



Comparação entre a medida da atividade da enzima alfa-glicosidase ácida em amostras de sangue impregnado em papel filtro de controles saudáveis e pacientes com Doença de Pompe

MEZZALIRA, Jamila¹; CASTILHOS, Cristina Dickie¹; COELHO, Janice Carneiro ¹

1) Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo - Doenças Lisossômicas de Depósito, Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS.

jamimezzalira@hotmail.com

Introdução

A Doença de Pompe (DP), também conhecida como doença de armazenamento de glicogênio tipo II, é uma DLD de herança autossômica recessiva, rara e progressiva. Nesta DLD, a enzima alfa-D-glicosidase ácida encontra-se deficiente, gerando um acúmulo de glicogênio nos lisossomos das células, principalmente do tecido muscular, e com isso, o aparecimento das lesões e sintomas clínicos. O diagnóstico precoce da DP, assim como das demais DLDs, é uma etapa essencial para que os tratamentos em desenvolvimento sejam mais eficazes, visto que a Terapia de Reposição Enzimática para DP já está disponível. Para isso, tem-se desenvolvido métodos de triagem onde a medida da atividade das enzimas lisossomais é realizada de forma direta em amostras de sangue impregnado em papel filtro (SPF).

Objetivo

Comparar a atividade da GAA em amostras de SPF de controles saudáveis e pacientes com DP de modo a observar se SPF é um bom material para triagem desta doença.

Materiais e Métodos

Foram utilizadas amostras de SPF, de controles saudáveis e pacientes com DP, nas quais realizamos a medida da atividade da enzima alfa-glicosidase ácida através da técnica miniaturizada em placas de 96 poços. A medida da atividade enzimática foi determinada por meio de ensaios fluorimétricos utilizando o substrato produzido artificialmente com o radical 4-metilumbeliferil, (denominado 4-metilumbeliferil- α -D- glicopiranosídeo) e acarbose como inibidor da alfa-glicosidase neutra. As incubações foram realizadas em incubadora com agitação e a fluorescência (365nm excitação e 450nm emissão) lida em fluorômetro com leitor de placas (SpectraMax Gemini XPS – Molecular Devices–M5).

Resultados

A atividade média da enzima em controles saudáveis foi $10,06 \pm 5,83$ nmol/20h/mL, enquanto para pacientes com DP a atividade média foi $0,089 \pm 0,1487$, demonstrando uma diferença significativa entre os grupos analisados ($p < 0,05$), podendo ser claramente diferenciados por não haver sobreposição entre os valores encontrados para as atividades da enzima.

Os resultados foram comparados usando o teste t de Student para amostras não pareadas entre grupos de indivíduos saudáveis e pacientes. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

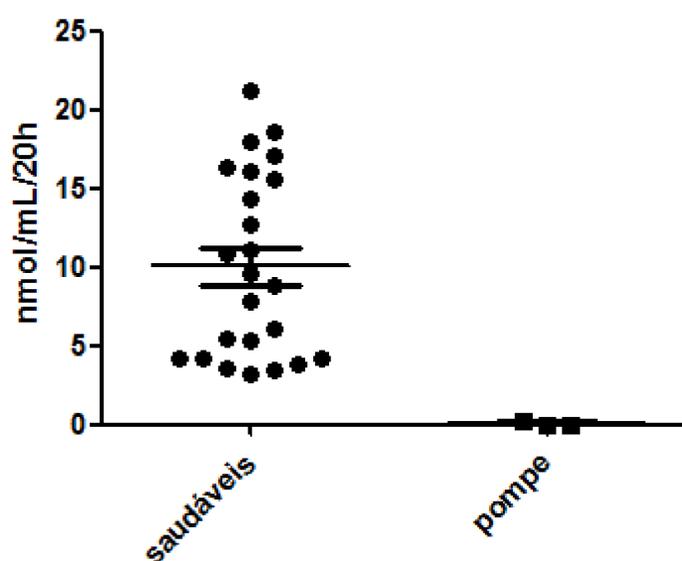


Figura 1. Atividade da GAA em sangue colhido em papel filtro (nmol/20h/mL) de controles saudáveis e pacientes com Doença de Pompe. Os resultados são expressos em média \pm desvio padrão. $p < 0,05$ comparado com o controle (teste t de Student). Valor de referência: 5-15 nmol/20h/mL.

Conclusão

Desta forma, nossos dados permitem concluir que SPF é um ótimo material para testes de triagem, e o uso desta técnica diminuirá os custos do ensaio bem como aumentará o número de amostras a serem analisadas em um mesmo tempo de reação.