

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL FACULDADE DE
MEDICINA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS
MÉDICAS**

**TRIAGEM NEONATAL PARA DOENÇAS LISOSSÔMICAS EM
AMOSTRAS DE SANGUE IMPREGNADO EM PAPEL FILTRO**

Fernanda Bender

Porto Alegre - RS

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL FACULDADE DE
MEDICINA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS
MÉDICAS**

**TRIAGEM NEONATAL PARA DOENÇAS LISOSSÔMICAS EM AMOSTRAS
DE SANGUE IMPREGNADO EM PAPEL FILTRO**

Fernanda Bender

Orientador: Prof. Dr. Roberto Giugliani

Tese apresentada como requisito para obtenção de título de Doutor em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre, 2018

DEDICATÓRIA

Ao Diego e Arthur, meus amores.

AGRADECIMENTOS

Devo agradecimentos para muitos que participaram no desenvolvimento desse projeto direta e indiretamente e em especial:

Ao Roberto, por ter me aceito como aluna, pela confiança, pelo apoio e pelos aprendizados necessários que obtive deste projeto e por acreditar na minha capacidade, incentivando-me a alcançar meus objetivos.

À Maira Burin, pelo apoio e revisão dos trabalhos no desenvolvimento desse projeto.

À Kristiane Tirelli, pela amizade, minha colega vizinha de bancada do laboratório sempre com um sorriso no rosto, pelo apoio e auxílio no desenvolvimento dos ensaios enzimáticos e pela revisão dos trabalhos no desenvolvimento desse projeto.

À Francyne Kubaski, pelos auxílios científicos que foram fundamentais e pela grande amizade que fizemos dando ótimos momentos de convívio e ótimas lembranças.

Aos meus colegas e amigos do laboratório dos Erros Inatos do metabolismo, Ana Paula, Fernanda Medeiros, Fernanda Bitencourt, Juarez, Inamara e Cléa, pela amizade que fiz e pela colaboração e auxílios que todos tiveram durante esse período.

Ao Gabriel Civallero, pela ajuda na padronização das técnicas realizadas em microplaca.

À Heydy Bravo, pelo auxílio, apoio e sua disponibilidade.

À Ana Carolina, pelo apoio, coleguismo e amizade que construímos.

À Cláudia Vanzella, pelos auxílios nas etapas burocráticas com o desenvolvimento do projeto.

Aos colegas da Pesquisa Clínica, pelo apoio e carinho de todos.

Ao Célio, que me auxiliou a resolver assuntos burocráticos e sempre estava disposto para isso.

A Marilda, sempre humorada e cheia de alegria me apoiando, pelos cuidados e responsabilidade com a limpeza do material utilizado nos experimentos.

À todo o pessoal do Serviço de Genética Médica, pelo convívio do dia a dia, trocas de experiências e aprendizados que tive com muitos.

Ao INAGEMP, que proporcionou os auxílios financeiros na realização desse projeto.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela oportunidade em obter este título.

À UFRGS e seus excelentes professores.

À CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado.

À Casa Hunter, pelo auxílio nos envios do material biológico.

A todos meus amigos, pelo incentivo, apoio e por entenderem a minha ausência.

Aos meus pais José e Irene, me apoiaram sempre principalmente nesse período final e entenderam minha ausência.

À minha irmã Juliane e meu sobrinho Pedro, por terem me apoiado e incentivado nesse período.

À Magda, pelo carinho e incentivo com a minha pesquisa. E por ter cuidado muitas vezes do meu filho para poder me dedicar no projeto.

Ao Diego, por estar ao meu lado e ter-me incentivado, pelo seu carinho e compreensão, principalmente nas horas mais difíceis, por ter se dedicado e cuidado do nosso filho nas minhas ausências.

Ao meu filho Arthur, que me incentivou muito através da energia que tem, seus olhares observadores e as curiosidades que demonstra no seu dia a dia.

RESUMO

Introdução: As doenças lisossômicas (DL) são um grupo de condições caracterizadas por um defeito genético que leva à deficiência de enzimas ou proteínas lisossômicas. Pacientes com DL usualmente acumulam nos tecidos e órgãos os substratos (não degradados ou parcialmente degradados) de enzimas lisossômicas específicas, deficientes no interior das células. Este acúmulo causa um impacto anatômico e/ou funcional em uma ou mais áreas do organismo. Dependendo da doença, os pacientes podem manifestar alterações progressivas que podem iniciar desde o nascimento até a idade adulta e duram por toda a vida. Algumas delas podem ser tratadas por terapia de reposição enzimática, que consiste na aplicação periódica de uma enzima recombinante, parecida com aquela que o paciente não produz de forma adequada, por terapia de redução de substrato ou por outras estratégias. Há várias evidências que sugerem que o tratamento precoce tem vantagens. Com a triagem neonatal tornou-se possível o diagnóstico precoce de diversas doenças e a prevenção de seqüelas graves com a introdução de um tratamento adequado ainda numa etapa pré-sintomática, alterando a história natural das doenças detectadas. Os métodos presentemente propostos para triagem neonatal se baseiam principalmente no uso de espectrometria de massas *in tandem*, o que exige um equipamento de alto custo de aquisição e de manutenção, disponível em poucos centros. **Objetivo:** O presente projeto tem o objetivo de avaliar uma metodologia de triagem alternativa, baseada na adaptação de ensaios enzimáticos fluorométricos convencionais, utilizando sangue impregnado em papel filtro coletado para o “teste do pezinho”. Avaliaremos também a utilidade da pesquisa de metabólitos selecionados em amostras de urina de recém-nascidos, como um método de triagem isolado ou adicional. **Métodos:** As DL selecionadas foram as mucopolissacaridoses (MPS) tipos I, II e VI, a doença de Fabry, a doença de Gaucher, a doença de Pompe e a doença de Niemann-Pick tipo C. Essas condições foram escolhidas por já terem terapias específicas aprovadas no Brasil. **Resultados e Conclusões:** Foram analisadas um total de 834 amostras com resultados satisfatórios e uma margem de poucos falsos positivos com exceção da técnica para doença de Pompe. O presente trabalho mostrou que a utilização de amostras de SIFP para o diagnóstico bioquímico, utilizando os micrométodos fluorimétricos num programa de TN é viável e pode ser incorporado por laboratórios de referência, para identificar pacientes com doenças de Gaucher, Fabry, Pompe, MPS I, II, VI. Com esses resultados podemos concluir que a metodologia desenvolvida para a triagem neonatal de DL é eficiente para a detecção precoce, assim como o início do tratamento, mudando assim, o curso da doença e uma melhor qualidade de vida aos pacientes. Os resultados mostraram a possibilidade de disponibilizar uma alternativa ao mesmo tempo factível e custo-eficiente para facilitar a implementação da triagem neonatal das DL tratáveis no Brasil.

Palavras Chave: Erros inatos do metabolismo, doenças lisossômicas, ensaios bioquímicos, sangue impregnado em papel filtro.

ABSTRACT

Background: Lysosomal storage disorders (LSD) are a group of genetic disorders caused by deficiency of lysosomal enzymes or lysosomal proteins. Patients with LSD usually have storage of undegraded or partially degraded substrates of lysosomal enzymes. This storage causes anatomical and or functional changes in several organs and tissues. According to the specific disease groups, patients can have progressive symptoms that can start at the newborn period throughout adulthood. Some of these disorders can be treated by enzyme replacement therapy, that is characterized by periodical infusions of the recombinant enzyme; they can also be treated by substrate reduction therapy or other strategies. There are several reports showing that early treatment has better outcome. Due to the newborn screening, it is now possible to diagnose at earlier stages diseases with progressive course by which early treatment can prevent irreversible disease manifestations with early treatment at asymptomatic disease stages which modifies the natural history of these disorders. Majority of the methods currently used for newborn screening are based on the use of tandem mass spectrometry, which requires a high cost equipment not largely available. **Aims:** this study aims to evaluate an alternative methodology for newborn screening by the use of conventional fluorimetry in dried blood spots from the newborn screening. Additional methods will be evaluated in urine of newborns for selected biomarkers. **Methods:** The selected LSDs were: mucopolysaccharidosis (MPS) type I, II and VI, Fabry, Gaucher, Pompe and Niemann-Pick disease. These conditions were selected because they already have approved treatment in Brazil. **Results and conclusions:** 834 newborn samples were analyzed with very little false positives with the exception of Pompe disease. This study showed that a fluorimetric assay can be used in dried blood spots for early diagnosis which will allow early treatment enabling a change in natural history and in the quality of life of the patients. These results showed the feasibility of an alternative, cost-effective approach to help the implementation of LSD in the newborn screening.

Key Words: Inborn errors of metabolism, lysosomal diseases, newborn screening, dried blood spots

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Fluxograma da estratégia de busca de referências bibliográficas.....	17
Figura 2 Composição dos GAGs	23
Figura 3 Protocolo bioquímico para investigação das MPS do LEIM	26
Figura 4 Distribuição demográfica e prevalência de nascidos vivos das MPS	28

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 As DL com diagnósticos mais frequentes do LEIM de 1982 a 2018.....	20
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Classificação das doenças lisossômicas.....	21
Tabela 2 Classificação das mucopolissacaridoses.....	24
Tabela 3 Critérios de inclusão de doenças para triagem neonatal.....	43

LISTA DE ABREVIADURAS E SIGLAS

AR - Autossômica recessiva
ARSB – Arilsulfatase B
ASM - Esfingomielinase Ácida
CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEP- Comitê de Ética em Pesquisa
ChT – Quitotriosidase
CHIT1 – Gene da Quitotriosidase
CS – Condroitn Sulfato
CTN – Centro de Triagem Neonatal
DF – Doença de Fabry
DG – Doença de Gaucher
DL - Doença Lisossômica
DS- Dermatan Sulfato
DMB - 1,9-dimetil-metileneblue
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
DNJ - N-butil-desoxinojirimicina
DNP – Doença de Niemann Pick
DP – Doença de Pompe
DPN - Diagnóstico pré-natal
EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
EIM - Erros Inatos do Metabolismo
GAG- Glicosaminoglicanos
GL – Glicoesfingolípídeos
GBA1 - Gene da Beta Glicocerebrosidase
Gb3 - Globotriaosilceramida
HS – Heparan Sulfato
HCPA - Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HMIPV – Hospital Materno Infantil Presidente Vargas
IDUA - α -I-iduronidase
IDS - iduronato-2-sulfatase
INAGEMP- Instituto Nacional de Genética Médica Populacional
LGM – Laboratório de Genética Molecular

LEIM - Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo

Mb - Megabase

MPS – Mucopolissacaridose

MPS I – Mucoplissacaridose tipo I

MPS II – Mucopolissacaridose tipo II

MPS III - Mucopolissacaridose tipo III

MPS IV - Mucopolissacaridose tipo IV

MPS VI - Mucopolissacaridose tipo VI

MPS VII - Mucopolissacaridose tipo VII

MPS VII - Mucopolissacaridose tipo IX

NGS - *Next Generation Sequencing*

NPC1 – Gene da Niemann Pick tipo C1

NPC2 - Gene da Niemann Pick tipo C2

Pb – pares de base

PUC - Pontifícia Universidade Católica

QS – Queratan Sulfato

RLX - Recessiva Ligada ao Cromossomo X

RN - Recém-Nascido

SCIELO - Scientific Electronic Library Online

SGM – Serviço de Genética Médica

SIPF - Sangue Impregnado em Papel-Filtro

SMPDI – Gene da doença de Niemann Pick tipo A e B

SNC – Sistema Nervoso Central

SPSS - Statistical Package for the Social Sciences

SUS – Sistema Único de Saúde

TCTH - Transplante Células-Tronco Hematopoéticas

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TG - Terapia Gênica

TN – Triagem Neonatal

TMS – Espectrometria de massa *in Tandem*

TMO - Transplante de Medula Óssea

TRE - Terapia de Reposição Enzimática

TRS - Terapia de Redução de Substrato

UIPF – Urina Impregnada em Papel Filtro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO.....	17
2.2 DOENÇAS LISSÔMICAS.....	18
2.2.1 Mucopolissacaridoses	22
2.2.2 Mucopolissacaridose tipo I.....	29
2.2.3 Mucopolissacaridose tipo II.....	31
2.2.4 Mucopolissacaridose tipo VI.....	33
2.2.5 Doença de Fabry.....	34
2.2.6 Doença de Gaucher.....	35
2.2.6.1 Biomarcador para DG.....	36
2.2.7 Doença de Pompe.....	37
2.2.8 Doença de Niemann Pick	39
2.3 TRIAGEM NEONATAL.....	41
2.3.1 Triagem Neonatal para DL.....	43
3. JUSTIFICATIVA	46
4. HIPÓTESES	50
5. OBJETIVOS	52
5.1 Objetivos Gerais	52
5.2 Objetivos Específicos.....	52
6. REFERÊNCIAS	54
7. ARTIGO.....	69
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	85
9. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	87
10. ANEXOS.....	89

1. INTRODUÇÃO

Os erros inatos do metabolismo (EIM) são formados por um grupo heterogêneo de doenças genéticas raras, caracterizadas pela presença de mutações patogênicas em genes que codificam enzimas envolvidas em alguma rota do metabolismo (de Souza *et al.*, 2010). As doenças lisossômicas (DL) são um grupo dentro dos EIM de distúrbios genéticos distintos, cada um dos quais é o resultado de um defeito específico em uma enzima lisossômica. As DL representam um grupo de cerca de 50 desordens hereditárias devido a deficiências de proteínas lisossomais. Esse armazenamento de metabólitos causa várias falhas de órgãos e morte prematura (Tebani *et al.*, 2017).

As duas primeiras doenças descritas e posteriormente reconhecidas como DL foram a doença de Gaucher em 1882 e a doença de Fabry em 1898. Ambas as doenças apresentavam semelhanças significativas. As características comuns das DL incluem anormalidades ósseas, organomegalia e distúrbios do sistema nervoso central e periférico (Mehta *et al.*, 2006).

Outro exemplo são as mucopolissacaridoses (MPS) que são DL e fazem parte de um grupo de doenças metabólicas hereditárias causadas por EIM dos glicosaminoglicanos (GAGs). O acúmulo de GAGs em vários órgãos e tecidos nos pacientes afetados pelas MPS resulta em uma série de sinais e sintomas, integrantes de um quadro clínico multissistêmico que compromete ossos e articulações, vias respiratórias, sistema cardiovascular e muitos outros órgãos e tecidos, incluindo, em alguns casos, as funções cognitivas (Neufeld e Muenzer, 2014).

O tratamento específico para as DL é a terapia de reposição enzimática (TRE) disponível no Brasil para as seguintes doenças: Gaucher, Fabry, Pompe, Niemann Pick C, MPS tipo I, II, IV e VI (Federhen *et al.*, 2014). O diagnóstico precoce dos pacientes é importante para um melhor prognóstico nos tratamentos. Os programas de triagem neonatal para as DL em amostras de sangue impregnado em papel filtro (SIPF) são fundamentais para auxiliar na identificação precoce dessas doenças.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Esta revisão foi focada em informações sobre as seguintes doenças lisossômicas: Mucopolissacaridoses tipo I, tipo II, tipo VI, doença de Fabry, doença de Gaucher, doença de Pompe e a doença de Niemann Pick C, em relação aos aspectos relacionados às manifestações clínicas, o diagnóstico e o tratamento precoce. Como estratégia de busca as seguintes bases de dados foram utilizadas: PubMed, SCIELO e banco de teses da CAPES e livros de didáticos no período de 1984 a 2018. As buscas foram realizadas através dos termos “Inborn Errors of Metabolism”, “Lysosomal Diseases”, “Newborn Screening”, “Dried Blood Spots”, “Mucopolysaccharidosis I, II and VI”, “Fabry disease”, “Gaucher disease”, “Pompe disease”, “Niemann-Pick type C”.

Foram revisados 183 abstracts, dos quais 160 artigos foram selecionados. Na primeira busca, os artigos mais recentes foram estudados e a partir destes, os artigos mais antigos foram selecionados das referências dos primeiros, por serem considerados relevantes. Com o objetivo de facilitar a revisão da literatura, os artigos foram selecionados por doenças e o resultado da busca de referências bibliográficas está resumido na Figura 1.

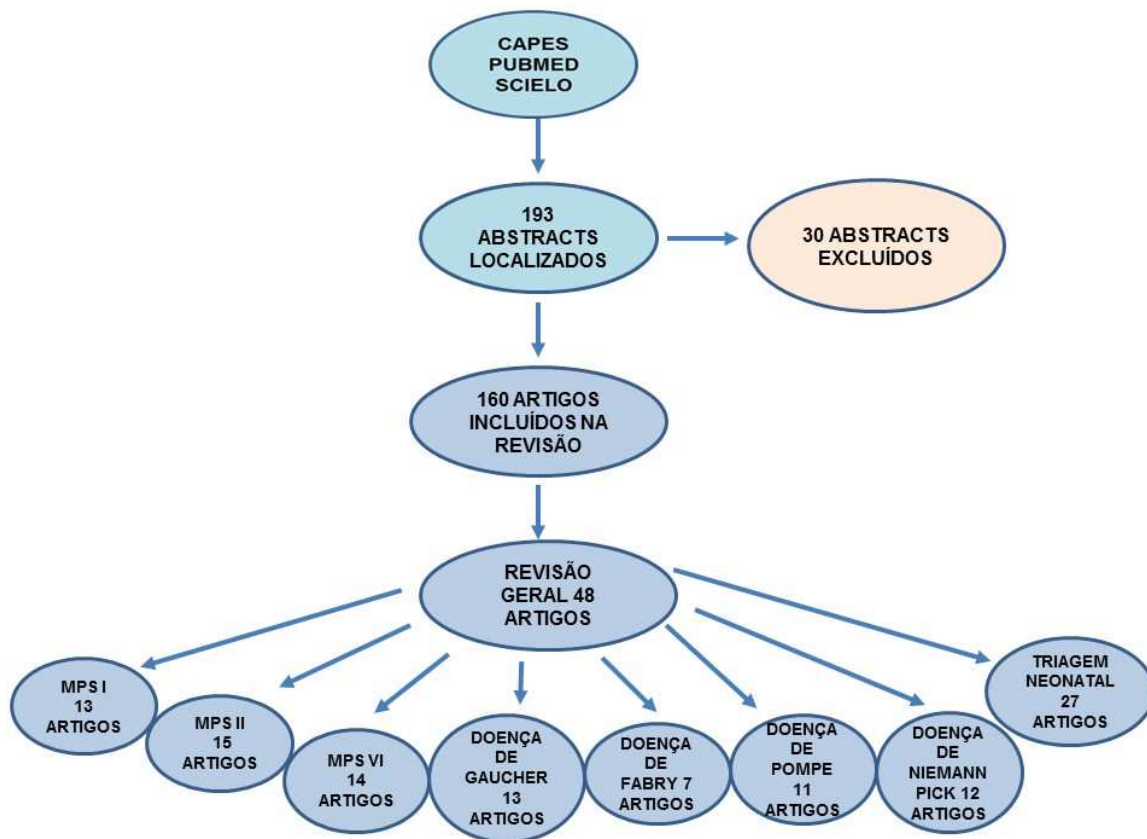


Figura 1. Fluxograma da estratégia de busca de referências bibliográficas

2.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO

Os erros inatos do metabolismo (EIM) são um grupo de doenças geneticamente determinadas, decorrentes de deficiência em alguma via metabólica que está envolvida na síntese, transporte ou na degradação de uma substância. As manifestações clínicas podem ser decorrentes do acúmulo do substrato de uma reação, da falta de produto dessa mesma reação e ainda do acúmulo de uma substância originada de uma via metabólica alternativa (Sainz *et al.*, 2002).

As doenças metabólicas constituem apenas cerca de 10% de todas as doenças genéticas, sendo que a maioria delas tem herança autossômica recessiva. Esse percentual corresponde a cerca de 1000 distúrbios conhecidos, ocorrendo aproximadamente em 1 a cada 800 nascidos vivos. (Saudubray *et al.*, 2018).

Os EIM são classificados em três diferentes grupos de acordo com suas características fisiopatológicas e fenótipo clínico (Martins, 1999 / 2003, Souza, 2002, Sainz, 2002):

Grupo I: Distúrbios de síntese ou catabolismo de moléculas complexas. Neste grupo estão presentes as doenças lisossômicas, que são as mucopolissacaridoses e as esfingolipidoses. Apresentam sintomas permanentes que tendem a acentuar com o passar do tempo, como fácies características, dismorfias, visceromegalias, neurodegeneração, entre outros, respeitando a localização do acúmulo.

Grupo II: Erros inatos do metabolismo intermediário que culminam em intoxicação aguda ou crônica. As doenças metabólicas enquadradas nesse grupo compreendem as aminoacidopatias, os defeitos dos ácidos orgânicos e do ciclo da uréia e as intolerâncias aos açúcares. Caracterizam-se por apresentarem intervalos livres de sintomas e relação evidente com o aporte alimentar. As manifestações levam, de maneira geral, à intoxicação aguda e recorrente ou crônica e progressiva.

Grupo III: Deficiência na produção ou utilização de energia. Inclui doenças cuja clínica é decorrente de alterações de produção e consumo energéticos. Em sua maioria, são provenientes de distúrbios do fígado, miocárdio, músculo e cérebro. As manifestações costumam se apresentar através de hipoglicemia, hipotonia generalizada, miopatia, insuficiência cardíaca, retardo de crescimento e até morte súbita, entre outros sintomas. Exemplos desse grupo são as glicogenoses, hiperlactemias congênitas, doenças mitocondriais da cadeia respiratória e defeitos na oxidação de ácidos graxos.

2.2 DOENÇAS LISSÔMICAS

As doenças lisossômicas (DL) são um grupo de EIM que resultam da deficiência de alguma enzima específica, ativador proteico ou proteína de transporte, conduzindo ao acúmulo dos substratos no lisossomo (organelas

citoplasmáticas importantes para a digestão de moléculas) e provocando mudanças bioquímicas específicas e sintomas característicos (Targer *et al.*, 1984).

No final dos anos 1950 e início dos anos 1960, Christian de Duve e seus colegas, usando técnicas de fracionamento celular, estudos citológicos e análises bioquímicas, identificaram e caracterizaram o lisossomo como uma organela celular responsável pela digestão intracelular e reciclagem de macromoléculas (de Duve C.; 1959, 1983).

As DL representam um grupo que inclui mais de 50 doenças genéticas com suas distintas características (Bellettato, 2010). Mesmo sendo individualmente raras, quando somadas apresentam uma incidência estimada ao redor de 1:7.700 nascidos vivos (Meikle, 1999).

No Brasil a incidência real das DL não é conhecida. Em um estudo realizado no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo (LEIM) do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (LEIM/SGM-HCPA), as DL correspondiam a 59,8% dos EIM diagnosticados do período de 1982 a 2015 (Giugliani, *et al.*, 2017).

Até hoje as DL são as de maior frequência de todos os diagnósticos realizados no LEIM (Quadro 1). O LEIM por ser um laboratório de referência em DL recebe muitas amostras de casos já direcionados e ou com suspeita de alguma DL. As procedências dessas amostras são de todo o Brasil e de outros países como: Arábia Saudita, Argélia, Argentina, Bolívia, Chile, Colômbia, Cuba, Dubai, Emirados Árabes Unidos, Equador, Guatemala, Irã, Japão, México, Omã, Panamá, Paraguai, Peru, Portugal, Qatar e Uruguai.

Quadro 1. As DL com diagnósticos mais frequentes do LEIM de 1982 a 2018

Tipo de DL	Número de diagnósticos
Doença de Gaucher	778
Mucopolissacaridose tipo II	431
Mucopolissacaridose tipo VI	290
Mucopolissacaridose tipo I	265
Niemann Pick	226
Mucopolissacaridose tipo IVA	197
Doença de Fabry	110
Mucopolissacaridose tipo IIIB	107
Mucopolissacaridose tipo IIIA	70
Mucopolissacaridose tipo IIIC	68
Doença de Pompe	55

De acordo com o tipo de substrato que se acumulam, as DL podem ser classificadas em diferentes grupos, tais como as esfingolipidoses, as glicoproteínoses e as mucopolissacaridoses (Tabela 1). Nesses grupos, as doenças que se destacam com diagnóstico mais frequente são: Fabry, Gaucher, Niemann-Pick A B e C, Pompe e as Mucopolissacaridoses (que se subdividem em MPS I, MPS II, MPS III, MPS IV, MPS VI e MPS VII).

Tabela 1: Classificação das doenças lisossômicas (adaptada de Saudubray & Col, 1995)

Tipo	Doenças (exemplos)
Mucopolissacaridoses (MPS)	MPS I (Síndrome de Hurler, Hurler – Scheie e Scheie) MPS II (Síndrome de Hunter) MPS III A, B, C ou D (Síndrome de Sanfilippo A, B, C ou D) MPS IV A ou B (Síndrome de Morquio A ou B) MPS VI (Síndrome de Maroteaux – Lamy) MPS VII (Síndrome de Sly)
Esfingolipidoses	Gangliosidose GM1 Doença de Tay - Sachs doença de Sandhoff Doença de Fabry Doença de Gaucher Doença de Farber Doença de Niemann-Pick A e B Doença de Krabbe Leucodistrofia Metacromática Deficiência Múltipla de Sufatases
Mucolipidoses	Mucolipidoses II e III
Glicoproteinoses	Fucosidose Manosidoses (alfa ou beta) Sialidose Aspartilglicosaminúria
Distúrbios do transporte da membrana	Doença de depósito do Ácido Siálico Doença de Salla Cistinose
Outras	Doença de Pompe Doença de Niemann-Pick C

As manifestações clínicas das doenças lisossômicas são bastante diversas, embora geralmente apresentem um caráter crônico e progressivo, sendo decorrentes do acúmulo do substrato que se encontra em quantidade superior ao normal em função de uma deficiência enzimática. Muitas dessas doenças ainda apresentam um fenótipo morfológico, produzindo organomegalias e face infiltrada e podem apresentar um fenótipo neurológico, caracterizado pela presença de regressão neuropsicomotora (Schwartz *et al.*, 2008).

Essas manifestações podem ocorrer na infância ou na idade adulta, dependendo da gravidade da doença. O diagnóstico pode ser tardio, visto que em alguns casos essas manifestações podem ter uma evolução lenta (levando meses ou anos); contudo, na maioria das vezes esses casos são isolados, ou seja, não apresentam história familiar prévia (Pastores e Hughes, 2015).

Algumas das doenças lisossômicas são tratadas por terapia de reposição enzimática (TRE), que consiste na aplicação periódica de uma enzima recombinante similar àquela que o paciente não produz em quantidade suficiente e cuja deficiência é responsável pelo quadro clínico. O prognóstico irá depender da idade do paciente no início do tratamento e da resposta terapêutica (de Souza MV, *et al.*, 2010).

2.2.1 Mucopolissacaridoses

As mucopolissacaridoses (MPS) são doenças genéticas graves, causadas pela deficiência de enzimas lisossômicas específicas que afetam o catabolismo de glicosaminoglicanos (GAG). Os GAGs são polímeros lineares longos, não flexíveis e com cadeias não ramificadas, e têm como base unidades dissacarídicas repetidas (Figura 2). O acúmulo de GAG em vários órgãos e tecidos de pacientes com MPS apresentam muitos achados em comum, doença crônica e progressiva, o comprometimento multissistêmico, principalmente esquelético, cardiopulmonar, da córnea, do fígado, do baço, do cérebro e das meninges (Azevedo *et al.*, 2004; Giugliani *et al.*, 2010).

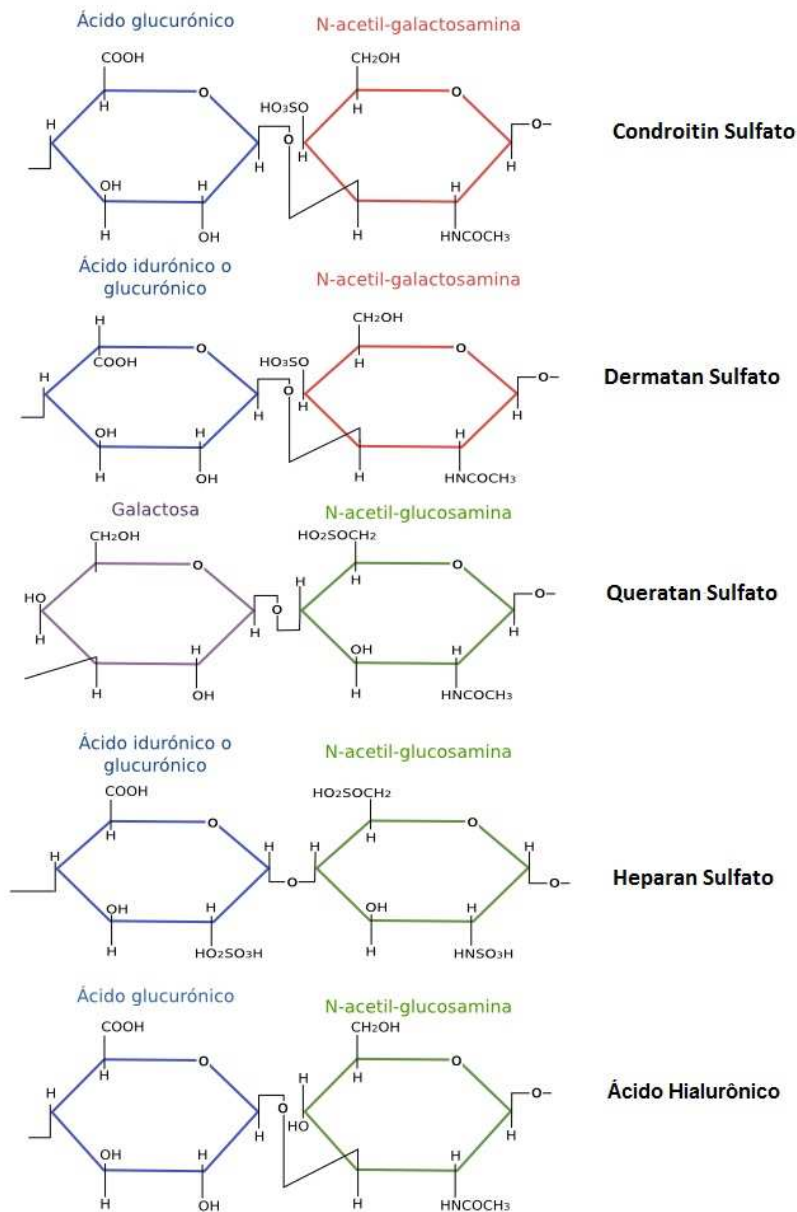


Figura 2. Estrutura dos GAGs. (adaptado de: https://mmegias.webs.uvigo.es/5-celulas/2-componentes_glucidos.php#glicosaminoglicos)

Existem 11 enzimas conhecidas envolvidas no catabolismo de dermatan sulfato (DS), heparan sulfato (HS), queratan sulfato (QS), condroitin sulfato (CS) e ácido hialurônico (Tabela 2). A deficiência enzimática específica bloqueia a degradação dos GAGs, que por sua vez acumulam nas células levando à disfunções severas de órgãos e tecidos (Lin *et al.*, 2018).

Tabela 2. Classificação das mucopolissacaridoses (adaptada de Neufeld & Muenzer, 2001).

Tipo de MPS	Epônimo	Herança	GAGs na urina	Enzima Deficiente	Localização do gene
	Hurler (Grave)				4p 16.3
I	Scheie (intermediária)	AR	DS + HS	α -L-Iduronidase	
	Hurler-Scheie (Atenuada)				
II	Hunter (Grave/Atenuada)	RLX	DS + HS	Iduronato sulfatase	Xq28
III A	Sanfilippo A	AR	HS	Heparan-N-sulfatase	17q25.3
III B	Sanfilippo B	AR	HS	α -N-Acetil-glicosaminidase	17q21
				Acetil-CoA:a-glicos. acetiltransferase	8p11.1
III C	Sanfilippo C	AR	HS		
III D	Sanfilippo D	AR	HS	N-acetilglicosamina 6-sulfatase	12q14
IV A	Morquio A	AR	QS	Galactose-6-sulfatase	16q24.3
IV B	Morquio B	AR	QS	β -galactosidase	3p21.33
VI	Maroteaux-Lamy	AR	DS	Arilsulfatase B	5q13-q14
VII	Sly	AR	DS + HS	β -glicuronidase	7q21.11
IX	Natowicz	AR	Ácido hialurônico	Hialuronidase	3p21.1-p21.3

AR = Autossômica Recessiva; RLX = Recessiva ligada ao X; DS = Dermatan Sulfato; HS= Heparan Sulfato; QS = Queratan Sulfato

O diagnóstico clínico das MPS é realizado, normalmente, por um geneticista, após o encaminhamento por outra especialidade médica, inicia com uma história médica completa, incluindo a investigação de outros membros da família com as mesmas características clínicas, história de consangüinidade, e observação do padrão de herança autossômica recessiva, exceto MPS II que é uma doença ligada ao X. As MPS incluem ampla gama de sintomas e manifestações clínicas com diferentes graus de gravidade e progressão da doença. As MPS estão associadas a efeitos patológicos na maioria dos tipos de tecidos. As manifestações clínicas das MPS mostram evolução crônica e progressiva. São de natureza multissistêmica, incluem aumento do fígado e do baço, ossos com conformação anormal e artropatia grave, fâcies característica, opacidade da córnea, e apneia do sono (Suarez-Guerrero *et al.*, 2015). De modo geral, a maior parte dos casos de MPS tem diagnóstico confirmado em torno dos dois anos de idade (Auclair *et al.*, 2003).

Em caso de suspeita clínica de MPS os exames são realizados primeiro na urina, servindo de direcionamento para a investigação da doença (Schwartz *et al.*, 2001). Para investigar MPS, primeiramente são realizados os testes de triagem em amostra na urina. São utilizados exames quantitativos, como 1,9-dimetil-metileneblue (DMB). Testes qualitativos, como a eletroforese de GAGs, utilizada para identificar os tipos de GAGs excretados em excesso e direcionar a investigação para os ensaios enzimáticos específicos (Barth *et al.*, 1990; Chih-Kuang, 2002 e De Jong, 1989). A quantificação dos GAGs é utilizada também como biomarcador na resposta ao tratamento das MPS. O diagnóstico definitivo das MPS se obtém através da medida da atividade enzimática específica, em leucócitos e/ou fibroblastos cultivados (Figura 3). Chamoles *et al.*, 2001 e Civallero *et al.*, 2006 desenvolveram novas técnicas para medir a atividade enzimática de algumas enzimas lisossômicas, em amostras de sangue total impregnado em papel-filtro (SIPF). Esta metodologia, até o momento é utilizada apenas como triagem. Em 2002 Whitley e colaboradores desenvolveram a técnica para a quantificação dos GAGs em amostras de urina impregnada em papel-filtro (UIPF) para investigação das MPS, esse método também facilita o transporte e o armazenamento da amostra. O uso do SIPF e da UIPF possibilita o envio de amostras de locais mais distantes para pacientes que dificilmente teriam acesso ao diagnóstico.

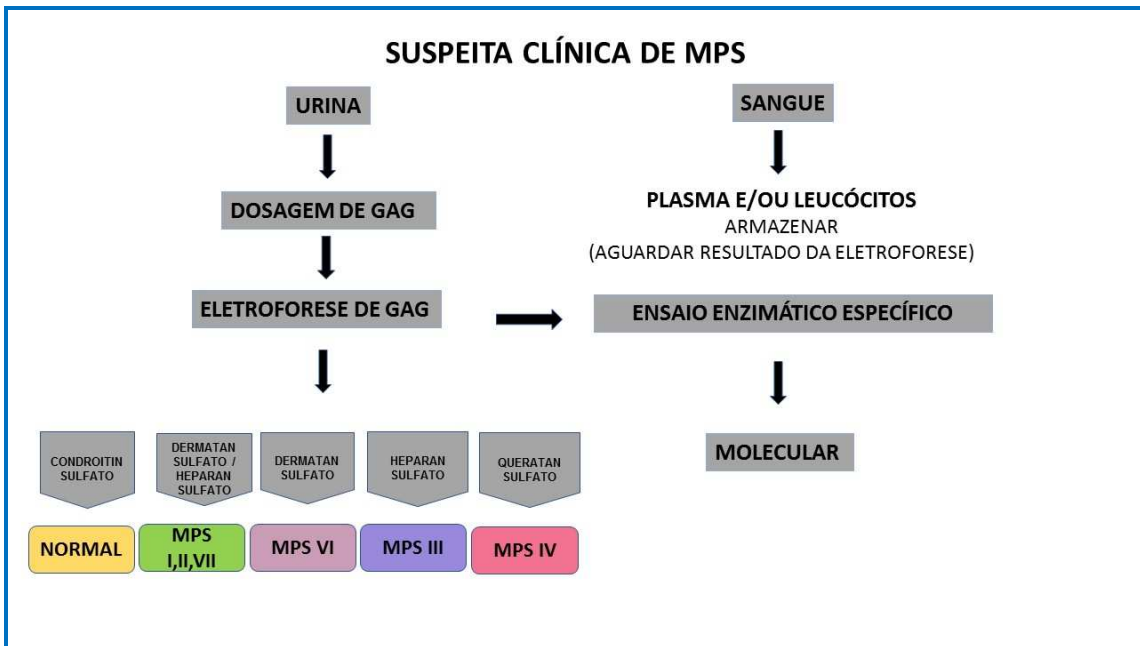


Figura 3. Protocolo bioquímico para investigação das MPS do LEIM/SGM/HCPA

O diagnóstico bioquímico e clínico das MPS pode ser complementado pela análise molecular, permitindo a correlação entre genótipo e fenótipo e a identificação de portadores nas famílias, importante para o aconselhamento genético adequado para que novos casos possam ser prevenidos (Wood *et al.*, 2013).

A identificação precoce de novos casos nas famílias permite, para os tipos de MPS em que há tratamento, que a terapia se inicie numa fase inicial da doença, quando é possível obter resultados mais eficazes e significativos. O diagnóstico pré-natal (DPN) permite a detecção, ainda no útero, de doenças que de outra forma só seriam diagnosticadas após o nascimento. No grupo dos EIM, no qual a maioria das doenças são autossômicas recessivas, a possibilidade de ter um novo filho afetado é quase sempre de 25%, já nas situações ligadas ao X, a possibilidade é de 50% de chance de ter filhos homens afetados (Sanseverino *et al.*, 2001).

O DPN para os EIM é altamente específico e só pode ser oferecido para aquelas famílias nas quais o diagnóstico de uma doença metabólica foi bem estabelecido no caso-índice através do estudo bioquímico e/ou molecular, na identificação prévia de um casal de heterozigotos, ou de heterozigota de doença ligada ao X (Ashton-Prolla *et al.*, 2008).

O DPN é realizado pelo ensaio enzimático relacionado com a MPS específica e pode ser associado à pesquisa molecular da mutação, quando esta já é conhecida na família (Cunniff C., 2004).

A identificação de portadores pode ser importante para confirmar uma suspeita diagnóstica, sendo essencial para permitir um aconselhamento genético em famílias que apresentam um caso de MPS (Ashton-Prolla *et al.*, 2001). O método ideal de detecção é aquele que consegue revelar diretamente o gene ou produto gênico mutante. Se uma doença é comum em certa população, pode ser em razão de um efeito fundador, e o esperado é que a maioria das pessoas afetadas tenham exatamente a mesma mutação ancestral (Read & Donnai, 2008).

A incidência das MPS é estimada em aproximadamente 1:100.000 recém-nascidos vivos (Nelson, 1997; Applegarth *et al.*, 2000). A incidência de nascimento de MPS é bem relatada em países europeus, e há várias publicações sobre a frequência das MPS em países asiáticos, incluindo Taiwan, China, Coreia do Sul e Índia (Poorthuis *et al.*, 1999; Poupetova *et al.*, 2010; Baehner *et al.*, 2005; Pinto *et al.*, 2004). Entre os pacientes diagnosticados pelo LEIM do SGM do HCPA, os que tiveram maior frequência foram os tipos I e VI (Giugliani *et al.*, 2017). O estudo de Khan e colaboradores sobre a epidemiologia dos diferentes tipos de mucopolissacaridoses no Japão e na Suíça mostrou que a incidência é de 1.53 e 1.56, respectivamente, a cada 100.000 nascidos vivos (Figura 4). E nesse mesmo estudo foram comparados os dados semelhantes de outros países (Khan *et al.*, 2017).

A.



B.

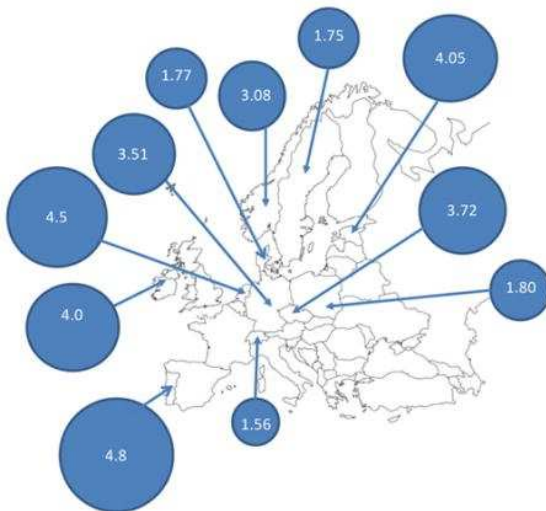


Figura 4. Distribuição demográfica e prevalência de nascidos vivos das MPS (Khan et al., 2017)

As MPS ainda não apresentam cura e o tratamento dos sintomas, que possuem uma variabilidade enorme no que se refere à gravidade, início e progressão, deve ser considerado em um primeiro momento. O tratamento dos sintomas deve ser monitorado caso a caso e envolve principalmente medidas que corrijam ou minimizem o envolvimento esquelético, neurológico, respiratório e cardíaco, necessitando uma equipe multidisciplinar para o manejo das complicações associadas. (Kircher *et al.*, 2007).

A terapia de reposição enzimática (TRE) é o tratamento específico, hoje disponível no Brasil para as MPS I, II, IV e VI, através do qual se repõe a

enzima através de infusões regulares. Esta abordagem tem demonstrado bons resultados no prognóstico dos pacientes que realizam tratamento. A TRE não é eficiente para tratar os sintomas neurológicos das MPS, uma vez que a enzima administrada endovenosamente não atravessa a barreira hematoencefálica. Outra dificuldade é tratar os danos esqueléticos, já que as lesões ósseas são precoces e aparentemente irreversíveis (Giugliani *et al.*, 2010; Hendriksz *et al.*, 2015).

O transplante de medula óssea (TMO) é outra alternativa de tratamento, mais indicado para a MPS I de forma grave. Deve ser realizado mais precocemente possível devido o comprometimento neurológico que essa doença apresenta (Eisengart *et al.*, 2018). Esse tratamento tem mostrado melhora neurológica, correção metabólica e aumento da sobrevida (Wynn, *et al.*, 2009).

A terapia gênica (TG) é o tratamento mais inovador, no Brasil está em estágio experimental e representa uma importante perspectiva em termos de tratamento das MPS. O princípio básico desse tratamento é a transferência de material genético (sequências de DNA) de outros organismos, para dentro das células de um indivíduo, com o objetivo de conferir um benefício terapêutico, usualmente com o uso de vetores (Huang *et al.*, 1997).

2.2.2 Mucopolissacaridose Tipo I

A mucopolissacaridose I (MPS I) é uma doença lisossômica com herança autossômica recessiva causada pela deficiência da enzima α -L-iduronidase (IDUA) (Neufeld e Muenzer, 2001). A deficiência da atividade enzimática causa acúmulo dos glicosaminoglicanos (GAG) heparan sulfato e dermatan sulfato nos lisossomos, resultando em uma doença multissistêmica progressiva com manifestações cardíacas, esqueléticas, oculares e, às vezes, neurológicas (Muenzer *et al.*, 2009). A MPS I foi descrita pela primeira vez por Gertrud Hurler em 1919 que relatou dois casos não relacionados com múltiplas anormalidades esqueléticas e opacidade de córnea, hepatoesplenomegalia e faces infiltradas (Hurler, 1919).

A MPS I é dividida em três subtipos:

Síndrome de Hurler: Esta é a forma mais grave da MPS I. Os pacientes desenvolvem sintomas logo após o nascimento que progridem rapidamente. Os sintomas incluem atraso no desenvolvimento, declínio cognitivo, face infiltrada, rigidez e contraturas nas articulações, baixa estatura e doença cardíaca e hepática. Os pacientes geralmente morrem no primeiro ano de vida (Harrison *et al.*; 2018).

Síndrome de Hurler-Scheie: Este é um fenótipo intermediário, diagnosticado entre 2 e 6 anos de idade. As características faciais são menos infiltradas do que a síndrome de Hurler. A hepatoesplenomegalia causa comprometimento respiratório. As meninges são espessadas e causam compressão da medula espinhal cervical, levando à fraqueza ou paralisia (Braunlin *et al.*; 2018). Os afetados geralmente têm comprometimento cognitivo leve. A expectativa de vida geralmente se estende até o final da adolescência ou início dos vinte anos. A morte é geralmente devido à insuficiência respiratória (Sakuru *et al.*, 2018).

Síndrome de Scheie: Este é um fenótipo raro e brando. Os sintomas físicos da síndrome de Scheie são semelhantes às síndromes de Hurler e Hurler-Scheie, os pacientes têm inteligência normal, e a expectativa de vida na maioria dos pacientes é de 25 a 30 anos de idade (Sakuru *et al.*; 2018).

O gene *IDUA* tem 19 kb de comprimento, contendo 14 exons e 13 introns. Está localizado no cromossomo 4 na região p16.3 (Scott *et al.*, 1995). Mais de 200 mutações e 32 polimorfismos foram identificados [Human Gene Mutation Database] (<http://www.hgmd.org>; 2017). Dessas estão incluídas 113 missense / nonsense, 33 splicing, 31 pequenas deleções, 15 pequenas inserções, 4 deleções totais e 3 rearranjos complexos. O teste genético de pacientes com MPS I é útil para identificação de genótipos específicos, correlações genótipo-fenótipo e também para o diagnóstico pré-natal (Chkioua *et al.*, 2018).

A frequência mundial da MPS I é de 1 para cada 100.000 nascidos vivos (D'Aco *et al.*, 2012). Existem poucos estudos com a frequência dessa doença.

O tratamento mais indicado é a TRE com a laronidase (Aldurazyme®), enzima da *IDUA* recombinante realizada por meio de infusão intravenosa feita semanalmente (Schwartz *et al.*, 2008). Esse tratamento foi aprovado em 2003

na Europa e Estados Unidos, e em 2005 e 2006 no Brasil e no Japão, respectivamente. A laronidase também é usada para tratar pacientes Hurler que não são candidatos ao TCTH (transplante células-tronco hematopoéticas) por causa da idade, estado de saúde, acesso ao transplante ou escolha dos pais. (Eisengart *et al.*, 2018). A TRE clinicamente é benéfica para a manifestação não neuropática da doença, proporcionando melhora da hepatoesplenomegalia, da obstrução das vias aéreas, da função cardíaca, do crescimento em altura e peso, da amplitude máxima de flexão do ombro e extensão do cotovelo e diminuição da excreção urinária de GAG (Kobayashi *et al.*, 2018).

2.2.3 Mucopolissacaridose Tipo II

A mucopolissacaridose tipo II (MPS II) é um distúrbio multissistêmico ligado ao cromossomo X caracterizado pelo acúmulo de GAG em quase todos os tipos de células, tecidos e órgãos. Também é conhecida como síndrome de Hunter por ter sido descrita pela primeira vez pelo professor de medicina Charles Hunter em 1917 (Pereira *et al.*; 2011). É uma doença genética de herança recessiva ligada ao X, em que ocorre uma disfunção na atividade da enzima iduronato-2-sulfatase (IDS) que realiza o catabolismo de dois GAGs, o heparan sulfato e o dermatan sulfato (Muenzer 2004).

As manifestações clínicas da MPS II resultam do acúmulo de GAGs no coração, fígado e baço levando à cardiomiopatia, displasia da válvula cardíaca e hepatoesplenomegalia. O envolvimento ósseo e articular resulta em deformidades esqueléticas graves e limitações da mobilidade articular. Pacientes com comprometimento do SNC, apresentam graves dificuldades de aprendizagem e declínio neurológico (Martin *et al.*, 2008).

Para o diagnóstico bioquímico da doença, é realizada em amostra de urina, a quantificação e identificação de DS e HS através de eletroforese. Após a investigação é direcionada para MPS II através do ensaio da IDS em leucócitos ou em fibroblastos (Pereira *et al.*, 2011).

A incidência estimada de MPS II em recém-nascidos vivos do sexo masculino é de 1: 162.000 (Da Silva *et al.*, 2014). No entanto, a incidência varia amplamente em diferentes países e regiões, variando de 1: 49.000 a 1: 526.000 (Pereira *et al.*, 2011, Guillén-Navarro *et al.*, 2013). A idade de início, a

gravidade da doença e a taxa de progressão variam significativamente entre os homens afetados. Nas pessoas com doença progressiva precoce, há envolvimento do comprometimento do SNC, a doença das vias aéreas progressiva e a doença cardíaca, que geralmente resultam em morte na primeira ou segunda década de vida. Nas pessoas com a doença da forma mais leve, o SNC não é comprometido, e alguns casos apresentam um leve comprometimento, embora o efeito do acúmulo de GAG em outros sistemas de órgãos possa ser progressivo com declínio cognitivo progressivo. A vida nos primeiros anos da fase adulta com inteligência normal é comum na forma de progressão lenta da doença. Ambas as formas de MPS II incluem: baixa estatura; macrocefalia com ou sem hidrocefalia comunicante; macroglossia; voz rouca; perda auditiva condutiva e neurossensorial; hepatoesplenomegalia; disostose múltipla; estenose espinal e síndrome do túnel do carpo (Scarpa *et al.*, 2011).

O gene da *IDS* está localizado no cromossomo Xq28 composto por 9 exons e 8 introns codificando uma proteína IDS de 550 aminoácidos (Bondeson *et al.*; 1995). Mais de 500 mutações já foram identificadas, incluindo rearranjos, inserções, deleções splicing e mutações missense /nonsense (Demydchuk *et al.*, 2017). O gene apresenta uma heterogeneidade que resulta em um amplo espectro de fenótipos da doença (Muenzer *et al.*, 2009). As deleções ou eventos de recombinação gene-pseudogene geralmente desenvolvem as formas mais graves da síndrome de Hunter (Froissart *et al.*, 2007).

Assim como para as demais MPS a TRE é o tratamento específico indicado para MPS II. É realizada pela administração intravenosa de idursulfase (Elapraxe®), uma proteína glicosilada análoga à iduronato-2-sulfatase humana nativa, produzida através de engenharia genética em uma linhagem contínua de células humanas. A TRE é indicada para todos os pacientes com sintomas e com diagnóstico confirmado de MPS II (Harmatz *et al.*, 2005, Sohn *et al.*, 2013). A TRE com idursulfase foi aprovada para o tratamento de pacientes nos Estados Unidos em julho de 2006 e na Europa em janeiro de 2007, tendo o registro na ANVISA do Brasil em 2008 (Giugliani *et al.*, 2010).

2.2.4 Mucopolissacaridose Tipo VI

O nome original da doença, síndrome de Maroteaux-Lamy (MPSVI), deve-se a dois médicos franceses que a descreveram pela primeira vez em 1963. A MPS VI pode se apresentar com um espectro de gravidade clínica variando das formas atenuada a grave, sendo uma doença autossômica recessiva causada pela deficiência da enzima N-acetilgalactosamina-4-sulfatase ou arilsulfatase B (ARSB). É caracterizada pelo armazenamento intralisossomal e excreção urinária de elevados níveis do GAG dermatan sulfato (DS). A deficiência da enzima arilsulfatase B faz com que o DS se acumule nos lisossomos, provocando amplas manifestações clínicas, que em geral surgem na primeira infância, mas que também podem aparecer em fases posteriores da vida (Neufeld e Muenzer, 2001). Para o diagnóstico bioquímico é realizada em amostra de urina a quantificação e identificação do GAG. Com o aumento na concentração do GAG na quantificação e a presença de dermatan sulfato na eletroforese, a investigação laboratorial é direcionada para a MPS tipo VI através do ensaio enzimático da ARSB em leucócitos (Schwartz *et al.*, 2001).

A MPS VI é clinicamente representada pelas seguintes características: baixa estatura, dimorfismo facial progressivo, inteligência normal, opacidade de córnea, otite média recorrente, pneumonia, doença obstrutiva das vias aéreas, valvulopatia cardíaca, esplenomegalia, hérnia umbilical e inguinal, rigidez e contraturas articulares e anormalidades esqueléticas ([http://www.maroteauxlamy.com / Portuguese /HCP /Signs.aspx](http://www.maroteauxlamy.com/Portuguese/HCP/Signs.aspx)). Outra diferença, considerando as demais MPS, é a sobrevida, que é maior nos pacientes com MPS VI (Ishida *et al.*, 2009). Considerados normais ao nascimento, os indivíduos com MPS VI podem apresentar dolicocefalia, fronte ampla e alterações na coluna. A maioria dos pacientes apresenta os primeiros sinais da doença na infância (hepatoesplenomegalia, face infiltrada e retardo de crescimento), mais comumente entre 1 e 3 anos de idade (De Paula *et al.*, 2006). Por se tratar de uma doença crônica, os achados clínicos agravam-se com o passar dos anos. Os pacientes passam a apresentar alterações em vários órgãos e tecidos, que podem incluir desde alterações osteoarticulares a alterações cardiorrespiratórias, cujas complicações são progressivas e podem levar ao óbito (Mizuno *et al.*, 2010). Alguns indivíduos afetados apresentam

apenas alguns sintomas leves, enquanto outros desenvolvem a forma grave da doença (Khan *et al.*, 2017).

A incidência de MPS VI varia bastante para cada país ou estado, por exemplo na província de Colúmbia Britânica, é em torno de 1 a cada 300.000 nascidos vivos (Neufeld e Muenzer, 2007), e de 1 a cada 5.000 nascidos vivos como resultado do efeito fundador no Norte do Brasil (Costa-Motta *et al.*, 2011).

O gene da ARSB está localizado no braço longo do cromossomo 5, na região 5q13.3 – 5q14.1 (Litjens *et al.*, 1989). O isolamento e sequenciamento do cDNA da ARSB humana, realizado em um estudo possibilitou a caracterização da proteína ARSB, a qual é composta por 533 resíduos de aminoácidos (Peters *et al.*, 1991). Em torno de 200 mutações já foram identificadas neste gene (HGMD, Uttarilli *et al.*, 2017).

A TRE é o tratamento específico para a MPS VI, através do qual se repõe a enzima através de infusões regulares (Harmatz *et al.*, 2006). Vários estudos têm demonstrado a segurança e eficácia da TRE, a comercialização e uso da galsulfase foi aprovada nos Estados Unidos em 2005, na Comunidade Européia em janeiro 2006, e em fevereiro de 2009 no Brasil, quando recebeu o registro da ANVISA (Giugliani *et al.*, 2010).

2.2.5 Doença de Fabry

A doença de Fabry (DF) é um EIM dos glicosíngolipídeos (GL) de herança ligada ao X, resultante da atividade deficiente da enzima lisossômica α -galactosidase A (α -Gal) (Braga Silva, 2017). Descrita pela primeira vez em 1898 por dois dermatologistas, o alemão Johann Fabry e o inglês William Anderson (Ries *et al.*; 2005). A deficiência enzimática da α -Gal interfere na capacidade da decomposição adiposa específica, denominada globotriaosilceramida, também chamado de Gb3 que se acumula nos lisossomos em todo o corpo e afeta a função de vários órgãos (Sodré *et al.*; 2017). Esse acúmulo pode causar um problema importante no interior do endotélio e músculos lisos de vasos sanguíneos em diversos órgãos, compromete principalmente o coração, rins, pele, sistema nervoso, olhos e trato gastrointestinal (Choudhury *et al.*, 2005). De acordo com o fenótipo da doença pode apresentar a forma clássica, forma de início precoce e as formas atenuadas, diagnosticadas mais tardiamente.

A incidência estimada é de 1:40.000 a 1:117.000 nascidos vivos (Köping *et al.*; 2018). O gene *GLA* está localizado na região Xq22.1 e possui 12,4 kb divididos em 8 éxons. Tem mais de 700 mutações identificadas, incluindo mutações missense, pequenas deleções / inserções, mutações de splice, e grandes rearranjos gênicos (Cabrera *et al.*, 2018).

O tratamento específico para DF é a TRE, estão disponíveis as drogas agalsidase alfa (Replagal®), e agalsidase beta (Fabrazyme®). Quanto mais cedo for iniciado o tratamento melhores são os resultados. A medicação é administrada por via intravenosa, quinzenalmente (Spada *et al.*, 2018).

2.2.6 Doença de Gaucher

A doença de Gaucher (DG) é um EIM do grupo das DL, caracterizada pelo acúmulo do substrato glicosilceramida. A DG é a esfingolipidose mais comum e foi descrita pela primeira vez por Philippe Gaucher em 1882 em um paciente com esplenomegalia maciça sem leucemia (Stirnemann *et al.*, 2017). A DG é uma DL de herança autossômica recessiva, causada por mutações no gene da beta glicocerebrosidase (*GBA1*). A mutação do *GBA1* pode resultar em deficiência total ou parcial da atividade enzimática (Lei *et al.*, 2018). O gene de *GBA1* está localizado no cromossomo 1 na região 1q 21 com 300 mutações já descritas (Hruska *et al.*, 2008).

A DG é uma doença multissistêmica, associada com grande variação em suas manifestações clínicas, na sua gravidade e evolução. Manifesta-se através de anemia, plaquetopenia, hepatoesplenomegalia e lesões ósseas (Oliveira *et al.*, 2002). Segundo Ferreira e colaboradores (2005) a DG é dividida em três tipos:

- 1) DG tipo I (forma não neuropática): é o tipo mais frequente, onde não há comprometimento neurológico, com presença de hepatoesplenomegalia, manifestações hematológicas e graus variados de envolvimento ósseo.
- 2) DG tipo II (forma neuropática aguda ou infantil): apresenta hepatoesplenomegalia, alterações neurológicas graves e óbito nos primeiros dois anos de vida.

- 3) DG tipo III (forma neuropática crônica ou subaguda): conhecida também de forma juvenil, podendo ocorrer em qualquer fase da infância e combina aspectos dos tipos I e II.

O diagnóstico bioquímico da DG é realizado através da medida da atividade enzimática da beta-glicosidase em amostras de leucócitos obtidos pelo sangue periférico e/ou fibroblastos através da biópsia de pele (Michelin, *et al.*, 2005). Para o diagnóstico molecular são realizadas as análises das mutações do gene GBA (Beutler, Saven, 1990). Também é realizada a medida da atividade enzimática da quitotriosidase em amostras de plasma. Pacientes com DG apresentam uma atividade de quitotriosidase muito elevada, na maioria dos casos, sendo este biomarcador utilizado em muitos laboratórios em todo o mundo há mais de 20 anos, ajudando os médicos a avaliar a gravidade da doença (Tylki-Szymańska, *et al.*, 2018).

A DG é o tipo mais frequente das DLs, como uma frequência estimada em 1 a cada 40.000 a 60.000 nascidos vivos na população geral, sendo mais comum em populações de judeus Ashkenazi, onde a frequência é de 1 a cada 850 nascidos-vivos (Grabowski *et al.*, 1996)., Não existem estudos epidemiológicos brasileiros sobre essa doença (Ferreira *et al.*, 2005).

Desde a década de 1990, a DG tipo I (sintomática e sem manifestações neurológicas) e a DG tipo III (sintomática e comprometimento neurológico) têm sido tratadas com sucesso com uma enzima sintética semelhante a β -glicosidase ácida. Também é usada para tratamento a droga Miglustat® (Terapia de redução do substrato - TRS) em pacientes com DG tipo I que não toleram ou não desejam fazer o tratamento com Imiglucerase.

2.2.6.1 Biomarcador para DG

A quitotriosidase (ChT), também conhecida como quitinase humana, é uma hidrolase sintetizada e excretada por macrófagos. Na década de 90, estudos mostraram que pacientes com DG possuíam níveis elevados de ChT no plasma (cerca de 100 a 500 vezes) e que, após a introdução da TRE estes níveis diminuíam consideravelmente (Guo *et al.*, 1995; Aguilera *et al.*, 2003).

Verificou-se que 6% da população possuem uma deficiência desta enzima e este fato não está associado com nenhuma condição patológica e

não resulta em sintomatologia. Alguns pacientes com DG apresentam deficiência de ChT e este biomarcador deixa de ser uma ferramenta útil na monitorização do tratamento nestes casos, o que é uma limitação nesta DL (Andersen *et al.*, 1997).

A enzima ChT humana, que é codificada pelo gene *CHIT1*, é produzida por macrófagos e pode ser importante em respostas imunes a organismos contendo quitina, como fungos. O gene *CHIT1* localizado no cromossomo 1q32.1, possui 12 exons com tamanhos variando de 30 a 1055 pb. A atividade da ChT plasmática é utilizada para diagnosticar e monitorar algumas formas de distúrbios do armazenamento lisossomal, como a doença de Gaucher e a doença de Niemann-Pick (Motlagh *et al.*, 2016).

2.2.7 Doença de Pompe

A doença de Pompe (DP) denominada em homenagem a seu primeiro pesquisador JC Pompe, também conhecida como glicogenose tipo II, tem herança autossômica recessiva, podendo apresentar grandes variabilidades fenotípicas, além de atingir diversos órgãos. A DP é causada pela deficiência da enzima alfa-glicosidase-ácida (GAA) responsável pela degradação do glicogênio nos lisossomos. Essa deficiência enzimática resulta em acúmulo de glicogênio lisossômico em diferentes tecidos, sendo as células das musculaturas lisa, esquelética e cardíaca as mais afetadas. Esse EIM pode apresentar duas variantes clínicas principais, a forma infantil e a forma de início tardio (Kuhn *et al.*; 2014, Savegnago *et al.*, 2012).

Em neonatos, nos quais é diagnosticada a forma infantil da doença, há um comprometimento total da atividade da enzima (<1% da atividade normal), levando ao desenvolvimento de fraqueza muscular e respiratória, o que pode ocasionar insuficiência cardiorrespiratória mesmo antes de um ano de vida. Formas juvenis e adultas da doença mostram reduzidas atividades da GAA (de 2 a 40% da atividade normal) e uma lenta progressão dos sintomas. Estes pacientes apresentam um envolvimento concomitante de insuficiência cardíaca e respiratória no início, que muitas vezes pode levar à dependência da assistência ventilatória e, finalmente à insuficiência respiratória (Kuhn *et al.*, 2014, De Ruisseau *et al.*, 2009).

A forma infantil da DP ocorre em crianças nos primeiros meses de vida, com as seguintes manifestações clínicas: cardiomiopatia (hipertrófica ou dilatada), hipotonia e fraqueza muscular de rápida progressão. Em geral, a criança evolui para óbito por falência cardiorrespiratória até o primeiro ano de vida (Savegnago *et al.*, 2012).

A forma de início tardio pode se manifestar em qualquer idade, entre o primeiro ano até a sexta década de vida. A forma tardia não apresenta cardiomiopatia severa e a progressão da doença é mais lenta do que na forma infantil. A fraqueza muscular é o principal sintoma com predomínio na musculatura proximal e importante comprometimento dos membros inferiores, prejudicando a função motora e dificuldade na realização das atividades diárias. Com a progressão da doença, os pacientes necessitam de cadeira de rodas para locomoção e podem vir a ser dependentes de ventilação pulmonar mecânica devido à insuficiência respiratória, sendo esta a principal causa de morbidade e mortalidade (Llerena *et al.*, 2009).

O gene *GAA* está localizado no cromossomo 17 na região 17q25, apresenta 20 exons, onde o exon 1 é não-codificante (Thirumal Kumar *et al.*; 2018). De acordo com a atualização de 2016 no Pompe Center (<http://www.pompecenter.nl>), 558 mutações do gene *GAA* foram relatadas e quase 450 delas são consideradas patogênicas. Dessas, 245 mutações foram relatadas como mutações missense, e 64% destas mutações estão no domínio catalítico da proteína *GAA*.

A frequência estimada pode variar de 1 a cada 40.000 e 1 a cada 300.000 nascidos vivos, pode ter início precoce ou tardio, mas a frequência de todas as formas é considerada semelhante (Mellies *et al.*, 2009, Cupler *et al.*, 2012).

Atualmente, o tratamento da DP é feito através de TRE com a enzima alfa-glicosidase recombinante humana, aprovada em 2006 pela *European Medicines Agency* e pela *Food and Drug Administration*. A TRE tem mostrado uma significativa melhora na função dos músculos cardíaco e esquelético, prolongando a sobrevida e reduzindo a mortalidade. (Bembi *et al.*, 2008). Para monitorar a progressão da DP e guiar os tratamentos e intervenções necessários, é recomendada avaliação clínica e funcional em intervalos curtos de tempo, a cada três a seis meses, em ambas as apresentações clínicas da

doença (Llerena *et al.*, 2009). Outro tratamento alternativo está na forma de proteínas chaperonas, animinossacarídeos, N-butil-desoxinojirimicina (DNJ), O Miglustat, é um acompanhante desenvolvido pela Oxford GlycoSciences e comercializado pela Actelion (Deming *et al.*; 2017).

2.2.8 Doença de Niemann Pick

A doença de Niemann-Pick (DNP) é classificada em tipos A, B e C. A DNP A/B é uma doença hereditária autossômica recessiva, caracterizada pela deficiência de esfingomielinase ácida (SMA) que determina o acúmulo de esfingomielina, principalmente nos tecidos do sistema reticuloendotelial. Os sintomas devem-se ao acúmulo de macrófagos repletos de lipídios e vacuolizados, denominados células de Niemann-Pick, em vários órgãos, como fígado, baço, medula óssea, pulmão e sistema nervoso central (Rodrigues *et al.*,2004). A característica histológica da doença é a célula espumosa patológica, também conhecida como célula Niemann-Pick, nos tecidos afetados. O diagnóstico da doença é feito pela visualização da atividade reduzida de ASM em leucócitos periféricos ou cultura de fibroblastos ou pela detecção de duas mutações no gene *SMPD1* (Simpson *et al.*, 2010). A atividade enzimática da ChT costuma ser elevada em pacientes com DNP (Guo *et al.*,1995).

- 1) A classificação dos diferentes tipo se dá principalmente de acordo com fenótipos clínicos:DNP do tipo A: é mais comum em populações de judeus Ashkenazi, é uma doença neurodegenerativa grave da infância caracterizada por retardo psicomotor progressivo, déficit de crescimento, hepatoesplenomegalia, anomalia ocular chamada mancha vermelho-cereja, que pode ser identificada com um exame oftalmológico, e morte aos 2 a 3 anos de idade (Pavlú-Pereira *et al.*, 2005).
- 2) DNP tipo B: é caracterizada por hepatoesplenomegalia, trombocitopenia, doença pulmonar intersticial e dislipidemia, com a maioria dos pacientes tendo pouco ou nenhum envolvimento neurológico. Disfunção hepática, estigmas da retina e retardo de crescimento também podem estar presentes, mas são características

mais variáveis. Estudos mais recentes sugeriram que há um espectro de doença relacionado à quantidade residual de atividade ASM in vivo, incluindo formas neurológicas intermediárias da doença (Wasserstein *et al.*, 2006).

- 3) DNP tipo C: é um distúrbio geneticamente distinto resultante do tráfego intracelular defeituoso de colesterol com acúmulo secundário de glicosfingolípídeos (Simpson *et al.*, 2010). Na maioria dos casos as manifestações ocorrem na infância, embora os sinais e sintomas possam se desenvolver a qualquer momento. Os pacientes desenvolvem dificuldade em coordenar os movimentos (ataxia), incapacidade de mover os olhos verticalmente (paralisia do olhar supranuclear vertical), tônus muscular pobre (distonia), doença hepática grave e doença pulmonar intersticial (Genetics Home Reference, 2015).

A frequência de DNP dos tipos A e B é de 1 a cada 250.000 nascidos vivos. A doença de Niemann-Pick tipo A ocorre com maior frequência entre os indivíduos de ascendência judaica de Ashkenazi do que na população geral. A incidência na população Ashkenazi é de aproximadamente 1 em 40.000 indivíduos. Para a DNP C é de 1 a cada 150.000 nascidos vivos (Genetics Home Reference, 2015).

O gene *SMPD1* das DNP A e B está localizado no cromossomo 11p15 com mais de 180 mutações encontradas, incluindo mutações pontuais (missense e nonsense), pequenas deleções e sítios de splicing (Schuchman *et al.*, 2017). A DNP tipo C que é a forma mais comum (95% dos casos), caracterizada por dois genes: o gene *NPC1*, está localizado no locus 18q11, apresenta 25 éxons e com mais de 230 mutações identificadas. O gene *NPC2*, está localizado no locus 14q24, apresenta 5 éxons (Almeida, 2017).

A droga Miglustat (Zavesca®, Brazaves®), uma substância capaz de impedir a ação de uma enzima que produz glicosfingolípídeos, é a única droga específica aprovada para o tratamento de manifestações neurológicas

progressivas da doença de DNP tipo C em adultos e pacientes pediátricos (Lyseng-Williamson KA, 2014).

A TRE para DNP tipo B está sendo testada em fases iniciais através de estudos clínicos em pacientes com o diagnóstico confirmado da doença. A droga olipudase alfa, um composto experimental, está sendo desenvolvida para o tratamento de pacientes adultos e pediátricos sem manifestações neurológicas (Wasserstein *et al.*; 2018). O grupo de pesquisa clínica em genética do SGM/HCPA está com dois estudos clínicos (1 pediátrico e 1 adulto) em andamento com pacientes de DNP tipo B.

2.3 TRIAGEM NEONATAL

A triagem neonatal (TN) é uma ação preventiva que permite o diagnóstico precoce de diversas doenças congênitas ou infecciosas, assintomáticas no período neonatal. O diagnóstico neonatal permite a instituição do tratamento específico de forma precoce e a diminuição ou eliminação das seqüelas associadas a cada doença [Portal do Ministério da Saúde] (http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/triagem_neonatal.pdf).

A TN visa a detecção em fase pré-clínica, de distúrbios com uma evolução significativamente alterada pela introdução precoce do tratamento (Peckham e Dezateux, 1998). A TN é uma estratégia de prevenção que tem ação sobre o fenótipo e não sobre o genótipo (Knoury, 1997). As doenças a serem triadas na TN devem ser regionalizadas e baseadas nas estatísticas de saúde da população local (Ashton-Prolla *et al.*, 2001). A ansiedade gerada por um resultado alterado (podendo ser falsamente alterado) é uma complicação que deve ser levada em consideração quando da implantação e/ou análise de um programa de TN. Como qualquer método de rastreio, a TN pode gerar resultados tanto falso-positivos quanto falso-negativos. Os resultados alterados devem ser sempre avaliados por análises confirmatórias (Souza *et al.*, 2002). Com a TN tornou-se possível o diagnóstico precoce de diversas doenças e a prevenção de seqüelas graves com a introdução em tempo hábil de uma terapêutica adequada. Doenças que antes eram de mau prognóstico ou letais,

tiveram seu curso substancialmente alterado após a introdução do “teste do pezinho”.

Para que os exames sejam incluídos em um programa de triagem neonatal é necessário que sejam de execução simples e que possam ser feitos em larga escala, com técnicas simples de coleta.

Nos anos 90 começou a ser aplicada a técnica de espectrometria de massas em tandem, capaz de diagnosticar de forma rápida e precisa vários erros inatos do metabolismo, permitindo a sua aplicação na TN. Esse método permitiu ampliar o alcance da triagem neonatal, que passou a modificar de forma considerável a história natural de várias doenças com alta morbidade e mortalidade, até então não triadas (Braga e Fonseca, 2008).

O tratamento para as doenças diagnosticadas pela TN deve ser iniciado o mais precocemente possível para obtenção de resultados satisfatórios. Seguem abaixo os critérios para inclusão de doenças na triagem neonatal estabelecidos por Wilson & Junger 1968 avaliando a aplicabilidade à investigação das DLs neste período (Tabela 3).

Tabela 3. Critérios de inclusão de doenças para triagem neonatal

Critérios de Inclusão para Triagem Neonatal	Aplicável DLs selecionadas
A doença deve ser grave	X
Ter conhecimento da história natural da doença	X
Existência de um teste para detecção precoce da doença	X
Tratamento disponível com benefícios para doença	X
Teste adequado para o diagnóstico	X
O teste deve ser aceitável pela comunidade local	X
Existência de biomarcadores para acompanhamento	X
Prestações de serviços adequados de saúde devem ser feitos para o trabalho extra clínico resultante da triagem	X
Os riscos, tanto físicos como psicológicos, devem ser menores do que os benefícios durante o tratamento	X
Os custos e os benefícios devem ser avaliados	X

2.3.1 Triagem Neonatal para DL

No Brasil existem poucos programas de TN para DL. Em Porto Alegre o laboratório Centro de Triagem Neonatal (CTN) teve um programa piloto de TN realizado em amostras de sangue impregnado em papel filtro (SIPF) para as doenças de Gaucher, Fabry, Pompe e mucopolissacaridose tipo I. Em 10.527 amostras SIPF analisadas, 9 amostras tiveram resultados alterados (Camargo Neto *et al.*; 2017). No município de Monte Santo/Bahia, a doença de MPS VI apresenta uma frequência elevada, em torno de 1:5000 nascidos vivos com a presença de uma única mutação (p.H178L) em homozigose em todos os 13 pacientes diagnosticados. Também com alta frequência de heterozigotos (40%) entre familiares selecionados através de estudos genealógicos (Costa -Motta *et al.*, 2011). A partir desse estudo foi criado um programa de TN para MPS VI em Monte Santo por ser uma região com alta incidência dessa doença. É realizada a análise molecular para a mutação específica p.H178L em SIPF (Bender F,

2011). Esse programa continua em andamento, pois ainda não chegou ao número de amostras propostas para serem analisadas que é um total de 5000.

Internacionalmente a TN para DL em amostras de SIPF está bem avançada com tecnologias de diagnóstico bem precisas. Em Taiwan é realizado a TN para MPS I e MPS II, onde as atividades enzimáticas em amostras de SIPF são avaliadas por espectrometria de massa em tandem (Chuang *et al.*, 2018). No estado americano de Missouri tem o programa de TN para a doença de Gaucher, de Fabry, de Pompe e MPS I, que utiliza uma plataforma de microfluidos (Baebies Inc) para medir as atividades enzimáticas (Hopkins *et al.*, 2015). Em Nova Iorque existe um programa de TN para a doença de Pompe, de Gaucher, de Niemann-Pick A/B, de Fabry, e MPS I, onde os ensaios são realizados por espectrometria de massa em tandem (Wasserstein *et al.*, 2018). Elliott *et al.*, 2016, realizaram um estudo piloto de TN para as doenças de Pompe, de Fabry, de Gaucher, de Niemann Pick-A/B, de Krabbe e MPS I. Nesse estudo foram analisadas amostras de recém-nascidos de alguns estados americanos e do estado Turku da Finlândia, sendo que o método utilizado para as análises foi espectrometria de massa em tandem. Todos esses programas de TN alegam que os métodos utilizados para os diagnósticos são seguros. A maioria dos programas de TN são ensaios de alto rendimento, com capacidade de analisar simultaneamente a atividade enzimática relacionadas com 4 a 6 doenças, a partir de uma única amostra de SIPF. A análise direta da atividade enzimática em SIPF tem sido extensivamente desenvolvido nos últimos anos e tem sido estudada em programas piloto recentes em grande escala (Gelb *et al.*, 2015).

O nosso grupo tem uma longa experiência em diagnóstico e tratamento de DL. O LEIM é capacitado para desenvolver as técnicas necessárias para a TN para doenças lisossômicas.

Neste projeto vamos testar uma metodologia alternativa para a triagem neonatal para 6 doenças lisossômicas para as quais existe tratamento específico aprovado no Brasil.

JUSTIFICATIVA

3. JUSTIFICATIVA

As doenças lisossômicas (DL) são um grupo de doenças caracterizadas por um defeito genético na expressão funcional de enzimas e proteínas lisossômicas (Wenger DA, 2003). Pacientes com DL acumulam nos tecidos e no sangue os substratos de enzimas lisossômicas específicas, deficientes no interior das células. Este acúmulo causa um impacto anatômico e/ou funcional em uma ou mais áreas do organismo. Dependendo da doença, os pacientes podem manifestar alterações desde o nascimento até a idade adulta (Meikle *et al.*, 2006). Os sinais clínicos são multissistêmicos, como defeitos no desenvolvimento físico e mental, defeitos no sistema imunológico e anomalias esqueléticas e oftalmológicas. Os transtornos são progressivos e as crianças afetadas em geral parecem normais ao nascimento e, posteriormente, desenvolvem morbidade, geralmente grave, e morrem geralmente depois de meses ou anos (Sheth *et al.*, 2004). Muitas das DLs são neurodegenerativas, com uma grande variedade de fenótipos clínicos, com diferentes incidências relatadas, em diferentes populações. A incidência global das DLs foi estimada em 1:7.143 nascidos vivos na Holanda (Poorthuis *et al.*, 1999) e em 1:7.700 na Austrália (Meikle *et al.*, 1999 e 2006).

Até recentemente, a intervenção terapêutica foi limitada ao tratamento de suporte e ao transplante de medula óssea (TMO) para casos selecionados. Com o recente desenvolvimento de terapias de reposição enzimática (TRE), terapias de redução de substrato (TRS), terapia com chaperonas e outras abordagens, várias DLs são agora passíveis de intervenções terapêuticas que alteram significativamente a história natural dessas condições (Burrow *et al.*, 2007). Além disso, a terapia gênica (TG) e abordagens pós-transcrição (*read-through*), entre outras possibilidades, estão em desenvolvimento para várias DLs (Beck M, 2010).

O diagnóstico de pacientes com suspeita de DL normalmente é feito através da determinação da atividade da enzima afetada nos fluídos corporais e/ou em cultura de células (Wenger DA, 2003). Devido à raridade individual das doenças e à grande variedade de fenótipos clínicos, muitos pacientes não são diagnosticados ou são identificados tardios ou erroneamente. Este é um grande

problema, pois há uma forte correlação entre idade ao diagnóstico, gravidade e expectativa de vida (Meikle *et al.*, 1999).

Em 2004, o grupo de Michael Gelb publicou um método com espectrometria de massas *in tandem* (TMS) que permite a análise simultânea de cinco DLs (Li *et al.*, 2004). Propõe-se que este método seja adequado para multianálise e aplicação a um grande volume de amostras. Na atualidade, a TMS é uma das técnicas mais importantes utilizadas no laboratório clínico. A aplicação desta moderna técnica tem levado a um desenvolvimento marcante no diagnóstico de erros inatos do metabolismo, com ênfase para a triagem neonatal. Esta técnica permite a detecção de um grande número de analitos em um único e rápido procedimento e apresenta alta confiabilidade, sensibilidade e especificidade, sendo realizado em uma amostra biológica única de fácil transporte (Zhou *et al.*, 2011/ Kasper *et al.*, 2010).

No que se refere à triagem neonatal, a disponibilidade de técnicas adequadas e o crescente número de evidências de que o diagnóstico e o tratamento precoces estão associados a um melhor prognóstico (McGill *et al.*, 2010), vêm tornando muito importante a discussão sobre a expansão da triagem neonatal para incluir doenças lisossômicas selecionadas (Dajnoki *et al.*, 2010). Neste contexto, diversos programas-piloto foram realizados ao redor do mundo: para doença de Fabry na Itália (Spada *et al.*, 2006) e em Taiwan (Hwu *et al.*, 2009), para a doença de Pompe na Áustria (Dajnoki *et al.*, 2008 / Mechtler *et al.*, 2012) e em Taiwan (Chien *et al.*, 2008).

O nosso grupo já tem uma experiência em triagem neonatal para MPS VI, em recém-nascidos, participando em um programa no município de Monte Santo. O município de Monte Santo, localizado no estado da Bahia, apresenta uma frequência de MPS VI (1:5.000) muito superior à estimada pela literatura (ao redor de 1:320.000) e até superior à de muitas doenças usualmente testadas em programas de TN no Brasil. Nesse município já foram diagnosticados 13 pacientes com a doença, todos homocigotos para a mutação p.H178L (Motta-Costa *et al.*, 2011). A partir desses dados desenvolvemos um projeto piloto de triagem neonatal para MPS VI em Monte Santo. Neste projeto é realizada a análise molecular (pesquisa da mutação p.H178L), utilizando a mesma amostra coletada para o “teste do pezinho” convencional.

Com o presente projeto pretendemos, de forma pioneira no Brasil, testar um método alternativo de triagem neonatal para DL selecionadas, utilizando a mesma amostra de sangue coletada para o “teste do pezinho” convencional. Testaremos também a utilidade de realizar testes em amostras de urina dos recém-nascidos. Caso essa metodologia seja aprovada, poderá se constituir numa alternativa para programas de triagem neonatal para doenças lisossômicas, evitando o alto custo de aquisição do espectrômetro de massas in tandem, e tornando a triagem neonatal para DL mais viável de se aplicar em países com recursos limitados como o Brasil.

HIPÓTESE DO ESTUDO

4. HIPÓTESE DO ESTUDO

Este estudo testará a hipótese de que o diagnóstico neonatal de doenças lisossômicas é possível de ser realizado na mesma amostra de sangue total impregnado em papel filtro coletado para o “teste do pezinho” rotineiro, utilizando técnicas convencionais adaptadas de análise de atividade enzimática, passíveis de serem implementadas em laboratórios convencionais de genética bioquímica. Além disso, será realizada a dosagem dos glicosaminoglicanos em amostra de urina, um exame de triagem para as mucopolissacaridoses.

OBJETIVOS

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivos Gerais

- a) Padronizar e validar a metodologia de análise das enzimas lisossômicas selecionadas pelo micrométodo fluorimétrico em amostras de SIPF.
- b) Avaliar o desempenho do micrométodo fluorimétrico que está sendo proposto a ser adicionado ao programa de triagem neonatal convencional (disponibilidade de amostra, estabilidade da amostra, tempo de execução, custo de execução, índice de falso-positivos, índice de falso-negativos).

5.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a reprodutibilidade, sensibilidade e especificidade das análises.
- b) Avaliar se a metodologia de análise de enzimas lisossômicas selecionadas pelo micrométodo fluorimétrico produz resultados comparáveis aos obtidos com outras metodologias que já estejam validadas.
- c) Avaliar a metodologia da dosagem de glicosaminoglicanos em amostras de urina a fim de complementar o diagnóstico para as mucopolissacaridoses.

REFERÊNCIAS

6. REFERÊNCIAS

- Andersen MD, Jensen A, Robertus JD, Leah R, Skriver K. Heterologous expression and characterization of wild-type and mutant forms of a 26 kDa endochitinase from barley (*Hordeum vulgare* L.). **Biochem J.** 1997 Mar 15;322 (Pt 3):815-22.
- Applegarth D, Toone JR, Lowry RB. (2000). Incidence of inborn errors of metabolism in British Columbia, 1969-1996. **Pediatrics**, 2000,105(1):1-6.
- Aguilera B, Ghauharali-van der Vlugt K, Helmond MT, Out JM, Donker-Koopman WE, Groener JE, Boot RG, Renkema GH, van der Marel GA, van Boom JH, Overkleeft HS, Aerts JM. Transglycosidase activity of chitotriosidase: improved enzymatic assay for the human macrophage chitinase. *J Biol Chem.* 2003 Oct 17;278(42):40911-6.
- Ashton-Prolla P, Schartz IV, Burin MG, GIUGLIANI R . 2001. Estratégias de Prevenção em erros inatos do metabolismo, pp. 211-214. In Carakushansky G. **Doenças Genéticas em Pediatria.** Ed. Guanabarra Koogan, Rio de Janeiro.
- Ashton-Prolla P, Bakos L, Junqueira G Jr, Giugliani R, Azevedo SJ, Hogg D. Clinical and molecular characterization of patients at risk for hereditary melanoma in southern Brazil. **J Invest Dermatol.** 2008 Feb;128(2):421-5.
- Alana Karla Savegnago, Rosângela Maria da Silva, Cíntia Jonhston, Ana Maria Martins, Ana Paula L. de Melo, Werther Brunow de Carvalho. Systematic review of functional assessment scales in Pompe disease. **Rev. paul. pediatr.** vol.30 no.2, São Paulo, junho 2012.
- Almeida ML de. Niemann pick tipo C: caracterização fenotípica e genotípica de uma casuística brasileira. 2016. Dissertação (Mestrado em Neurologia do Desenvolvimento e Neurofisiologia Clínica) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016. doi:10.11606/D.17.2017.tde-06062017-165658. Acesso em: 2018-10-31.
- Atul Mehta, Michael Beck, Aleš Linhart, Gere Sunder-Plassmann, and Urs Widmer. History of lysosomal storage diseases: an overview. *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS.* **Oxford: Oxford PharmaGenesis;** 2006.
- Azevedo AC, Schwartz IV, Kalakun L, Brustolin S, Burin MG, Beheregaray AP, et al. Clinical and biochemical study of 28 patients with mucopolysaccharidosis type VI. **Clin Genet.** 2004;66:208-13.
- Auclair D, Hopwood JJ, Brooks DA, Lemontt JF, Crawley AC. Replacement therapy in Mucopolysaccharidosis type VI: advantages of early onset of therapy. **Mol. Genet. Metab.** 2003 Mar;78(3):163-74
- Braga F, Fonseca A. 2008. Manual de Rotinas em Triagem Neonatal. **Ed. Rubio LTDA,** 2008, 128 pg.

Baehner F, Schmiedeskamp C, Krummenauer F, Miebach E, Bajbouj M, Whybra C, Kohlschutter A, Kampmann C, Beck M. Cumulative incidence rates of the mucopolysaccharidoses in Germany. **Journal of inherited metabolic disease**. 2005;28:1011–1017.

Barth ML, Giugliani R, Gondenfum S et al. Application of a flowchart for the detection of lysosomal storage diseases in 105 high-risk brazilian patients. **American Journal of Medical Genetics**, n.37, p.534-538, 1990

Braunlin E, Steinberger J, DeFor T, Orchard P, Kelly AS. Metabolic Syndrome and Cardiovascular Risk Factors after Hematopoietic Cell Transplantation in Severe Mucopolysaccharidosis Type I (Hurler Syndrome). **Biol. Blood Marrow Transplant**. 2018 Jun;24(6):1289-1293.

Beck M. Therapy for Lysosomal Storage Diseases. **IUBMB Life** 2010; 62: 33-40.

Bellettato CM, Scarpa M. Pathophysiology of neuropathic lysosomal storage disorders. **J Inherit Metab Dis**. 2010; 33:347-62.

Bembi B, Cerini E, Danesino C, Donati MA, Gasperini S, Morandi L *et al*. Management and treatment of glycogenosis type II. **Neurology** 2008;71 (23 Suppl 2):S12-36.

Bender, F. Triagem neonatal para mucopolissacaridose tipo VI (Síndrome de Maroteux-Lamy) em uma região com alta incidência da doença. (2011). www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/48987/000829246

Beutler E, Grabowski G (2001) Gaucher disease. In: Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D (eds) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. **McGraw-Hill**, New York, pp 3635-3668.

Bondeson ML, Dahl N, Malmgren H, Kleijer WJ, Tonnesen T, et al. (1995) Inversion of the IDS gene resulting from recombination with IDS-related sequences is a common cause of the Hunter syndrome. **Hum Mol Genet** 4:615–621.

Byers S, Rozaklis T, Brumfield LK, Ranjeri E, Hopwood JJ. Glycosaminoglycan accumulation and excretion in the mucopolysaccharidosis: characterization and basis of a diagnostic test for MPS. **Molecular Genetics Metabolis**. 65:282-290 (2010).

Burrow TA, Hopkin RJ, Leslie ND, Tingle BT, Grabowski GA. Enzyme reconstitution/replacement therapy for lysosomal storage diseases. **Curr Opin Pediatr**. 2007;19: 628-35.

Camargo Neto, E. et al. Neonatal screening for four lysosomal storage diseases with a digital microfluidics platform: Initial results in Brazil. **Genet. Mol. Biol.** 41, 414–416 (2018).

Carolina Alves Mizuno, Joseane Brostel Figueiredo, Ismária Tavares Viana Teza, Létícia Gondim Naves Taira, Tainah de Almeida Silva, Darlene Lousan Paixão, José Carlos Mizuno. Aspectos clínicos da mucopolissacaridose tipo VI. **Rev Bras Clin Med.**8(4):356-61 (2010).

Cassiano Augusto Braga Silva. Doença de Fabry. **Rev. Med. UFPR** 4(1): 23-30. Jan-mar/2017.

Chamoles NA, Blanco MB, Gaggioli D, Casentini C, (2001). Hurler-like phenotype: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. **Clin Chem.** Dec; 2001, 47(12):2098-102.

Chih-Kuang C. MPS screening methods, the Berry spot and acid turbidity tests, cause a high incidence of false-negative results in Sanfilippo and Morquio Syndromes. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v.16, n.5, p.253-258, 2002.

Chien YH, Chiang SC, Zhang XK, Keutzer J, Lee NC, Huang AC, Chen CA, Wu MH, Huang PH, Tsai FJ, Chen YT, Hwu WL. Early detection of Pompe disease by newborn screening is feasible: results from the Taiwan screening program. **Pediatrics.** 2008;122:39-45

Choudhury S, Meehan S, Shin HT. Fabry disease: an atypical presentation. **Pediatric Dermatology.** 2005; 22 (4):334-7.

Chkioua L, Boudabous H, Jaballi I, Grissa O, Turkia HB, Tebib N, Laradi S. Novel splice site IDUA gene mutation in Tunisian pedigrees with hurler syndrome. **Diagn Pathol.** 2018 May 29;13(1):35.

Chuang CK, Lin HY, Wang TJ, Huang YH, Chan MJ, Liao HC, Lo YT, Wang LY, Tu RY, Fang YY, Chen TL, Ho HC, Chiang CC, Lin SP. Status of newborn screening and follow up investigations for Mucopolysaccharidoses I and II in Taiwan. **Orphanet J Rare Dis.** 2018 May 25;13(1):84.

Costa-Motta FM, Acosta AX, Abé-Sandes K, Bender F, Schwartz IV, Giugliani R, Leistner-Segal S. Genetic studies in a cluster of Mucopolysaccharidosis Type VI patients in Northeast Brazil. **Mol Genet Metab.** 2011 Sep 20.

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. **Clinica Chimica Acta** Vol. 372, Issus 1-2, October, 2006 pp 98 – 102.

Congedi S, Orzales M, Di Pede C, Benini F. Pain in Mucopolysaccharidoses: Analysis of the Problem and Possible Treatments. **Int J Mol Sci.** 2018 Oct 8;19(10).

Cunniff C. The Committee on Genetics. Prenatal screening and diagnosis for pediatricians. **Pediatrics.** 2004; 114: 889-894.

Cupler EJ, Berger KI, Leshner RT, Wolfe GI, Han JJ, Barohn RJ, Kissel JT, AANEM. Consensus Committee on Late-onset Pompe Disease. Consensus treatment recommendations for late-onset Pompe disease. **Muscle Nerve**. 2012; 45(3):319-33.

Dajnoki A, Muhl A, Fekete G, Keutzer J, Orsini J, Dejesus V, Zhang XK, Bodamer OA. Newborn screening for Pompe disease by measuring acid alpha-glucosidase activity using tandem mass spectrometry. **Clin Chem**. 2008;54:1624-9.

Dajnoki A, Fekete G, Keutzer J, Orsini JJ, De Jesus VR, Chien YH, Hwu WL, 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; 411:1428-31.

Da Silva EMK, Strufaldi MWL, Andriolo RB, Silva LA. Enzyme replacement therapy with idursulfase for mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome). **Cochrane Database Syst Rev** 2014,1:CD008185

D'Aco K, Underhill L, Rangachari L, Arn P, Cox GF, Giugliani R, Okuyama T, Wijburg F, Kaplan P. Diagnosis and treatment trends in mucopolysaccharidosis I: findings from the MPS I Registry. **Eur J Pediatr**. 2012 Jun;171(6):911-9.

de Duve C. Lysosomes, a new group of cytoplasmic particles. In: Hayashi T, editor. Subcellular particles. **New York: Ronald Press**; 1959. p. 128–59.

de Duve C. Lysosomes revisited. **Eur J Biochem**. 1983;137:391–7.

DE Jong, J. G.; Dimethylmethylene blue-based Spectrophotometry of glycosaminoglycam. In untreated urine: a rapid Screening procedure for mucopolysaccharidosis. **Clinical Chemistry**, v.35, n.7, p.1472, 1989.

DE Paula AC, Bertola DR, Albano LMJ, et al. Achados radiológicos em pacientes com mucopolissacaridose tipo VI. **Rev Imagem**. 2006;28(1):7-12.

de Souza MV, Krug BC, Picon PD, Schwartz IV. (2010). High cost drugs for rare diseases in Brazil: the case of lysosomal storage disorders. **Cien Saude Colet**. 2010 Nov;15 Suppl 3:3443-54.

Deming D, Lee K, McSherry T, et al. The molecular basis for Pompe disease revealed by the structure of human acid α -glucosidase. **bioRxiv**. 2017.

Demydchuk M, Hill CH, Zhou A, Bunkóczi G, Stein PE, Marchesan D, Deane JE, Read RJ. Insights into Hunter syndrome from the structure of iduronate-2-sulfatase. **Nat Commun**. 2017 Jun 8;8:15786.

De Ruisseau, LR, Fuller DD, Qiu, K, De Ruisseau KC, Donnelly Jr WH, Mah, C, Reier PJ, Byrne BJ. Neural deficits contribute to respiratory insufficiency in Pompe disease. **Proc Natl Acad Sci**. USA 2009, 106:9419–24.

Eisengart JB, Rudser KD, Xue Y, Orchard P, Miller W, Lund T, Van der Ploeg A, Mercer J, Jones S, Mengel KE, Gökce S, Guffon N, Giugliani R, de Souza CFM, Shapiro EG, Whitley CB. Long-term outcomes of systemic therapies for Hurler syndrome: an international multicenter comparison. **Genet Med.** 2018 Mar 8.

Elliott S, Buroker N, Cournoyer JJ, Potier AM, Trometer JD, Elbin C, Schermer MJ, Kantola J, Boyce A, Turecek F, Gelb MH, Scott CR. Pilot study of newborn screening for six lysosomal storage diseases using Tandem Mass Spectrometry. **Mol Genet Metab.** 2016 Aug;118(4):304-9.

Federhen A, Vairo FP, Vanzella C, Boer AP, Baldo G, Giugliani R. Pesquisa clínica e doenças raras: a situação no Brasil. **J Bras Econ Saúde;** 2014 Supl.(1): 17-23.

Ferreira JP e Colaboradores. Pediatria: Diagnóstico e Tratamento. **Artmed.** 2005, Seção 21, 775-776.

Fletcher JM. Screening for lysosomal storage disorders--a clinical perspective. **J Inherit Metab Dis.** 2006;29:405-8.

Froissart R, Da Silva IM & Maire I. Mucopolysaccharidosis type II: an update on mutation spectrum. **Acta Paediatr. Suppl.** 96, 71–77 (2007).

Gelb MH, Scott CR & Turecek F. Newborn Screening for Lysosomal Storage Diseases. **Clin. Chem.** 61, 335–346 (2015).

Giugliani R, Harmatz P, Wraith JE, (2007). Management guidelines for mucopolysaccharidosis VI. **Pediatrics.**2007, 20(2):405-18.

Giugliani R, Rojas VM, Martins AM, Valadares ER, Clarke JT, Góes JE, Kakkis ED, Worden MA, Sidman M, Cox GF. A dose-optimization trial of laronidase (Aldurazyme) in patients with mucopolysaccharidosis I. **Mol Genet Metab.** Jan;96(1):13-9. Epub 2008, Nov 26.

Giugliani R, Federhen A, Michelin-Tirelli K, Riegel M, Burin M. Relative frequency and estimated minimal frequency of Lysosomal Storage Diseases in Brazil: Report from a Reference Laboratory. **Genet Mol Biol.** 2017 Jan-Mar;40(1):31-39.

Giugliani R, Federhen A, Rojas MVM, Vieira TA, Artigalás O, Pinto LLC et al. Terapia de reposição enzimática para as mucopolissacaridoses I, II e VI: Recomendações de um grupo de especialistas brasileiros. **Rev. Assoc. Med. Bras.** vol.56 no.3 São Paulo 2010.

Genetics Home Reference. Reviewed: January 2015.
<https://ghr.nlm.nih.gov/condition/niemann-pick-disease#statistics>.
(acesso/out/2018).

Grabowski GA, Saal HM, Wenstrup RJ, Barton NW. Gaucher disease: a prototype for molecular medicine. **Crit Rev Oncol Hematol**. 1996;23:25-55.

Guillén-Navarro E, Blasco AJ, Gutierrez-Solana LG, et al. Clinical practice guideline for the management of Hunter syndrome. Hunter España working group. **Med Clin (Barc)** 2013;141453:e1–3.

Gustavo Cabrera, Fernando Perrettab. Fabry disease. A potential pitfall A family with a novel intronic mutation. **Molecular Genetics and Metabolism Reports** 17 (2018) 16–17.

Guo Y, He W, Boer AM, Wevers RA, de Bruijn AM, Groener JE, Hollak CE, Aerts JM, Galjaard H, van Diggelen OP Elevated plasma chitotriosidase activity in various lysosomal storage disorders. **J Inherit Metab Dis**.1995; 18: 717-722.

Harmatz P, Kramer WG, Hopwood JJ, Simon J, Butensky E, Swiedler SJ; Mucopolysaccharidosis VI Study Group. Pharmacokinetic profile of recombinant human N-acetylgalactosamine 4-sulphatase enzyme replacement therapy in patients with mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome): a phase I/II study. **Acta Paediatr Suppl**. 2005 Mar;94(447):61-8; discussion 57.

Harmatz P, Giugliani R, Schwartz I, Guffon N, Teles EL, Miranda MC, Wraith J E, BECK M, Arash L, Scarpa M, YU ZF, Wittes J, Berger K I, Newman MS, Lowe AM, Kakkis E, Swiedler SJ. MPS VI Phase 3 Study Group. Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis VI: a phase 3, randomized, double-blind, placebo-controlled, multinational study of recombinant human N-acetylgalactosamine 4-sulfatase (recombinant human arylsulfatase B or rhASB) and follow-on, open-label extension study. **J Pediatr**. 2006 Apr;148(4):533-539.

Harrison R, Schaefer S, Warner L, Mercer J, Jones S, Bruce I. Transnasal adenoidectomy in mucopolysaccharidosis. **Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol**. 2018 Aug;111:149-152.

Hendriksz CJ, Giugliani R, Harmatz P, Mengel E, Guffon N, Valayannopoulos V, Parini R, Hughes D, Pastores GM, Lau HA, Al-Sayed MD, Raiman J; STRIVE Investigators, Yang K, Mealiffe M, Haller C. Multi-domain impact of elosulfase alfa in Morquio A syndrome in the pivotal phase III trial. **Mol Genet Metab**. 2015 Feb;114(2):178-85.

Hopkins PV, Campbell C, Klug T, Rogers S, Raburn-Miller J, Kiesling J. Lysosomal storage disorder screening implementation: findings from the first six months of full population pilot testing in Missouri. **J Pediatr**. 2015 Jan;166(1):172-7.

Hwu WL, Chien YH, Lee NC, Chiang SC, Dobrovolny R, Huang AC, Yeh HY, Chao MC, Lin SJ, Kitagawa T, Desnick RJ, Hsu LW. Newborn screening for Fabry disease in Taiwan reveals a high incidence of the later-onset GLA mutation c.936+919G>A (IVS4+919G>A). **Hum Mutat.** 2009;30:1397-405.

Hurler G (1919) Über einen Typ multipler Abartungen, vorwiegend am Skelettsystem. **Z Kinderheilk** 24:220-234.

Huang, M. M., Wong, A., Yu, X., Kakkis, E., and Kohn, D. B. (1997). Retrovirus mediated transfer of the human alpha-L-iduronidase cDNA into human hematopoietic progenitor cells leads to correction in trans of Hurler fibroblasts. **Gene Ther.**4: 1150 – 1159.

Hruska KS, LaMarca ME, Scott CR, Sidransky E. Gaucher disease: mutation and polymorphism spectrum in the glucocerebrosidase gene (GBA). **Hum. Mutat.** 2008, 29, 567–583.

Ishida A, Pinto J Á, Kuwajima SS, Et al. DOENÇA OSTEOMETABÓLICA. IN: Hebert S, Barros TEPF, Xavier R, et al. (editores). **Ortopedia e traumatologia: princípios e prática.** 4ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2009. p. 843-7.

Kasper DC, Herman J, De Jesus VR, Mechtler TP, Metz TF, Shushan B. The application of multiplexed, multi-dimensional ultra-high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry to the high-throughput screening of lysosomal storage disorders in newborn dried bloodspots. **Rapid Commun Mass Spectrom.** 2010; 24:986-94.

Khoury MJ. Relation between medical genetics and public healthy: changing the paradigm of disease prevention and the definition of a genetic disease. **American Journal of Medical Genetics.** 71:289-291.1997.

Khan SA, Peracha H, Ballhausen D, Wiesbauer A, Rohrbach M, Gautschi M, Mason RW1, Giugliani R, Suzuki Y, Oriti KE, Oriti T, Tomatsu S. Epidemiology of mucopolysaccharidoses. **Mol Genet Metab.** 2017 Jul;121(3):227-240.

Kircher SG *et al.* Therapy. In: Mucopolysaccharidoses – a guide for physicians and parents. **International Medical Publishers**, p.72 a 80, 2007.

Kobayashi H, Ariga M, Sato Y, Fujiwara M, Fukasawa N, Fukuda T, Takahashi H, Ikegami M, Kosuga M, Okuyama T, Eto Y, Ida H. P-Tau and Subunit c Mitochondrial ATP Synthase Accumulation in the Central Nervous System of a Woman with Hurler-Scheie Syndrome Treated with Enzyme Replacement Therapy for 12 Years. **JIMD Rep.** 2018; 41:101-107.

Köping M, Shehata-Dieler W, Schneider D, Cebulla M, Oder D, Müntze J, Nordbeck P, Wanner C, Hagen R, Schraven SP. Characterization of vertigo and hearing loss in patients with Fabry disease. **Orphanet J Rare Dis.** 2018 Aug 15;13(1):137.

Kuhn MI, Victor Borges V, Bock PM. Tratamento da Doença de Pompe - deficiência da alfa-glicosidase ácida. **Infarma-Ciências Farmacêuticas**. v. 26, n. 3 (2014); 179-187.

Lei K, Zhao Y, Sun L, Liang H, Luo R, Sun X, Tao Y, Chen L, Zhang L, Li A, Li F, Ding H. A pilot screening of high-risk Gaucher disease children using dried blood spot methods in Shandong province of China. **Orphanet Journal of Rare Diseases**. 2018 (13:48).

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**. 2004;50:1785-96.

Lin HY, Lee CL, Lo YT, Wang TJ, Huang SF, Chen TL, Wang YS, Niu DM, Chuang CK, Lin SP. The relationships between urinary glycosaminoglycan levels and phenotypes of mucopolysaccharidoses. **Mol Genet Genomic Med**. 2018 Sep 16.

Litjens T, Baker EG, Beckmann KR, Hopwood JJ, (1989). Chromosomal localization of ARSB, the gene of human N-acetylgalactosamine-4-sulfatase. **Hum Genet**. 1989, 82:67-68.

Llerena JC Jr, Horovitz DM, Marie SK, Porta G, Giugliani R, Rojas MV et al. The Brazilian consensus on the management of Pompe disease. **J Pediatr**. 2009; 155 (Suppl 4):S47-56.

Lyseng-Williamson KA. Miglustat: a review of its use in Niemann-Pick disease type C. **Drugs**. 2014 Jan;74(1):61-74.

Martin R, Beck M, Eng C, Giugliani R, Harmatz P, Muñoz V, et al. Recognition and diagnosis of mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome). **Pediatrics**. 2008;121(2):e377-86.

Martins AM. Inborn errors of metabolism: a clinical overview. **Sao Paulo Med J/Rev Paul Med** 1999; 117(6):251-65.

Martins AM. Erros Inatos do Metabolismo: Abordagem Clínica, 2a ed. **São Paulo**, 2003.

McGill JJ, Inwood AC, Coman DJ, Lipke ML, de Lore D, Swiedler SJ and Hopwood JJ. Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis VI from 8 weeks of age - a sibling control study. **Clin Genet**. 2010;77:492-8.

Meikle PJ, Grasby DJ, Dean CJ, Lang DL, Bockmann M, Whittle AM, Fietz MJ, Simonsen H, Fuller M, Brooks DA, Hopwood JJ. Newborn screening for lysosomal storage disorders. **Mol Genet Metab**. 2006;88:307-14.

Mechtler TP, Stary S, Metz TF, De Jesús VR, Greber-Platzer S, Pollak A, Herkner KR, Streubel B, Kasper DC. Neonatal screening for lysosomal storage disorders: feasibility and incidence from a nationwide study in Austria. **Lancet**. 2012; 379:335-41.

Meikle PJ, Hopwood JJ, *et al.* Prevalence of lysosomal storage disorders. **JAMA**. 1999; 2813:249-54.

Mehta A, Beck M, Sunder-Plassmann G. Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS. **Oxford: Oxford PharmaGenesis**. 2006.

Mellies U, Lofaso F. Pompe disease: a neuromuscular disease with respiratory muscle involvement. **Respir Med**. 2009;103(4):477–84

Michael H. Gelb, C. Ronald Scott, Frantisek Turecek. Newborn Screening for Lysosomal Storage Diseases. **Clin Chem**. 2015 Feb; 61(2): 335–346.

Metzer ML. 2010. Sequencing technologies- the next generation sequencing. **Nat Rev Genet**. 11:31-46.

Michelin K, Wajner A, Bock H, Fachel A, Rosenberg R, Pires RF, Pereira ML, Giugliani R, Coelho JC. Biochemical properties of beta-glucosidase in leukocytes from patients and obligated heterozygotes for Gaucher disease carriers. **Clin Chim Acta**. 2005 Dec;362(1-2):101-9.

Muenzer J. The Mucopolysaccharidoses: A Heterogeneous group of disorders with variable pediatric presentations. **J Pediatric Suppl** 2004; 144:27-34.

Muenzer J, Wraith JE, Clarke LA; International Consensus Panel on Management and Treatment of Mucopolysaccharidosis I. Mucopolysaccharidosis I: management and treatment guidelines. **Pediatrics**.2009;123 (1):19– 29.

Muenzer J, Beck M, Eng CM, Escolar ML, Giugliani R, Guffon NH, Harmatz P, Kamin W, Kampmann C, Koseoglu ST, Link B, Martin RA, Molter DW, Muñoz Motlagh B, Taghikhani M, Khatami S, Zamanfar D. Allelic Frequency of a 24-bp Duplication in Exon 10 of the CHIT1 Gene in the General Iranian Population. **Genet Test Mol Biomarkers**. 2016 Jan;20(1):31-6.

Nelson J. Incidence of the Mucopolysaccharidoses in Northern Ireland. **HUM GENET**.1997 DEC, 101 (3):355-8.

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

Neufeld EF, Muenzer J. 2007. The Mucopolysaccharidoses. In: Valle D, Beaudet AL, Vogelstein B, Antonarakis SE, Ballabio A, editors. Scriver's The online metabolic & molecular bases of inherited disease. **New York: The McGraw-Hill Companies, Inc**. <http://dx.doi.org/10.1036/ommbid.165>.

Neufeld, E.F.; Muenzer, J. The Mucopolysaccharidoses. In **The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**; **McGraw-Hill Medical**: New York, NY, USA, 2014.

Oliveira MCLA, Oliveira BM, Queirós E, Viana MB. Aspectos clínicos e nutricionais da doença de Gaucher: estudo prospectivo de 13 crianças em um único centro. **Jornal de Pediatria**. Vol. 78, Nº6, 2002.

Pastores GM, Hughes DA. Non-neuronopathic lysosomal storage disorders: Disease spectrum and treatments. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**. 2015 Mar;29(2):173-82.

Pavlú-Pereira H, Asfaw B, Poupctová H, Ledvinová J, Sikora J, Vanier MT, Sandhoff K, Zeman J, Novotná Z, Chudoba D, Elleder M. Acid sphingomyelinase deficiency. Phenotype variability with prevalence of intermediate phenotype in a series of twenty-five Czech and Slovak patients. A multi-approach study. **J Inherit Metab Dis**. 2005;28(2):203-27.

Peckham CS, Dezateux C. Issues underlying the evaluation of screening programmes. **Br. Med. Bull**. 1998, 54 (4):767-778.

Pereira EC, Sacomani DG, Pereira AA da Motta. Manifestações clínicas na Mucopolissacaridose do tipo II grave: Relato de Caso. **Rev Neurocienc**. 2011;19(4):675-680.

Peters C, Rommerskirch W, Modaressi S, Von-Figura K. Restoration of arylsulphatase B activity in human mucopolysaccharidosis-type-VI fibroblasts by retroviral-vector-mediated gene transfer. **Biochem J**. Junho 1991;1;276 (Pt 2):499-504.

Poorthuis BJ, Wevers RA, Kleijer WJ, Groener JE, de Jong JG, van Weely S, Niezen-Koning KE, van Diggelen OP. The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. **Hum Genet**. 1999;105:151-6.

Portal do Ministério da Saúde.

http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/triagem_neonatal.pdf. **Acesso online**. 2018.

Poupetova H, Ledvinova J, Berna L, Dvorakova L, Kozich V, Elleder M. The birth prevalence of lysosomal storage disorders in the Czech Republic: comparison with data in different populations. **Journal of inherited metabolic disease**. 2010;33:387–396.

Pinto R, Caseiro C, Lemos M, Lopes L, Fontes A, Ribeiro H, Pinto E, Silva E, Rocha S, Marcao A, Ribeiro I, Lacerda L, Ribeiro G, Amaral O, Sa Miranda MC. Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal. **European journal of human genetics:EJHG**. 2004;12:87–92

Raghachaitanya Sakuru; Pradeep C. Bollu. Hurler Syndrome. **Treasure Island (FL): StatPearls Publishing**; 2018 Jan.

Rajeev Gupta, Chandra Bhushan Pandey, Sunil Tripathi. Mucopolysaccharidosis type II (Hunter's syndrome) e A clinical case report. **Journal of indian college of cardiology**. 5 (2015) 61-66.

Read A, Donnai D. Genética clínica - Uma nova abordagem. Ed. **Artmed** (2008).

Ries M, Gupta S, Moore DF, et al. Pediatric Fabry disease. **Pediatrics**. 2005; 115(3):344-355.

Rodrigues R, Marchiori E, Müller NL. Niemann-Pick disease: high-resolution CT findings in two siblings. **J Comput Assist Tomogr**. 2004;28(1):52-4.

Rojas MV, Ogilvie JW, Parini R, Ramaswami U, Scarpa M, Schwartz IV, Wood RE, Wraith E. Multidisciplinary management of Hunter syndrome. **Pediatrics**. 2009 Dec;124(6):e1228-39.

Sakuru R, Bollu PC. Hurler Syndrome. **StatPearls** [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018-2018 Oct 3.

Sanseverino MT, Kessler RG, Burin MG, Stein NR, Herman RF, Matte U, Magalhães JA. Diagnóstico pré-natal: avanços e perspectivas. *Revista HCPA*. 2001 (3).

Saudubray JM & Charpentier C. Clinical Phenotypes: Diagnosis/Algorithms. In: Scriver C, Beaudet L, Sly W, editors. **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**. New York, NY: Mc Graw-Hill; 1995. p. 327–400.

Saudubray JM, Garcia-Cazorla À. Inborn Errors of Metabolism Overview: Pathophysiology, Manifestations, Evaluation, and Management. **Pediatr Clin North Am**. 2018 Apr;65(2):179-208

Sainz CM, Muñoz CZ, Monteagudo AGQ. Errores innatos del metabolismo. Enfermedades lisosomales. **Rev Cubana Pediatr** 2002; 74(1): 68-76.

Schwartz I, Matte U, Leistner S, Giugliani R. Mucopolissacaridoses. In: Doenças Genéticas em Pediatria. (ed: **Gerson Karakushansky**) **Guanabara Koogan**. Rio de Janeiro, 2001, pp 180-184.

Schwartz IV, Fischinger CM de S, Giugliani R. Tratamento de erros inatos do metabolismo. **J. Pediatr**. (Rio J.) vol.84 no.4 suppl. Porto Alegre Ago. 2008.

Schuchman EH, Desnick RJ. Types A and B Niemann-Pick disease. **Mol Genet Metab**. 2017 Jan - Feb;120(1-2):27-33.

Scarpa M, Almássy Z, Beck M, et al. Hunter Syndrome European Expert Council. Mucopolysaccharidosis type II: European recommendations for the diagnosis and multidisciplinary management of a rare disease. **Orphanet J Rare Dis**. 2011;6:72.

Scott HS, Bunge S, Gal A, Clarke LA, Morris CP, Hopwood JJ. Molecular genetics of mucopolysaccharidosis type I: diagnostic, clinical, and biological implications. **Hum Mutat**. 1995;6:288–302.

Sheth J, Patel P, Sheth F, Shah R. Lysosomal storage disorders. **Indian Pediatr**. 2004;41:260-5.

Schrijver I, Aziz N, Farkas DH *et al*. Opportunities and challenges associated with clinical diagnostic genome sequencing: A report of the association for molecular pathology. **J Mol Diagn**. 2012. (10.1016/j.jmoldx.2012.04.006).

Scott HS, Bunge S, Gal A, Clarke LA, Morris CP, Hopwood JJ. Molecular genetics of mucopolysaccharidosis type I: diagnostic, clinical, and biological implications. **Hum Mutat**. 1995;6(4):288-302.

Sanchez M. Mucopolisacaridosis. In.: SANRURJO, P.; BALDELLOU, A. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias. Majadahonda: **Ergon**. 2006. p.621-629 Kessler.

Simpson WL Jr, Mendelson D, Wasserstein MP, McGovern MM. Imaging manifestations of Niemann-Pick disease type B. **AJR Am J Roentgenol**. 2010 Jan;194(1):W12-9.

Spada M, Pagliardini S, Yasuda M, Tükel T, Thiagarajan G, Sakuraba H, Ponzzone A, Desnick RJ. High incidence of later-onset fabry disease revealed by newborn screening. **Am J Hum Genet**. 2006;79:31-40.

Spada M, Baron R, Elliott PM, Falissard B, Hilz MJ, Monserrat L, Tøndel C, Tyłki-Szymańska A, Wannier C, Germain DP. The effect of enzyme replacement therapy on clinical outcomes in paediatric patients with Fabry disease - A systematic literature review by a European panel of experts. **Mol Genet Metab**. 2018 Apr 26. pii: S1096-7192(18)30186-0.

Sodré LSS, Huaira RMNH, Bastos MG, Colugnati FAB, Coutinho MP, Fernandes NMDS. Screening for Fabry Disease in Kidney Disease: a Cross-Sectional Study in Males and Females. **Kidney Blood Press Res**. 2017;42(6):1258-1265.

Sohn YB, Cho SY, Park SW, Kim SJ, Ko AR, Kwon EK, Han SJ, Jin DK. Phase I/II clinical trial of enzyme replacement therapy with idursulfase beta in patients with mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome). **Orphanet J Rare Dis**. 2013 Mar 18;8:42.

Souza CFM, Schwartz IV, Giugliani R. Triagem neonatal de distúrbios metabólicos. **Ciência & Saúde Coletiva**. 2002; 7(1):129-37.

Stirnemann J, Belmatoug N, Camou F, Serratrice C, Froissart R, Caillaud C, Levade T7, Astudillo L, Serratrice J, Brassier A, Rose C, Billette de Villemeur T, Berger MG. A Review of Gaucher Disease Pathophysiology, Clinical Presentation and Treatments. **Int J Mol Sci**. 2017 Feb 17;18(2).

Suarez-Guerreroa JL, Higuera PJIG, Flórez JSA, Contreras-García GA. Mucopolisacaridosis: características clínicas, diagnóstico y de manejo. **Rev Chil Pediatr**. 2016;87(4):295-304.

Suarez-Guerrero JL, Gómez Higuera PJ, Arias Flórez JS, Contreras-García GA. Mucopolysaccharidosis: clinical features, diagnosis and management. **Revista Chilena de Pediatría** [21 Nov 2015, 87(4):295-304].

Suzuki S, Ono N, Furusawa C et al., 2011. Comparison of sequence reads obtained from three next-generation sequencing platforms. **Plos One**. 6:e19534 - 2011.

Tager JM et al. Metabolic consequences of genetic defects in lysosomes. **Biochem. Soc. Trans.** n.12, p.902-905, 1984.

Tebani, C. Afonso, S. Bekri. Advances in metabolome information retrieval: turning chemistry into biology. Part I: analytical chemistry of the metabolome. **J. Inherit. Metab. Dis.** (2017).

Thirumal Kumar D, Umer Niazullah M, Tasneem S, Judith E, Susmita B, George Priya Doss C, Selvarajan E, Zayed H. A computational method to characterize the missense mutations in the catalytic domain of GAA protein causing Pompe disease. **J Cell Biochem.** (2018).

Tylki-Szymańska A, Szymańska-Rożek P, Hasiński P, Ługowska A. Plasma chitotriosidase activity versus plasma glucosylsphingosine in wide spectrum of Gaucher disease phenotypes - A statistical insight. **Mol Genet Metab.** Apr;123(4):495-500. (2018).

Uttarilli A, Pasumarthi D, Ranganath P, Dalal AB. Functional characterization of arylsulfatase B mutations in Indian patients with Maroteaux-Lamy syndrome (mucopolysaccharidosis type VI). **Gene**. 2017 Jan 30;599:19-27.

Wasserstein MP, Caggana M, Bailey SM, Desnick RJ, Edelman L, Estrella L, Holzman I, Kelly NR, Kornreich R, Kupchik SG, Martin M, Nafday SM, Wasserman R, Yang A, Yu C, Orsini JJ. The New York pilot newborn screening program for lysosomal storage diseases: Report of the First 65,000 Infants. **Genet Med**. 2018 Aug 10.

Wasserstein MP1, Aron A, Brodie SE, Simonaro C, Desnick RJ, McGovern MM. Acid sphingomyelinase deficiency: prevalence and characterization of an intermediate phenotype of Niemann-Pick disease. **J Pediatr.** 2006 Oct;149(4):554-9.

Wasserstein MP, Diaz GA, Lachmann RH, Jouvin MH, Nandy I, Ji AJ, Puga AC. Olipudase alfa for treatment of acid sphingomyelinase deficiency (ASMD): safety and efficacy in adults treated for 30 months. **J Inherit Metab Dis.** 2018 Sep;41(5):829-838.

Wenger DA, Coppola S, Liu SL. Insights into the diagnosis and treatment of lysosomal storage diseases. **Arch Neurol.** 2003;60:322-8.

Whitley CB et al. Urine glycosaminoglycan excretion quantified by an automated semimicro method in specimens conveniently transported from around the globe. **Molecular Genetics and Metabolism.** n.75, p.56-64, 2002.

Wilson JMG, Junger G. Principles and practice of screening for disease. 1998.<http://www.gp-training.net/training/tutorials/management/audit/screen.htm>.
Acesso online.

Wynn RF, Wraith JE, Mercer J, et al. Improved metabolic correction in patients with lysosomal storage disease treated with hematopoietic stem cell transplant compared with enzyme replacement therapy. **The Journal of pediatrics.** 2009; 154(4):609–611.

Wood T.C., Harvey K., Beck M. Diagnosing mucopolysaccharidosis IVA. **J Inherit Metab Dis.** 2013;36:293-307.

Zhou H, Fernhoff P, Vogt RF. Newborn bloodspot screening for lysosomal storage disorders. **J Pediatr.** 2011; 159:7-13.e1.

ARTIGO

7. ARTIGO

Título do manuscrito: Newborn screening for lysosomal disorders in Brazil: a pilot study using a customized fluorimetric assays

Autores: Fernanda Bender, Maira G. Burin, Kristiane M. Tirelli, Fernanda Medeiros, Fernanda Bitencourt, Gabriel Civallero, Francyne Kubaski, Heydy Bravo, Antoine Daher, Vanessa Carnier, José F. S. Franco, Roberto Giugliani

Revista: Genetics and Molecular Biology

Situação: submetido

Genetics and Molecular Biology

Original article

Newborn screening for lysosomal disorders in Brazil: a pilot study using a customized fluorimetric assay

Fernanda Bender^{1,2}, Maira G. Burin¹, Kristiane M. Tirelli¹, Fernanda Medeiros^{1,2},
Fernanda Bitencourt¹, Gabriel Civallero¹, Francyne Kubaski^{1,3,4}, Heydy Bravo¹,
Antoine Daher⁵, Vanessa Carnier^{5,6}, José F. S. Franco⁶, Roberto Giugliani^{1,2,3,4}

¹ Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

² Postgraduation Program in Medicine: Medical Sciences, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

³ Department of Genetics, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

⁴ INAGEMP, Porto Alegre, RS, Brazil

⁵ Casa Hunter, São Paulo, SP, Brazil

⁶ Hospital da PUC-Campinas/Hospital e Maternidade Celso Pierro, Campinas, Brazil

Corresponding author:

Fernanda Bender, MD, PhD

Medical Genetics Service, Hospital de Clinicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, RS 90035-903, Brazil

+55 51 33598011 - Fax +55 51 33598010

E-mail: bender.fernanda@gmail.com

Abstract

Introduction: Lysosomal storage disorders (LSDs) are a group of genetic disorders characterized by deficiency of specific lysosomal proteins, usually enzymes. In general, babies with these diseases are clinically normal at birth, and progressively develop severe signs and symptoms. Diagnosis is usually made several years after onset of manifestations, preventing patients to have the benefits of the early treatment. Newborn screening programs are being considered for LSDs to allow early diagnosis and treatment with improved disease outcome. **Methods:** The present study evaluated the feasibility of a customized screening approach based on a modified fluorometric assay with reduced amounts of reagents, substrates and samples for mucopolysaccharidosis (MPS) type I (MPS I), MPS VI, Fabry, Gaucher and Pompe diseases. We have also evaluated the advantages of including blood chitotriosidase and urinary glycosaminoglycans in the protocol. **Results:** We analyzed, by measurement of the specific disease-associated enzymes (plus blood chitotriosidase and urinary glycosaminoglycans), 834 coded DBS samples of unselected newborns for MPS I, MPS VI, Fabry, Gaucher and Pompe diseases. No positive case was detected, and the false-positive rates were low. **Conclusions:** Taking into consideration the limitations of this methodology, we believe that after setting up proper cutoffs, it could be a viable alternative to provide NBS for LSDs by laboratories that could not afford the commercial methods available.

Keywords: inborn errors of metabolism, newborn screening, enzymes.

Introduction

Lysosomal storage disorders (LSD) are a group of inborn errors of metabolism (IEM) that result from the deficiency of specific hydrolases, protein activators or transport proteins, leading to accumulation of undegraded substrates in lysosomes causing biochemical changes and even cell death¹.

The LSDs include over 50 genetic disorders with specific characteristics². Although, they are considered individually rare, when combined they are estimated to occur in 1:7.700 live births³. The incidence of LSDs in Brazil is still not clear. A study reported that LSD corresponded to 60% of the IEM diagnosed from 1982 to 2015 at a reference laboratory in Brazil⁴.

Newborn screening (NBS) allows the early diagnosis of several congenital disorders that are mainly asymptomatic at the newborn period. The diagnosis allows early treatment in order to at least slow down the disease progression⁵. Ideally, the tests included in an NBS program should be based in a reliable methodology and should have the possibility of multiplexing.

In Brazil, there are few records of NBS programs involving LSDs. In Porto Alegre, Rio Grande do Sul state, the private laboratory CTN screened 10,527 babies for Fabry, Gaucher, Pompe and MPS I (Personal communication xxx). All initially positive cases were further studied until a conclusion was made, and no diagnosis was confirmed⁶. In Monte Santo, Bahia state, where there is a high incidence of MPS VI (approximately 1:5,000), a common mutation (p.His178Leu) was found in homozygosis in 13 patients and a high carrier frequency (40%) was observed⁷, confirming that founder effect and endogamy play a major role in this case. We have conducted a newborn screening pilot program for MPS VI (based on the detection of the common mutation) in Monte Santo with over 5,000 newborns tested (unpublished data).

Our aim with this study was to test a customized fluorimetric method for the assay of 5 lysosomal enzymes for the screening of MPS I, MPS VI, Fabry, Gaucher and Pompe diseases, plus the assay of the biomarkers, as blood chitotriosidase and urinary glycosaminoglycans, to check the feasibility of these methods, in order to consider them as a potential alternative to the commercially available methods.

Methods

Materials

4-methylumbelliferyl acetate, 4-Methylumbelliferyl- α -D galactopyranoside, N-Acetyl-D-galactosamine, 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucopyranoside, taurodeoxycholate hydrate, Acarbose, 4-Methylumbelliferyl- α -D-glucopyranoside, 4-Methylumbelliferyl β -D-N,N',N''triacetylchitotrioside, Ethylenediamine dihydrochloride, formic acid, Chondroitin sulfate sodium salt from shark cartilage, 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt, Sodium hydroxide (NaOH) were purchased from Sigma-Aldrich (Germany). 4-Methylumbelliferyl sulfate potassium and 4-Methylumbelliferyl α -L-iduronide were purchased from Glicosynth (United Kingdom). Sodium acetate, Sodium citrate, Sodium Phosphate, and aminoacetic acid (glycine) were purchased from Synth (São Paulo, Brazil).

Samples

Coded DBS samples of 834 newborns were collected from Hospital da PUC- Campinas and Hospital Maternidade Celso Pierro after informed consent was obtained. Urine samples of 722 newborns were obtained from the same hospital, also after informed consent was obtained. Reference values for each of the analyzed enzymes for newborns were established using 131 coded DBS samples from healthy newborns, supplied by a commercial laboratory. As no positive samples of newborns were available, samples of patients diagnosed later in life (MPS I: 22, MPS VI: 24, Fabry: 12, Gaucher: 29, Pompe: 14) were used to establish the affected reference levels. All samples were shipped to the Medical Genetics Service (MGS) of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) and stored at -20°C until the assays were conducted. This study was approved by the Institutional Review Board (IRB) from HCPA and from the Hospital da PUC-Campinas and Hospital Maternidade Celso Pierro (CAAE number: 2.824.531).

Sample preparation

Enzyme assays were performed with PerkinElmer incubator at 40rpm. Fluorescence was measured in the supernatant with a spectrofluorimeter (Spectramax M2 - Molecular Devices) with 365 nm for excitation and 450 nm of

emission. 4-metilumbeliferone and enzyme activity were expressed as nmol/h/ml. All assays were done in duplicates.

Alfa-L-iduronidase (IDUA) assay

One disk (1.5mm) was cut from DBS samples and placed into a 96 well plate with 10 μ L of milliQ water, 10 μ L of 50 mM formate buffer (pH 2.8) and 7 μ L of 2 mM 4-Methylumbelliferyl- α -L-Iduronide substrate diluted in milliQ water. In the blank wells, 240 μ L of 0.5 M glycine-NaOH buffer (pH 10.3) were added. After mixing, the microplates were sealed and incubated per 20h at 37°C with shaker (400 rpm). After incubation, the reaction was stopped by addition of 240 μ L of 0.5 M glycine-NaOH buffer (pH 10.3). Samples were centrifuged at 2.500 rpm per 10 minutes at room temperature.

Arylsulfatase B (ARSB) assay

One disk (1.5mm) was cut from DBS samples and placed into a 96 well plate with 11.5 μ L of milliQ water, 7.5 μ L of 15mM lead acetate (pH 5) in 0.05 M of sodium acetate buffer (pH 5) and 18.75 μ L of 10 mM 4-Methylumbelliferyl -- sulfate diluted in 0.05 M sodium acetate (pH 5). In the blank wells, 112.5 μ L of 0.085 M glycine-NaOH buffer (pH 10.5) were added. After mixing, the microplates were sealed and incubated per 20h at 37°C with shaker (400 rpm). After incubation, the reaction was stopped by addition of 112.5 μ L of 0.085 M glycine-NaOH buffer (pH 10.5). Samples were centrifuged at 3.000 rpm per 10 minutes at 4°C.

Alfa-galactosidase A (GLA) assay

One disk (1.5mm) was cut from DBS samples and placed into a 96 well plate with 20 μ L of 0.25 M N-Acetyl-D-galactosamine inhibitor, 50 μ L of 4-Methylumbelliferyl- α -D-galactoside substrate diluted in 0.15 M citrate-phosphate buffer (pH 4.4). In the blank wells, 230 μ L of 0.1 M ethylenediamine buffer (pH 11.4) were added. After mixing, the microplates were sealed and incubated per 20h at 37°C with shaker (400 rpm). After incubation, the reaction was stopped by addition of 230 μ L of 0.1 M ethylenediamine buffer (pH 11.4). Samples were centrifuged at 2,000 rpm per 5 minutes at room temperature.

Beta-glucocerebrosidase (ABG) assay

One disk (1.5mm) was cut from DBS samples and placed into a 96 well plate with 12.5 μ L of 0.54 M citrate-phosphate buffer (pH 5.5), 25 μ L of 10 mM 4-Methylumbelliferyl β -D-glucoside substrate and 50 mM sodium taurodeoxycholate diluted in milliQ water. In the blank wells, 250 μ L of 0.5 M glycine-NaOH buffer (pH 10.3) were added. After mixing, the microplates were sealed and incubated per 5 h at 37°C with shaker (400 rpm). After incubation, the reaction was stopped by addition of 250 μ L of 0.5 M glycine-NaOH buffer (pH 10.3). Samples were centrifuged at 3,000 rpm per 10 minutes at room temperature.

Acid alfa-glucosidase (GAA) assay

One disk (1.5mm) was cut from DBS samples and placed into a 96 well plate with 10 μ L of milliQ water, 20 μ L of 10 mM 4-Methylumbelliferyl- α -D-glucoside substrate diluted in 0.2 M citrate-phosphate buffer (pH 4) and 8 mM acarbose diluted in milliQ water. In the blank wells, 240 μ L of 0.5 M glycine-NaOH buffer (pH 10.3) were added. After mixing, the microplates were sealed and incubated per 20h at 37°C with shaker (400 rpm). After incubation, the reaction was stopped by addition of 240 μ L of 0.5M glycine-NaOH buffer (pH 10.3). Samples were centrifuged at 2.000 rpm per 5 minutes at room temperature.

Chitotriosidase assay

One disk (1.5mm) was cut from DBS samples and placed into a 96 well plate with 10 μ L of 0.25M sodium acetate (pH 5.5), 10 μ L of 0.19 nM 4-Methylumbelliferyl β -D-N'-N''-triacetylchitotrioside substrate diluted in milliQ water. In the blank wells, 250 μ L of 0.1 M ethylenediamine buffer (pH 11.3). After mixing, the microplates were sealed and incubated per 30 min at 37°C with shaker (400 rpm). After incubation, the reaction was stopped by addition of 250 μ L of 0.1 M ethylenediamine buffer (pH 11.3). Samples were centrifuged at 3.000 rpm per 10 minutes at room temperature.

Glycosaminoglycans assay

Urine samples were centrifuged at 2,000 rpm per 10 minutes. 50 μ L of sample were mixed with 1.1 mL of buffer (55 mM formic acid buffer [pH 3.3], 31 μ mol/L of dimethylmethylene-blue and 2 M tris hydroxymethyl aminomethane). After vortexing, absorbancy was immediately measured in spectrophotometer at 520 nm. Chondroitin sulfate was used for a calibration curve at the following concentrations: 50mg/L, 25 mg/L, 12.5mg/L e 5mg/L. Urinary GAGs were normalized by creatinine and concentrations were expressed as μ g/mg creatinine.

Statistical analysis

Sensitivity, specificity, false positives, false negatives were calculated using R software (R Core team, 2014). Potential cutoff values for the 5 enzymes were defined using normal newborn percentile obtained from 131 healthy newborns and enzyme level from older patients provided by our laboratory. Enzyme activity for IDUA, ARSB, GLA and GAA was expressed as nmoL/20h/mL; enzyme activity of ABG was expressed as nmoL/5h/mL; glycosaminoglycan concentration was expressed as μ g/mg/creatinine; and chitotriosidase activity was expressed as nmol/h/mL.

Results

The current method had changes in reduction of the original reaction volume (substrate/reagents) and reduction of the DBS punch from 3mm to 1.5mm^{9,10}. This led to a cost reduction compared to the original method described by Nestor Chamoles⁹.

Sensitivity and specificity

Sensitivity, specificity, positive and negative predictive values for all enzymes are described in table 1.

Determination of normal & affected ranges

In order to define the normal range for each enzyme, DBS from 131 healthy coded newborns were analyzed and reference values are described in table 2. To establish potential disease cutoffs samples of known patients were analyzed (MPS I: 22, MPS VI: 24, Fabry: 12, Gaucher: 29, Pompe: 14) table 2.

Cutoff values

In this study, 834 DBS samples of newborns were analyzed. The distribution of the five enzymes is shown in figure 1. Initial cutoffs were set as values below the reference values established in healthy coded newborns [IDUA < 0.8 nmoL/20h/mL; ARSB < 3 nmoL/20h/mL; GLA < 4 nmoL/20h/mL; ABG < 12 nmoL/5h/mL and GAA < 2 nmoL/20h/mL] (Table 2). Using these reference values, the false positive rates were: 10.5% for IDUA (n=88), 0.8% for ARSB (n=3), 3.7% for GLA (n=31), 3% for ABG (n=25), and 18% for GAA (n=150).

In order to decrease the false positive rates, we decided to use the highest enzyme level of known patients (aiming to avoid any false negative once all of these were lower than the lowest value of the reference range for healthy newborns (table 2). Thus, false positive rates decreased to: 5.5% for IDUA (n=46), 0.8% for ARSB, 0% for GLA, 1.7% for ABG (n=14), and 3% for GAA (n=25).

For MPS I, MPS VI and Gaucher disease we have also used a secondary test- in order to further decrease the false positive rates. For MPS I and VI we have used urinary GAGs as a biomarker and for Gaucher disease chitotriosidase in DBS. For MPS I, the original false positive rates were 5.5% (n=46) using reference range and of these 76% (n=35) had urine samples for GAG measurement all within the normal levels (reference range up to 6 months: 133-460 µg/mg/creatinine). Thus, false positive rates decreased even more to 1.3%. For the 3 MPS VI with low ARSB levels, 2 had urine available for GAG measurement with normal GAG levels resulting in 0.1% false positives. For Gaucher disease, we have used measurement of chitotriosidase to reduce the false positive rates. Of the 1.7% (n=14), only one had elevated levels of chitotriosidase (62, reference range: 0-53 nmoL/h/mL) reducing the false positive rates to 0.1%.

All samples with abnormal enzyme levels will be further investigated by the measurement of enzyme activity in leukocytes as well as gene sequencing to exclude any abnormality.

Discussion

Newborn screening for lysosomal diseases has been performed regularly since 2006 for Krabbe disease, in the state of New York, USA¹¹ and is being included in the newborn screening panels by several US states^{12,13}, being already an official recommendation for MPS I and Pompe¹⁴. It is also a regular practice in Taiwan¹⁵ and in some regions of Italy¹⁶.

All the efforts to include LSDs to NBS are due to the lack of clinical signs at birth, the progressive characteristic of these disorder and availability of treatment that seems to be more effective if started early^{17,18}.

Newborn screening for lysosomal storage disorders can be done by fluorometry or tandem mass spectrometry (MS/MS). The superior analytical range of MS/MS compared to fluorimetric assays has already been described by several groups^{19–21}. However, digital microfluids has been used by several centers with optimized cutoffs to decrease false positive rates¹².

This study has several limitations such as the lack of newborn samples of known patients to determine and validate the cutoffs, the inability to multiplex the five substrates due to the same excitation/emission wavelength for all enzymes, and the fact that all the reagents were made “in-house”, without the manufacturing standardization of commercially available kits.

For MPS I, MPS VI and Gaucher disease we were able to reduce the false positive rates using a second-tier approach throughout biomarker measurement (glycosaminoglycans for MPS and chitotriosidase for Gaucher). Nonetheless, for Pompe disease we had false positives rates that were higher compared to the other disorders. This could have been caused by the fact that the acid alfa-glucosidase (GAA) substrate preparation requires a much higher temperature (50 to 60°C), which could potentially affect the enzyme reaction. Another technique has been described for detection of Pompe disease which produces lower false positive rates (communication from the Laboratory of Inborn Errors of Metabolism-HCPA). However more steps in the sample preparation are required, as well as higher amounts of sample, which could potentially make it unsuitable for mass screening.

Conclusion

We conclude that these optimized methods are efficient and feasible for detection of 5 LSDs in the NBS. These new methods allowed a reduction of 50 % of the original cost (from US\$ 60.00 to US\$ 30.00 per sample, for all the assays) which could potentially enable its implementation for the screening of LSDs in lower-income countries, or in centers which do not have access to tandem mass spectrometry.

Acknowledgements

We would like to thank all patients and families. This work was supported by INAGEMP and Casa Hunter.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

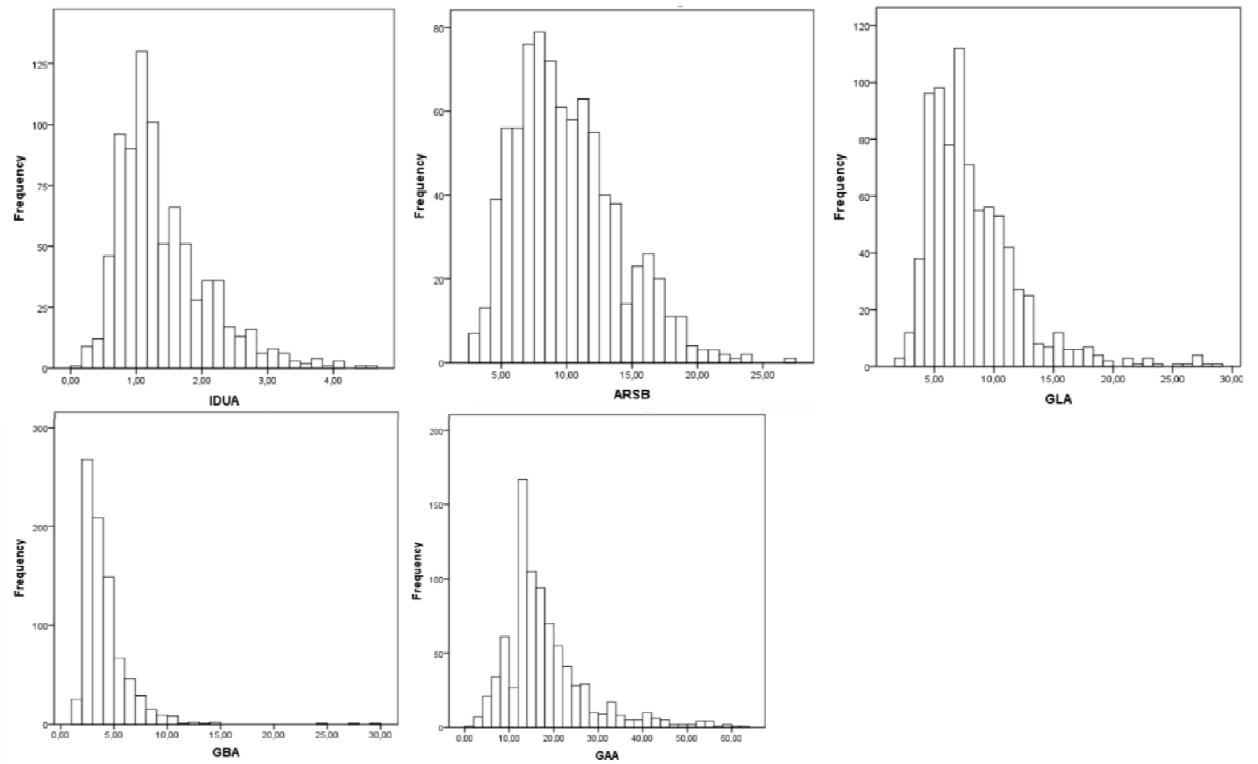
1. Tager, J. M. *et al.* Metabolic consequences of genetic defects in lysosomes. *Biochem. Soc. Trans.* **12**, 902–5 (1984).
2. Bellettato, C. M. & Scarpa, M. Pathophysiology of neuropathic lysosomal storage disorders. *J. Inherit. Metab. Dis.* **33**, 347–362 (2010).
3. Meikle, P. J., Hopwood, J. J., Clague, A. E. & Carey, W. F. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA* **281**, 249–54 (1999).
4. Giugliani, R., Federhen, A., Michelin-Tirelli, K., Riegel, M. & Burin, M. Relative frequency and estimated minimal frequency of Lysosomal Storage Diseases in Brazil: Report from a Reference Laboratory. *Genet. Mol. Biol.* **40**, 31–39 (2017).
5. Programa Nacional da Triagem Neonatal. Available at: <http://portalms.saude.gov.br/acoes-e-programas/programa-nacional-da-triagem-neonatal>. (Accessed: 2nd November 2018)
6. Camargo Neto, E. *et al.* Neonatal screening for four lysosomal storage diseases with a digital microfluidics platform: Initial results in Brazil. *Genet. Mol. Biol.* **41**, 414–416 (2018).
7. Costa-Motta, F. M. *et al.* Genetic studies in a cluster of Mucopolysaccharidosis Type VI patients in Northeast Brazil. *Mol. Genet.*

- Metab.* **104**, 603–607 (2011).
8. Bender, F. Triagem neonatal para mucopolissacaridose tipo VI (Síndrome de Maroteux-Lamy) em uma região com alta incidência da doença. (2011). Available at: xxxxx
 9. Chamoles, N. A., Blanco, M. B., Gaggioli, D. & Casentini, C. Hurler-like phenotype: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. *Clin. Chem.* **47**, 2098–102 (2001).
 10. Civallero, G. *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).
 11. Orsini, J. J. *et al.* Newborn screening for Krabbe disease in New York State: the first eight years' experience. *Genet. Med.* **18**, 239–48 (2016).
 12. Hopkins, P. V. *et al.* Lysosomal storage disorder screening implementation: findings from the first six months of full population pilot testing in Missouri. *J. Pediatr.* **166**, 172–7 (2015).
 13. Burton, B. K. *et al.* Newborn Screening for Lysosomal Storage Disorders in Illinois: The Initial 15-Month Experience. *J. Pediatr.* **190**, 130–135 (2017).
 14. Minter Baerg, M. M. *et al.* Precision newborn screening for lysosomal disorders. *Genet. Med.* **20**, 847–854 (2018).
 15. Chuang, C.-K. *et al.* Status of newborn screening and follow up investigations for Mucopolysaccharidoses I and II in Taiwan. *Orphanet J. Rare Dis.* **13**, 84 (2018).
 16. Burlina, A. B. *et al.* Newborn screening for lysosomal storage disorders by tandem mass spectrometry in North East Italy. *J. Inherit. Metab. Dis.* **41**, 209–219 (2018).
 17. Giugliani, R. *et al.* Mucopolysaccharidosis I, II, and VI: Brief review and guidelines for treatment. *Genet. Mol. Biol.* **33**, 589–604 (2010).
 18. McGill, J. J. *et al.* Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis VI from 8 weeks of age--a sibling control study. *Clin. Genet.* **77**, 492–8 (2010).
 19. Kumar, A. B. *et al.* Tandem Mass Spectrometry Has a Larger Analytical Range than Fluorescence Assays of Lysosomal Enzymes: Application to Newborn Screening and Diagnosis of Mucopolysaccharidoses Types II,

- IVA, and VI. *Clin. Chem.* **61**, 1363–71 (2015).
20. Gelb, M. H., Scott, C. R. & Turecek, F. Newborn Screening for Lysosomal Storage Diseases. *Clin. Chem.* **61**, 335–346 (2015).
21. Schielen, P. C. J. I., Kemper, E. A. & Gelb, M. H. Newborn Screening for Lysosomal Storage Diseases: A Concise Review of the Literature on Screening Methods, Therapeutic Possibilities and Regional Programs. *Int. J. neonatal Screen.* **3**, (2017).

Figure legends

Figure 1: Distribution of the five enzymes analyzed in this study by fluorimetry
IDUA: alfa-L-iduronidase; ARSB: arylsulfatase B; GLA: alfa-galactosidase A;
ABG: beta-glucocerebrosidase; GAA: acid alfa-glucosidase.



Tables

Table 1: Sensitivity, specificity, positive predictive values and negative predictive values for the 5 analyzed enzymes

Enzyme	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
<i>IDUA</i>	100%	94%	32%	100%
<i>ARSB</i>	100%	99.7%	89%	100%
<i>GLA</i>	100%	99.9%	93%	100%
<i>ABG</i>	100%	98%	67%	100%
<i>GAA</i>	100%	97%	36%	100%

IDUA: alfa-L-iduronidase; *ARSB*: arylsulfatase B; *GLA*: alfa-galactosidase A; *ABG*: beta-glucocerebrosidase; *GAA*: acid alfa-glucosidase; PPV: positive predictive values; NPV: negative predictive values

Table 2: Normal & affected ranges for each enzyme

Enzyme	Reference range for healthy newborns (n=131)	Range of affected patients
<i>IDUA</i>	0.8-4*	0-0.5*
<i>ARSB</i>	3-16*	0.9-2.4*
<i>GLA</i>	4-21*	0.4-1.1*
<i>ABG</i>	2-10**	0.1-1.6**
<i>GAA</i>	12-63*	0-5.5*
<i>Chitotriosidase</i>	0-53#	166-677#

IDUA: alfa-L-iduronidase; *ARSB*: arylsulfatase B; *GLA*: alfa-galactosidase A; *ABG*: beta-glucocerebrosidase; *GAA*: acid alfa-glucosidase; * nmoL/20h/mL; ** nmoL/5h/mL; # nmol/h/ml

CONSIDERAÇÕES FINAIS

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho mostrou que a utilização de amostras de SIPF para o diagnóstico bioquímico, utilizando os micrométodos fluorimétricos num programa de TN é viável e pode ser incorporado por laboratórios de referência, para identificar pacientes com doenças de Gaucher, Fabry, Pompe, MPS I, II, VI. A coleta de SIPF, além de evitar a coleta de sangue venoso, torna mais fácil o transporte das amostras a partir de outros locais mais distantes e de difícil acesso. A disponibilização de um teste de triagem neonatal vai permitir um diagnóstico mais precoce, que é muito importante uma vez que para essas doenças já há TRE disponível e que sua introdução em fase mais precoce parece acompanhar de melhores resultados clínicos.

O ensaio enzimático para MPS II em amostras de SIPF já é realizado em micrométodo na rotina de exames do LEIM. Usamos a mesma metodologia na análise das nossas amostras. Para essas amostras não realizamos análise estatística pois iniciamos recentemente as investigações para MPS II. Testamos até o momento 65 amostras de recém-nascidos, somente do sexo masculino e todos os resultados apresentaram-se dentro dos valores de referência.

A técnica de diagnóstico para doença de Mórquio (MPS IVA) em amostras de SIPF é um método mais demorado (tempo de incubação de 56 horas) e o substrato é bem mais oneroso em relação aos outros substratos. Por esse motivo não incluímos essa doença no presente estudo piloto.

As novas padronizações com as reduções de volume dos insumos e substratos diminuiu significativamente os custos. E a realização dos ensaios em microplacas também reduziu o tempo de leitura das amostras.

Com esses resultados podemos concluir que a metodologia desenvolvida para a triagem neonatal de DL é eficiente para a detecção precoce, assim como o início do tratamento, mudando assim, o curso da doença e uma melhor qualidade de vida aos pacientes.

PERSPECTIVAS FUTURAS

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

Esperamos nos casos alterados desse estudo, receber uma nova amostra de SIPF e uma coleta de sangue venoso. As análises bioquímicas serão repetidas nessa coleta para confirmar se realmente os casos alterados são falsos positivos ou não. Os casos que confirmarem atividade enzimática abaixo do valor de referência para cada enzima será encaminhada para confirmação genético-molecular a ser realizada em estudo paralelo.

Os exames de triagem neonatal podem gerar falsos positivos, por isso, os resultados alterados devem ser confirmados em amostras de sangue total, que é considerado o padrão ouro para os diagnósticos das doenças lisossômicas. Como benefício, os bebês com diagnóstico confirmado vão poder ter acesso às medidas de tratamento disponíveis, a critério do seu médico assistente. O prognóstico dos pacientes melhora quando o tratamento é iniciado de maneira mais precoce.

O HCPA tem interesse em validar esses testes para utilizar no diagnóstico das doenças lisossômicas no futuro, uma vez que tem menor custo e menor tempo de execução. Esses novos métodos poderão, potencialmente, vir a ser utilizados pelo Programa Nacional de Triagem Neonatal, no futuro.

CIP - Catalogação na Publicação

Bender, Fernanda
TRIAGEM NEONATAL PARA DOENÇAS LISOSSÔMICAS EM
AMOSTRAS DE SANGUE IMPREGNADO EM PAPEL FILTRO /
Fernanda Bender. -- 2018.
101 f.
Orientador: Roberto Giugliani.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2018.

1. Erros Inatos do Metabolismo. 2. Doenças
Lisossômicas. 3. Triagem Neonatal. 4. Ensaios
Bioquímicos. 5. Sangue Impregnado em Papel Filtro. I.
Giugliani, Roberto, orient. II. Título.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

CAAE: 58218816.8.0000.5327

Título do Projeto: Triagem Neonatal para Doenças Lisossômicas em Amostras de Sangue Impregnado em Papel Filtro

A pessoa (bebê) pela qual você é responsável está sendo convidada a participar de uma pesquisa cujo objetivo é analisar a atividade das enzimas lisossômicas para as Mucopolissacaridoses tipo I, II e VI, Doença de Fabry, Gaucher, Pompe e Niemann-Pick A/B (C? não), para o diagnóstico de doenças lisossômicas (DL) de interesse em um programa de triagem neonatal, utilizando a mesma amostra coletada para o “teste do pezinho”. As DLs são doenças genéticas raras que apresentam um acúmulo de substâncias nas células causando aumento de alguns órgãos como o baço e o fígado. Os dados com a sua doação são de importância científica relevante para o desenvolvimento de um método diagnóstico mais rápido e sensível, que beneficiará recém-nascidos portadores dessas doenças, além de possibilitar a identificação de casais de risco para aconselhamento genético. Esta pesquisa está sendo realizada no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), tendo como instituição coparticipante Hospital da PUC-Campinas/Hospital e Maternidade Celso Pierro de São Paulo.

Se você concordar com a participação do seu bebê na pesquisa, os procedimentos envolvidos são os seguintes: uma coleta de sangue e uma coleta de urina. Sua participação é voluntária. O tratamento será indicado do mesmo modo e seu filho terá direito ao mesmo. O aconselhamento genético também estará disponível para você, mesmo que não aceite participar da pesquisa. Se você não desejar participar da pesquisa, seus dados e os do seu filho não serão utilizados na mesma e isso não afetará o atendimento do seu bebê. Os resultados dos exames serão encaminhados ao seu médico assistente, ficando sob responsabilidade dele a informação do resultado.

Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação na pesquisa são os desconfortos causados pela coleta que são semelhantes aos envolvidos na coleta de sangue para exames laboratoriais de rotina o que pode, ocasionalmente, levar ao aparecimento de um hematoma (mancha roxa na pele). O material coletado será única e exclusivamente utilizado para fins do projeto de pesquisa.

Os possíveis benefícios decorrentes da participação na pesquisa são que, com o diagnóstico de MPS I, II, VI, Doença de Fabry, Gaucher, Pompe e Niemann-Pick A/B e Niemann-Pick C, o paciente poderá se beneficiar das medidas de manejo disponíveis para essas condições, bem como do aconselhamento genético, detecção de portadores e diagnóstico pré-natal.

A participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não autorizar a participação, ou ainda, retirar a autorização após a assinatura desse Termo, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que o participante da pesquisa recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação na pesquisa e não haverá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos, porém, poderá haver ressarcimento por despesas decorrentes da

participação, por exemplo, despesas de transporte e alimentação, cujos custos serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante da pesquisa, o participante receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, os nomes não aparecerão na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Dr. Roberto Giugliani, pelo telefone (51) 3359-8011, com a pesquisadora Fernanda Bender, pelo telefone (51) 3359-8011, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 3359-7640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e seu responsável e outra para os pesquisadores.

Nome do participante da pesquisa (bebê)

Assinatura (se aplicável)?

Nome do responsável do bebê

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

Local e Data: _____

População do estudo

Foram avaliadas amostras de urina e de sangue em papel filtro (SIPF) de recém-nascidos do Hospital da PUC-Campinas/Hospital e Maternidade Celso Pierro – Campinas – SP.

Esse projeto foi amplamente divulgado através de material informativo e foi realizado um treinamento com os técnicos que fazem a coleta das amostras para explicar as vantagens e limitações da triagem neonatal para as DL. A coleta das amostras será realizada perante a autorização dos pais ou responsáveis dos bebês após a assinatura de um termo de consentimento informado (Anexo I).

Todos os ensaios foram realizados em duplicata e os resultados alterados foram repetidos nessa mesma amostra. O resultado alterado confirmado, os pais ou responsáveis dos bebês foram comunicados e convidados a realizar uma nova coleta para repetição do(s) ensaio(s) alterado(s). Estes resultados foram comunicados aos responsáveis por uma equipe local previamente treinada e capacitada para prestar o aconselhamento genético pertinente e considerar a possibilidade de tratamento dos pacientes eventualmente detectados. Neste momento, os indivíduos foram convocados para confirmação do diagnóstico em novo material biológico (sangue em papel-filtro, sangue total e urina para os casos com suspeita de MPS).

Os participantes foram cadastrados em um arquivo com informação de identificação e de contato para o pesquisador responsável contatá-los para a informação dos resultados.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: TRIAGEM NEONATAL PARA DOENÇAS LISOSSÔMICAS EM AMOSTRAS DE SANGUE IMPREGNADO EM PAPEL FILTRO

Pesquisador: ROBERTO GIUGLIANI

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 58218816.8.0000.5327

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.824.531

Apresentação do Projeto:

As doenças lisossômicas (DLs) são um grupo de condições caracterizadas por um defeito genético que leva à deficiência de enzimas e proteínas lisossômicas. Mais de 50 DLs diferentes foram descritas sendo que 15 delas são responsáveis por 75% dos casos. Pacientes com DLs usualmente acumulam nos tecidos e órgãos os substratos (não degradados ou parcialmente degradados) de enzimas lisossômicas específicas, deficientes no interior das células. Este acúmulo causa um impacto anatômico e/ou funcional em uma ou mais áreas do organismo. Dependendo da doença, os pacientes podem manifestar alterações progressivas que podem iniciar desde o nascimento até a idade adulta e duram por toda a vida. Algumas delas podem ser tratadas por terapia de reposição enzimática, que consiste na aplicação periódica de uma enzima recombinante, parecida com aquela que o paciente não produz de forma adequada, por terapia de redução de substrato ou por outras estratégias. Há várias evidências que sugerem que o tratamento precoce tem vantagens. Com a triagem neonatal (tornou-se possível o diagnóstico precoce de diversas doenças e a prevenção de sequelas graves com a introdução de um tratamento adequado ainda numa etapa pré-sintomática, alterando a história natural das doenças detectadas. Os métodos presentemente propostos para triagem neonatal se baseiam principalmente no uso de espectrometria de massas in tandem, o que exige um equipamento de alto custo de aquisição e de manutenção, disponível em poucos centros. O presente projeto tem o objetivo de avaliar uma metodologia de triagem baseada em ensaios enzimáticos fluorométricos, utilizando o mesmo sangue impregnado em

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229

Bairro: Santa Cecília

CEP: 90.035-903

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3359-7640

Fax: (51)3359-7640

E-mail: cep@hcpa.edu.br

Continuação do Parecer: 2.824.531

papel filtro coletado para o "teste do pezinho". As DLs selecionadas são as mucopolissacaridoses (MPS) tipos I, II e VI, a doença de Fabry, a doença de Gaucher, a doença de Pompe e a doença de Niemann-Pick tipo C. Serão avaliadas amostras de sangue em papel filtro de recém-nascidos submetidos à triagem neonatal convencional. Esse projeto será amplamente divulgado de através de material informativo, e será feito um treinamento dos técnicos que fazem a coleta das amostras para explicar as vantagens e limitações da triagem neonatal para as DLs. No momento que o profissional for fazer a coleta do teste do pezinho será perguntado para o responsável da criança se está sabendo desse projeto. Se não estiver sabendo, o profissional conversará e explicará sobre o projeto. A mãe ou responsável que não concordar em participar desse projeto assinará o Termo de Dissentimento para indicar que esta ciente. No caso de um resultado alterado será solicitada a coleta de nova amostra, a qual será feita após a assinatura de um termo de consentimento informado. Estes resultados serão comunicados por uma equipe local previamente treinada e capacitada para prestar o aconselhamento genético pertinente e considerar a possibilidade de tratamento dos pacientes eventualmente detectados. Neste momento os indivíduos serão convocados para confirmação do diagnóstico em novo material biológico (sangue em papel-filtro e sangue total). Esta sistemática é similar ao do Projeto de Triagem Neonatal para Mucopolissacaridose VI que foi aprovado pelo CEP do HCPA (GPPG 10-0282), e continua em andamento no município de Monte Santo. Os participantes serão cadastrados em um arquivo com informação de identificação e de contato para o pesquisador responsável contactá-los informação dos resultados.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar se a metodologia de análise de enzimas lisossômicas selecionadas pelo micrométodo fluorimétrico em microplacas tem desempenho que a habilite a ser adicionada ao programa de triagem neonatal convencional (disponibilidade de amostra, estabilidade da amostra, tempo de execução, custo de execução, índice de falso-positivos, índice de falso-negativos).

Objetivo Secundário:

Avaliar se a metodologia de análise de enzimas lisossômicas selecionadas pelo micrométodo fluorimétrico em microplacas produz resultados comparáveis aos obtidos com outras metodologias que já estejam validadas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores, os riscos e desconfortos causados pela coleta são semelhantes aos envolvidos na coleta de sangue para exames laboratoriais de rotina o que pode, ocasionalmente,

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

Continuação do Parecer: 2.824.531

levar ao aparecimento de um hematoma (mancha roxa na pele).

O potencial benefícios é o diagnóstico de MPS I, II, VI, Doença de Fabry, Gaucher, Pompe e Niemann-Pick A/B e Niemann-Pick C, o paciente poderá se beneficiar das medidas de manejo disponíveis para essas condições, bem como do aconselhamento genético, detecção de portadores e diagnóstico pré-natal.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto de padronização de técnica de análise de doenças lisossomais em teste de triagem neonatal. Serão analisadas amostras de sangue impregnadas em papel filtro para seis DLs (Doença de Gaucher, Fabry, Pompe e MPS tipos I, II e VI), mais a dosagem de quitotriosidase (elevada em diversas DLs, incluindo Gaucher, Niemann-Pick A/B e Niemann-Pick C).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta TCLE: TCLE_nova_versao3.docx que deverá incluir a alteração descrita no campo Recomendações deste parecer.

Recomendações:

No TCLE aprovado TCLE_nova_versao3.docx substituir o trecho:

"Se você não desejar participar da pesquisa, seus dados e os do seu filho (bebê) não serão utilizados na mesma e isso não afetará no atendimento dele. Os resultados dos exames serão encaminhados ao seu médico assistente, ficando sob a responsabilidade dele a informação do resultado."

Pelo seguinte trecho:

"Se você não desejar participar da pesquisa, os dados do seu filho (bebê) não serão utilizados e isso não afetará o atendimento dele. Os resultados dos exames serão encaminhados ao médico assistente, ficando sob a responsabilidade dele a informação do resultado."

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências emitidas para o projeto no parecer 2.775.890 foram adequadamente respondidas pelos pesquisadores, conforme carta de respostas adicionada em 31/07/2018. Não apresenta novas pendências. Ver Recomendações.

Considerações Finais a critério do CEP:

Lembramos que a presente aprovação (Projeto versão de 31/07/2018, TCLE versão de 31/07/2018, incluindo as Recomendações deste parecer, e demais documentos que atendem às solicitações do CEP) refere-se apenas aos aspectos éticos e metodológicos do projeto.

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229

Bairro: Santa Cecília

CEP: 90.035-903

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3359-7640

Fax: (51)3359-7640

E-mail: cep@hcpa.edu.br

Continuação do Parecer: 2.824.531

Os pesquisadores devem atentar ao cumprimento dos seguintes itens:

- a) Este projeto está aprovado para inclusão de 1000 amostras de participantes recrutados no Centro Coparticipante e analisadas no centro HCPA, de acordo com as informações do projeto apresentado. Qualquer alteração deste número deverá ser comunicada ao CEP e ao Serviço de Gestão em Pesquisa para autorizações e atualizações cabíveis.
- b) O projeto deverá ser cadastrado no sistema AGHUse Pesquisa para fins de avaliação logística e financeira e somente poderá ser iniciado após aprovação final do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação.
- c) Qualquer alteração nestes documentos deverá ser encaminhada para avaliação do CEP. Informamos que obrigatoriamente a versão do TCLE a ser utilizada deverá corresponder na íntegra à versão vigente aprovada.
- d) Deverão ser encaminhados ao CEP relatórios semestrais e um relatório final do projeto.
- e) A comunicação de eventos adversos classificados como sérios e inesperados, ocorridos com pacientes incluídos no centro HCPA, assim como os desvios de protocolo quando envolver diretamente estes pacientes, deverá ser realizada através do Sistema GEO (Gestão Estratégica Operacional) disponível na intranet do HCPA.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_740270.pdf	31/07/2018 17:24:21		Aceito
Outros	carta_resposta3_cep_jul_2018_31_verso_3_word.doc	31/07/2018 17:23:48	Fernanda Bender	Aceito
Outros	carta_resposta_cep_3.pdf	31/07/2018 17:22:01	Fernanda Bender	Aceito
Outros	TCLE_nova_versao3.docx	31/07/2018 17:20:52	Fernanda Bender	Aceito
Outros	projeto_detalhado_alteracoes_marcadas.doc	11/07/2018 22:52:41	Fernanda Bender	Aceito
Outros	carta_resposta_cep_jul_2018.doc	11/07/2018 22:51:35	Fernanda Bender	Aceito
Outros	carta_resposta_cep.pdf	11/07/2018 22:50:49	Fernanda Bender	Aceito
Outros	inclusao_membro_colaborador.pdf	11/07/2018 22:49:42	Fernanda Bender	Aceito
Outros	carta_resposta_modelo_word.doc	20/10/2017	Fernanda Bender	Aceito

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL



Continuação do Parecer: 2.824.531

Outros	carta_resposta_modelo_word.doc	11:55:05	Fernanda Bender	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_nova_versao.doc	18/09/2017 14:22:04	Fernanda Bender	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_detalhado_nova_versao.doc	18/09/2017 14:20:02	Fernanda Bender	Aceito
Outros	Carta_Mat_Puc_Campinas.pdf	18/09/2017 14:18:57	Fernanda Bender	Aceito
Outros	carta_resposta.pdf	18/09/2017 14:17:31	Fernanda Bender	Aceito
Outros	pedido_de_prorrogacao.pdf	09/11/2016 07:31:09	Fernanda Bender	Aceito
Outros	carta_pedido_prorrogacao_pendencias.pdf	26/09/2016 16:02:15	Fernanda Bender	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_detalhado.doc	29/07/2016 12:39:42	Fernanda Bender	Aceito
Outros	delegacao.pdf	27/07/2016 14:41:05	Fernanda	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	25/07/2016 07:58:19	Fernanda	Aceito
Outros	formulario_delegacoes.pdf	25/07/2016 07:53:51	Fernanda	Aceito
Orçamento	orcamento_projeto.xls	25/07/2016 07:49:50	Fernanda	Aceito
Cronograma	cronograma.docx	22/07/2016 10:24:24	Fernanda	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termo_dissentimento.docx	22/07/2016 10:22:56	Fernanda	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termo_consentimento_livre_esclarecido.docx	22/07/2016 10:22:39	Fernanda	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL



Continuação do Parecer: 2.824.531

PORTO ALEGRE, 16 de Agosto de 2018

Assinado por:
José Roberto Goldim
(Coordenador)

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

 Genetics and Molecular Biology

 Home

 Author

 Review

Submission Confirmation

 Print

Thank you for your submission

Submitted to

Genetics and Molecular Biology

Manuscript ID

GMB-2018-0334

Title

Newborn screening for lysosomal disorders in Brazil: a pilot study using a customized fluorimetric assays

Authors

Bender, Fernanda
Burin, Maira
Tirelli, Kristiane
Medeiros, Fernanda
Bitencourt, Fernanda
Civallero, Gabriel
Kubaski, Francyne
Bravo, Heydy
Daher, Antoine
Carnier, Vanessa
Franco, Jose
Giugliani, Roberto

Date Submitted

13-Nov-2018

Author Dashboard

© Clarivate Analytics | © ScholarOne, Inc., 2018. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.
ScholarOne Manuscripts Patents #7,257,767 and #7,263,655.

[@ScholarOneNews](#) | [System Requirements](#) | [Privacy Statement](#) | [Terms of Use](#)

Checklist do Projeto da Tese de Doutorado de Fernanda Bender
STARD checklist for reporting of studies of diagnostic accuracy

Section and Topic	Item		On page
TITLE/ABSTRACT/ KEYWORDS	1	Identify the article as a study of diagnostic accuracy (recommend MeSH heading 'sensitivity and specificity').	1- 13
INTRODUCTION	2	State the research questions or study aims, such as estimating diagnostic accuracy or comparing accuracy between tests or across participant groups.	14-44
METHODS			
<i>Participants</i>	3	The study population: The inclusion and exclusion criteria, setting and locations where data were collected.	64-79
	4	Participant recruitment: Was recruitment based on presenting symptoms, results from previous tests, or the fact that the participants had received the index tests or the reference standard?	64-79
	5	Participant sampling: Was the study population a consecutive series of participants defined by the selection criteria in item 3 and 4? If not, specify how participants were further selected.	64-79
	6	Data collection: Was data collection planned before the index test and reference standard were performed (prospective study) or after (retrospective study)?	64-79
<i>Test methods</i>	7	The reference standard and its rationale.	69-72
	8	Technical specifications of material and methods involved including how and when measurements were taken, and/or cite references for index tests and reference standard.	69-79
	9	Definition of and rationale for the units, cut-offs and/or categories of the results of the index tests and the reference standard.	69-79
	10	The number, training and expertise of the persons executing and reading the index tests and the reference standard.	64-79
	11	Whether or not the readers of the index tests and reference standard were blind (masked) to the results of the other test and describe any other clinical information available to the readers.	75-79
<i>Statistical methods</i>	12	Methods for calculating or comparing measures of diagnostic accuracy, and the statistical methods used to quantify uncertainty (e.g. 95% confidence intervals).	69-72
	13	Methods for calculating test reproducibility, if done.	69 -79
RESULTS			
<i>Participants</i>	14	When study was performed, including beginning and end dates of recruitment.	69
	15	Clinical and demographic characteristics of the study population (at least information on age, gender, spectrum of presenting symptoms).	69
	16	The number of participants satisfying the criteria for inclusion who did or did not undergo the index tests and/or the reference standard; describe why participants failed to undergo either test (a flow diagram is strongly recommended).	51,52,69
<i>Test results</i>	17	Time-interval between the index tests and the reference standard, and any treatment administered in between.	75-77
	18	Distribution of severity of disease (define criteria) in those with the target condition; other diagnoses in participants without the target condition.	68
	19	A cross tabulation of the results of the index tests (including indeterminate and missing results) by the results of the reference standard; for continuous results, the distribution of the test results by the results of the reference standard.	72-79
	20	Any adverse events from performing the index tests or the reference standard.	
<i>Estimates</i>	21	Estimates of diagnostic accuracy and measures of statistical uncertainty (e.g. 95% confidence intervals).	72-79
	22	How indeterminate results, missing data and outliers of the index tests were handled.	72-75
	23	Estimates of variability of diagnostic accuracy between subgroups of participants, readers or centers, if done.	64-79
	24	Estimates of test reproducibility, if done.	80-81
DISCUSSION	25	Discuss the clinical applicability of the study findings.	74-75