t,  $\alpha$ -galactosidase (GLA), GAA e ASB, pois estas mantiveram suas atividades constantes quando testadas.

Olivova e colaboradores (2009) observaram uma diferença significativa entre a atividade da GLA quando compararam amostras de sangue impregnadas diretamente em papel filtro com amostras colhidas em tubos com EDTA e posteriormente transferidas para o SPF. A atividade enzimática nas amostras colhidas com EDTA e impregnadas em SPF foi maior do que aquela das amostras diretamente impregnadas sem o uso de anticoagulante. Este resultado não está de acordo com o nosso, pois nós não observamos diferença entre a atividade da enzima nos dois métodos de coleta utilizados, EDTA e sangue sem anticoagulante. Concordamos com Olivova e colaboradores (2009), que sugerem que sejam descritos no laudo de resultados do exame qual o método de coleta e qual a metodologia de ensaio utilizada. As amostras de sangue colhidas em tubos com EDTA são freqüentemente empregadas no

diagnóstico da doença de Fabry, uma vez que técnicas de biologia molecular são os métodos de escolha para diagnosticar a doença em mulheres. Assim é possível utilizar a mesma amostra coletada para a determinação da atividade enzimática e também para a análise molecular.

No seguimento deste estudo, caracterizamos o comportamento enzimático da b-gal, Hex t, GLA, GAA e ASB em papel filtro com relação ao tempo e a temperatura de armazenamento.

Foi possível determinar que aos três dias de armazenamento, em todas as temperaturas estudadas e para todas as enzimas, as atividades permaneceram estáveis. A partir deste momento cada enzima demonstrou um efeito diferente ao longo do tempo para as diversas temperaturas estudadas.

Aos 10 dias de armazenamento, observamos que as enzimas Hex t, b-gal, GLA e ASB não têm suas atividades afetadas em nenhuma das temperaturas. Já a atividade média da GAA diminuiu 39% quando comparada com a atividade média inicial a 37°C.

Aos 17 dias, observamos o mesmo efeito sobre as atividades enzimáticas. As enzimas Hex t, b-gal, GLA e ASB permaneceram estáveis, não sendo afetadas em nenhuma das temperaturas, enquanto a GAA apresentou diferença significativa quando comparada com suas atividades iniciais, em todas as temperaturas estudadas.

Aos 180 dias as enzimas Hex t e GLA permaneceram estáveis em todas as temperaturas e tempos estudados, enquanto que a b-gal decresceu 15% em relação a atividade inicial. Muito embora a atividade da b-gal tenha diminuído significativamente aos 180 dias à 37°C, podemos afirmar que esta diferença não prejudicaria um possível diagnóstico, uma vez que os pacientes

apresentam, em média 5 a 10% de atividade residual em relação aos indivíduos normais e este percentual é extremamente inferior a atividade da b-gal neste tempo e temperatura.

Lukacs e colaboradores (2003) observaram que a atividade da b-gal permaneceu constante quando amostras de SPF foram mantidas a 50°C por 3 h. Neste estudo, os autores concluem que a b-gal não é afetada por condições ambientais, sendo possível enviar um SPF por correio a longas distâncias. Neste trabalho, estes autores mostram também que a atividade da Hex t em SPF é estável à temperatura ambiente e não é afetada mesmo exposta a elevadas temperaturas, o que vem de encontro aos nossos resultados.

Fato semelhante, para a GLA, já havia sido demonstrado por Dajnoki e colaboradores (2010). Estes autores relataram que a GLA de SPF mantém-se estável por 17 dias após a coleta, tempo máximo estudado naquele trabalho. Do mesmo modo, De Jesus e colaboradores (2009) demonstraram que a atividade da GLA manteve-se estável a -20°C e 4 °C, mas uma queda significativa na atividade da enzima foi observada em relação ao T0, quando o SPF foi armazenado a 25, 37 e 45 °C por 187 dias. Embora estes autores tenham observado uma queda na atividade enzimática, observaram também um alto coeficiente de variação (CV) nestas amostras. Para justificar isto eles concluem que “valores baixos de atividade enzimática, podem ser confundidos pela criação de moléculas do produto durante a introdução da amostra no espectrômetro de massa, principalmente devido à incompleta remoção do substrato enzimático durante a preparação da amostra”. O uso de duas técnicas diferentes justificaria a diferença nos resultados obtidos.

No presente trabalho, a ASB apresentou em T180 uma diminuição significativa em todas as temperaturas estudadas chegando a perdas de 39%, 65%, 72% e 76% da sua atividade a -20°C, 4°C, 25°C e 37°C, respectivamente. Já a GAA chegou a 35% da atividade inicial na temperatura de 37°C. Esta foi a enzima que mais sofreu variação do tempo e da temperatura. Dajnoki e colaboradores (2010) observaram o efeito do tempo e da temperatura sobre a atividade da GAA em SPF. Eles armazenaram amostras de SPF por 28 dias em diferentes temperaturas dentro da faixa de -80 a 37°C, e observaram uma redução da atividade enzimática em material armazenado à temperatura ambiente e à 37°C.

É possível supor que essa queda significativa na atividade da GAA aos 180 dias pode ser devida ao tempo de armazenamento que é de fato bastante longo. Uma descoberta semelhante foi observada por Chamoles e colaboradores (2004), que relataram uma diminuição de 16% na atividade da GAA, após um período de armazenamento de 90 dias a 4°C. Nesse trabalho, os autores também relataram uma queda na atividade da enzima nas amostras armazenadas por 3 horas a 50°C e durante 14 dias a 30°C. Em outro estudo, Gasparotto e colaboradores (2009) também relataram uma diminuição na atividade da GAA, após um período de armazenamento de 4 dias a 37 ° C e após um armazenamento de 11 dias em temperatura ambiente. Estes autores também observaram que a atividade enzimática reduzia 47% da atividade inicial após um período de armazenamento de 200 dias, a essa temperatura. Nossos resultados mostram que quanto maior o tempo de armazenamento, maior é a perda da atividade da GAA.

Podemos concluir que cada enzima se comporta de uma maneira diferente. Existem aquelas que não sofrem variação em sua atividade até 180 dias de armazenamento nas temperaturas estudadas (Hex t e GLA), aquelas que só vão diminuir sua atividade aos 180 dias em todas as temperaturas (ASB) ou somente a 37°C (b-gal) ou ainda aquela que diminui constantemente sua atividade a partir de 10 dias de armazenamento em todas as temperaturas (GAA).

Caso o objetivo seja medir a atividade de todas as enzimas após o mesmo tempo de armazenamento, ou seja, no mesmo papel filtro, então o melhor será armazenar o papel filtro por no máximo 10 dias em qualquer uma das temperaturas estudadas. Este tempo pode ser estendido até 180 dias em qualquer das temperaturas se formos analisar somente as atividades enzimáticas da Hex t, GLA e b-gal.

Após determinarmos os parâmetros de tempo e temperatura de armazenamento, também estudamos a possibilidade de miniaturização da técnica para a medida da atividade da GAA, ASB e GLA. Para tanto, utilizamos picotes de papel filtro de 1,2 mm ao invés de 3,0 mm de diâmetro.

Observamos que houve uma boa correlação entre a medida da atividade das 3 enzimas em amostras de 1,2 e 3,0 mm de SPF. Este resultado nos permite reduzir o tamanho da amostra e da reação em quase três vezes, o que reduz a quantidade de material a ser coletado e reduz também os custos dos testes.

Os coeficientes de variação intra e interensaio obtidos neste estudo, para todas as enzimas, estão de acordo com aqueles obtidos por Chamoles e colaboradores (2004), Olivova e colaboradores (2009) e De Jesus e

colaboradores (2009), e expressam que as metodologias aqui empregadas apresentam boa reprodutibilidade e precisão.

Após todos os objetivos anteriores terem sido alcançados, aplicamos estas técnicas aqui desenvolvidas em um protocolo para diagnóstico das seguintes DLDs: Mucopolissacaridose tipo VI (ASB), doença de Fabry (GLA), Mucopolissacaridose I (MPS I) e doença de Pompe (GAA). Seguindo este protocolo, analisamos amostras de 205 pacientes.

Todas as amostras de SPF utilizadas neste trabalho foram coletadas com heparina e armazenadas no máximo por 7 dias a 4°C, seguindo os resultados anteriores aqui obtidos.

Foram encaminhados 47 amostras para pesquisa de doença de Pompe, 77 para doença de Fabry, 53 para MPS I e 28 para MPS VI.

Após medirmos as atividades enzimáticas os resultados foram enviados para os médicos solicitantes. Quando normal, os mesmos eram aconselhados a reavaliar clinicamente o paciente e encaminhar sangue heparinizado ou biópsia de pele se julgasse necessário. Seguindo esta determinação, recebemos amostras de 12 indivíduos cuja atividade em papel filtro tinha dado normal. Nenhum destes pacientes confirmou uma DLD.

Dos 47 indivíduos encaminhados para a pesquisa de Doença de Pompe, 10 mostraram atividade enzimática diminuída em papel filtro, mas somente 5 enviaram biópsia de pele para confirmação e destes, 2 eram realmente afetados.

Dos demais 158 indivíduos cuja amostra nos foi encaminhada, 28 apresentaram atividade da GLA diminuída e 19 da IDUA. Para confirmar doença de Fabry, recebemos amostra de plasma somente de 13 pacientes



sendo diagnosticados 2 indivíduos. Já para MPS I, foram re-coletados sangue de 7 indivíduos e 2 confirmaram a deficiência enzimática.

Estes resultados nos mostram uma porcentagem de 2,9% de diagnósticos após o emprego do protocolo proposto. Esta porcentagem é superior aquela já encontrada (0,75 e 0,69%, respectivamente) por outros autores em trabalhos brasileiros para detecção destas DLDs em populações de alto risco (Coelho et al 1997 e 2001).

A inter-relação entre o laboratório e o médico ainda não é 100% satisfatória. Mesmo que entremos em contato pelos mais variados meios de comunicação não há continuidade da avaliação e alguns diagnósticos podem ser perdidos.

Os resultados mostraram que a medida em papel filtro é satisfatória para um teste de triagem em populações de alto risco. O custo desta avaliação laboratorial é menor do que se utilizássemos sangue heparinizado ou fibroblastos em uma triagem, o tempo de realização dos ensaios também é menor, o envio do material é facilitado e a manipulação das amostras envolve menos riscos para o pesquisador ou o analista laboratorial.

## V. CONCLUSÕES

### ***Conclusão Geral***

Nossos resultados indicam que é viável a utilização de amostras de sangue em papel filtro para o rastreamento de DLDs.

As amostras de SPF devem ser transportadas e armazenadas sob temperatura constante e no mais curto intervalo de tempo após a coleta.

Amostras de SPF oriundas de coletas sem anticoagulante, com heparina ou EDTA podem ser utilizadas para a determinação da atividade das enzimas hexosaminidase total,  $\beta$ -galactosidase,  $\alpha$ -glicosidase, arilsulfatase B e  $\alpha$ -galactosidase, pois não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas.

Este trabalho foi dividido em três capítulos e assim serão apresentadas as conclusões:

### ***Capítulo I:***

Não houve diferença significativa quando testamos a influência de anticoagulantes (ausência ou presença de heparina e EDTA) na medida das atividades enzimáticas para hexosaminidase total e  $\beta$ -galactosidase em amostras de sangue em papel filtro.

Podemos concluir que amostras de sangue em papel filtro, para a determinação da atividade da hexosaminidase total, podem ser armazenadas

até 180 dias nas temperaturas de 37°C, 25°C, 4°C e -20°C sem perdas significativas de atividade.

Para a enzima  $\beta$ -galactosidase podemos armazenar as amostras de sangue em papel filtro por até 180 dias nas temperaturas de 25°C, 4°C e -20°C sem perdas significativas de atividade.

## **Capítulo II:**

Não encontramos diferenças significativas quando testamos a influência de anticoagulantes (ausência ou presença de heparina e EDTA) na medida das atividades enzimáticas para  $\alpha$ -glicosidase, arilsulfatase B e  $\alpha$ -galactosidase em amostras sangue em papel filtro.

O armazenamento de SPF pode ser de até 180 dias nas temperaturas de 37°C, 25°C, 4°C e -20°C para a determinação da atividade da  $\alpha$ -galactosidase sem perda significativa da atividade enzimática.

Amostras de sangue em papel filtro para a determinação da atividade da arilsulfatase B podem ser armazenadas até 17 dias nas temperaturas de 37°C, 25°C, 4°C e -20°C sem alteração significativa da atividade enzimática.

A enzima  $\alpha$ -glicosidase foi a que apresentou a maior influência do tempo sobre a atividade enzimática. Após 10 dias de armazenamento já há perda significativa da sua atividade nas temperaturas de 37°C, 25°C, 4°C e -20°C.

Nossos resultados permitem concluir que após a miniaturização das técnicas podemos utilizar amostras menores de papel filtro (1,2 mm de

diâmetro) com redução de custos e de tempo para medir a atividade das enzimas:  $\alpha$ -glicosidase, Arilsulfatase B e  $\alpha$ -galactosidase.

O estudo de correlação realizado através dos resultados obtidos em amostras de papel filtro de 1,2mm e 3,0mm de diâmetro foi satisfatório permitindo a realização dos ensaios enzimáticos em microplacas para  $\alpha$ -glicosidase, Arilsulfatase B e  $\alpha$ -galactosidase.

### ***Capítulo III***

Após a análise de 205 amostras de indivíduos de alto risco, foi observado uma frequência de 2,9% de DLDs com a utilização do protocolo empregado.

## VI. PERSPECTIVAS

Este trabalho tem como perspectivas:

1) Realizar o mesmo estudo de efeito de anticoagulantes, tempo e temperatura sobre as enzimas beta-glicosidase, quitotriosidase e esfingomielinase.

2) Testar a correlação entre as técnicas com picotes de 1,2 mm e 3 mm para as enzimas beta-glicosidase, esfingomielinase e quitotriosidase.

3) Aplicar o protocolo desenvolvido no capítulo III para o diagnóstico das doenças de Gaucher e Niemann-Pick.

4) Estabelecer um parâmetro que permita realizar a correção da atividade encontrada em função da quantidade de amostra, como dosagem de proteína ou DNA.

5) Estabelecer uma metodologia que permita a realização da medida da atividade de várias enzimas após a extração da amostra colhida em um único picote de papel filtro.

## VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberts, B., Bray, D. *et al.* Molecular biology of the cell. 3rd ed., Garland Publishing, New York. 1994.
- Angelini, C. and Semplicini, C. Metabolic myopathies: the challenge of new treatments. Current Opinion in Pharmacology, v.10, p.1-8. 2010.
- Applegarth, D.A., Toone, J.R. *et al.* Incidence of inborn errors of metabolism in British Columbia, 1969-1996. Pediatrics. v.105, n.1, Jan. 2000.
- Ballabio, A. Disease pathogenesis explained by basic science: lysosomal storage diseases as autophagocytic disorders. Int J Clin Pharmacol Ther, v.47, p.34-38. 2009.
- Barić, I., Fumić, K. *et al.* Inborn errors of metabolism at the turn of the millennium. Croat Med J, v. 42, n.4, Aug, p.379-83. 2001 Review
- Chamoles, N., Campoy, C. *et al.* Detección de enfermedades metabólicas en un periodo de 24 años. Abstracts of 11° Latin American Congress of Genetics. Puerto Valarta, Mexico, no 418. 1994.
- Chamoles, N.A., Blanco, M. *et al.* Fabry disease: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. Clin Chim Acta, v.308, n.1-2, Jun, p.195-196. 2001.
- Chamoles, N.A., Blanco, M. *et al.* Gaucher and Niemann-Pick diseases-enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper: retrospective diagnoses in newborn-screening cards. Clin Chim Acta, v.317, n.1-2, Mar, p.191-197. 2002.
- Chamoles, N.A., Blanco, M. *et al.* Tay-Sachs and Sandhoff diseases: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper: retrospective diagnoses in newborn-screening cards. Clin Chim Acta, v.318, n.1-2, Apr, p.133-137. 2002.
- Chamoles, N.A., Niizawa, G. *et al.* Glycogen storage disease type II: enzymatic screening in dried blood spots on filter paper. Clin Chim Acta, v.347, p.97-102. 2004.
- Civallero, G., Michelin, K. *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, v.372, p.98-102. 2006.
- Coelho, J.C., Wajner, M. *et al.* Selective screening of 10,000 high-risk Brazilian patients for the detection of inborn errors of metabolism. Eur J Pediatr, v.156, n.8, Aug, p.650-4. 1997.
- Dajnoki, A., Fekete, G. *et al.* Newborn screening for Fabry disease by measuring GLA activity using tandem mass spectrometry, Clin. Chim. Acta, in press, 2010.

- De Jesus, V.R., Zhang, X.K. *et al.* Development and Evaluation of Quality Control Dried Blood Spot Materials in Newborn Screening for Lysosomal Storage Disorders, Clin. Chem, v.55, p.1158–164. 2009.
- Desnick, R.J., Ioannou, Y.A. *et al.*  $\alpha$ -Galactosidase A Deficiency: Fabry Disease. In: Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., Valle, D. (eds.) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. 8<sup>th</sup> ed., McGraw-Hill, New York. 2001.
- Desnick, R.J. and Schuchman, E.H. Enzyme replacement and enhancement therapies: lessons from lysosomal disorders. Nat Rev Genet, v.3, n.12, Dec, p.954-66. 2002.
- Dionisi-Vici, C., Rizzo, C. *et al.* Inborn errors of metabolism in the Italian pediatric population: A national retrospective survey. J Pediatr. v.140, p.321–7. 2002.
- Gasparotto, N. Tomanin, R. *et al.* Rapid diagnostic testing procedures for lysosomal storage disorders:  $\alpha$ -glucosidase and  $\beta$ -galactosidase assays on dried blood spots, Clin. Chim. Acta, v.402, p.38–41. 2009.
- Gelb, M.H., Turecek, F. *et al.* Direct multiplex assay of enzymes in dried blood spots by tandem mass spectrometry for the newborn screening of lysosomal storage disorders. J Inherit Metab Dis. v.29, n.2-3, p.397–404. 2006.
- Hirschhorn R. and Reuser A.J. Glycogen storage disease type II: acid  $\alpha$ -glucosidase (acid maltase) deficiency. In: Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., Valle, D. (eds.) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. 8<sup>th</sup> ed., McGraw-Hill, New York. 2001.
- Karam, S.M., Schwartz, I.V.D. *et al.* Erros inatos do metabolismo. In: G. Carakushansky (Ed.). Doenças Genéticas em Pediatria. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. p.153-158. 2001.
- Karam, S.M., Pires, R.F. *et al.* Esfingolipidoses. In: G. Carakushansky (Ed.). Doenças Genéticas em Pediatria. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. p.176-179. 2001.
- Kolter, T. and Sandhoff, K. Sphingolipid metabolism diseases. Biochim Biophys Acta, v.1758, p.2057-2079. 2006.
- Kornreich R., Desnick R.J. *et al.* Nucleotide sequence of the human  $\alpha$ -galactosidase A gene. Nucleic Acids Res, v.25, n.17(8), Apr, p.3301-2. 1989.
- Koskenvuo, J.W. and Kantola, I.M. Evaluating enzyme replacement therapy in Fabry disease. Arch Intern Med, v.170, n.6, p.573-574. 2010.
- Lehotay, D.C., Hall, P. *et al.* LC-MS/MS progress in newborn screening. Clin Biochem 2011, v.44, n.1, Jan, p.21-31. 2010.

- Li, Y., Scott, C.R. *et al.* Direct multiplex assay of lysosomal enzymes in dried blood spots for newborn screening. Clin Chem. v.50, n.10, Oct, p.1785-96. 2004.
- Lukacs, Z., Keil, A. *et al.* Towards quality assurance in the determination of lysosomal enzymes: A two-centre study. J. Inherit. Metab. Dis., v.26, p.571-581. 2003.
- Marsden, D. and Levy, H. Newborn Screening of Lysosomal Storage Disorders. Clin Chem, v.56, p.1071-1079. 2010.
- Meikle, P.J., Hopwood, J.J. *et al.* Prevalence of lysosomal storage disorders. JAMA. v.281, p.249–54. 1999.
- Meikle, P.J., Grasby, D.J. *et al.* Newborn screening for lysosomal storage disorders. Mol Genet Metab. v.88, p.307–14. 2006.
- Moammar, H., Cheriyan, G. *et al.* Incidence and patterns of inborn errors of metabolism in the Eastern Province of Saudi Arabia, 1983-2008. Ann Saudi Med, v.30, n.4, Jul-Aug, p271-7. 2010.
- Mueller, R.F. and Young, I.D. Biochemical genetics. In: Emery's Elements of Medical Genetics, 11<sup>th</sup> ed., New York, Churchill Livingstone. 2001.
- Neufeld, E.F. and Muenzer, J. The mucopolysaccharidoses. In: Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., Valle, D. (eds.) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. 8<sup>th</sup> ed., McGraw-Hill, New York. 2001.
- Pastores, G.M. Velaglucerase alfa, a human recombinant glucocerebrosidase enzyme replacement therapy for type 1 Gaucher disease. Curr Opin Investig Drugs, v.11, n.4, Apr, p.472-8. 2010.
- Poorthuis, B.J., Wevers, R.A. *et al.* The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. Hum Genet. v.105, p.151–6. 1999.
- Olivova, P., van der Veen, K. *et al.* Effect of sample collection on alpha-galactosidase A enzyme activity measurements in dried blood spots on filter paper, Clin. Chim. Acta. v.403, n.1-2, Feb, p.159-62. 2009.
- Sanderson, S., Green, A. *et al.* The incidence of inherited metabolic disorders in the West Midlands, UK. Arch Dis Child. v.91, p.896–9. 2006.
- Saudubray, J. and Charpentier, C. Clinical Phenotypes: Diagnosis/Algorithms. In: Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., Valle, D. (eds.) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. 8<sup>th</sup> ed., McGraw-Hill, New York. 2001.
- Severini, M.H., Silva, C.D. *et al.* High frequency of type 1 GM1 gangliosidosis in southern Brazil. Clin Genet. v.56, n.2, Aug, p.168-9, 1999.
- Schiffmann, R. Therapeutic approaches for neuronopathic lysosomal storage disorders. J Inher Metab Dis. v.33, p.373-379. 2010.



Schulze, A., Lindner, M. *et al.* Expanded newborn screening for inborn errors of metabolism by electrospray ionization-tandem mass spectrometry: results, outcome, and implications. Pediatrics. v.111, p.1399–406. 2003.

Schwartz, I.V.D., Matte, U.S. *et al.* Mucopolissacaridoses. In: G. Carakushansky (Ed.). Doenças Genéticas em Pediatria. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. p.180-184. 2001.

Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W. S., Valle, D. (eds.) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. 8<sup>th</sup> ed., McGraw-Hill, New York. 2001.

Shabbeer, J., Yasuda. M. *et al.* Fabry disease: 45 novel mutations in the alpha-galactosidase A gene causing the classical phenotype. Mol Genet Metab, v.76, p.23-30. 2002.

Suzuki, Y., Oshima, A. *et al.* Beta-galactosidase deficiency (beta-galactosidosis): GM1 gangliosidosis and Morquio B disease. In: Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., Valle, D. (eds.) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. 8<sup>th</sup> ed., McGraw-Hill, New York. 2001.

Umapathysivam, K., Hopwood, J.J. *et al.* Determination of acid alpha-glucosidase activity in blood spots as a diagnostic test for Pompe disease. Clin Chem, v.47, n.8, Aug, p.1378-83. 2001.

Valayannopoulos, V., Nicely, H. *et al.* Mucopolysaccharidosis VI. Orphanet J Rare Dis. v.12, n.5, Apr, p.5. Review. 2010.

Wilcox, W.R. Lysosomal storage disorders: the need for better pediatric recognition and comprehensive care. J Pediatr. v.144(5 Suppl): S3-14, May. 2004.

Wozniak, M.A., Kittner, S.J. *et al.* Frequency of unrecognized Fabry disease among young European-American and African-American men with first ischemic stroke. Stroke. v.41, n.1, Jan, p.78-81. 2010.

#### Referência Eletrônica:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>: OMIM – Online Mendelian Inheritance in Man – página acessada em 02/03/2011.

## VIII. ANEXOS

### VIII.1 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Voluntário N° \_\_\_\_\_

Vimos através deste convidar você a participar do trabalho cujo objetivo é implantar técnicas de diagnóstico de doenças lisossômicas de depósito adaptadas para amostras de sangue impregnado em papel filtro, dentro do projeto "Medida da atividade de hidrolases lisossômicas em sangue colhido em papel filtro, uma alternativa para triagem em populações de alto risco. ".

Está sendo solicitada a doação de 10mL de sangue periférico. O desconforto causado, será somente o de uma coleta de sangue. Os dados advindos com a sua doação são de importância científica relevante para o estabelecimento de novas formas de diagnóstico na área de doenças lisossômicas de depósito. O material será única e exclusivamente utilizado para fins do projeto de pesquisa, sendo garantida a confidencialidade das informações obtidas, sendo reservado ao doador acesso às mesmas.

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

_____	_____	_____
Assinatura do voluntário	Nome	Data

_____	_____	_____
Assinatura do pesquisador	Nome	Data

Pesquisador responsável: Profa. Dra. Janice Coelho (SGM/HCPA – fone: 21018309)

Pesquisadora: Msc Cristina Dickie de Castilhos ( fone: 9912-2700)

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Voluntário Paciente Nº \_\_\_\_\_

Vimos através deste convidar você a participar do trabalho cujo objetivo é implantar técnicas de diagnóstico de doenças lisossômicas de depósito adaptadas para amostras de sangue impregnado em papel filtro, dentro do projeto "Medida da atividade de hidrolases lisossômicas em sangue colhido em papel filtro, uma alternativa para triagem em populações de alto risco. ".

Está sendo solicitada a doação de 10mL de sangue periférico. O desconforto causado, será somente o de uma coleta de sangue. Os dados advindos com a sua doação são de importância científica relevante para o estabelecimento de novas formas de diagnóstico na área de doenças lisossômicas de depósito. O material será única e exclusivamente utilizado para fins do projeto de pesquisa, sendo garantida a confidencialidade das informações obtidas, reservando ao paciente ou familiares acesso as mesmas.

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

_____	_____	_____
Assinatura do voluntário	Nome	Data
_____	_____	_____
Assinatura do pesquisador	Nome	Data

Pesquisador responsável: Profa. Dra. Janice Coelho (SGM/HCPA – fone: 21018309)

Pesquisadora: Msc Cristina Dickie de Castilhos ( fone: 9912-2700)

**VIII.2****LISTA DE ABREVIATURAS**

ASB	Arilsulfatase B
b-gal	beta-galactosidase
CV	Coeficiente de variação
DLDs	Doenças Lisossômicas de Depósito
DF	Doença de Fabry
EDTA	Etilenodiaminotetracético
EIM	Erros Inatos do Metabolismo
GAA	$\alpha$ -glicosidase ácida
GAGs	Glicosaminoglicanos
GLA	$\alpha$ -galactosidase
GM1	Gangliosídeo 1
GM2	Gangliosídeo 2
Hex t	Hexosaminidase total
IDUA	$\alpha$ -iduronidase
MPS	Mucopolissacaridose
MPS I	Mucopolissacaridose tipo I
MPS VI	Mucopolissacaridose tipo VI
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
SPF	Sangue impregnado em papel filtro
T0	Tempo 0 – dia da coleta
T180	Tempo 180 – cento e oitenta dias após a

coleta

### **VIII.3      LISTA DE FIGURAS**

**Fig.1** – Degradação de glicoesfingolípídios nos lisossomos humanos:  
enzimas envolvidas e enzimas relacionadas às doenças de depósito.....12

**VIII.4 LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Classificação das MPS: enzimas envolvidas e GAGs relacionados às  
doenças de depósito ..... 16