

Implantação de um protocolo laboratorial para o diagnóstico de Mucopolissacaridoses VI e VII*

Evaluation of a laboratorial protocol for Mucopolysaccharidosis VI and VII

Gustavo Monteiro VIANA¹; Camila de Britto Pontes Rodrigues PARÁ¹; Clebson Pantoja PIMENTEL¹; Isabel Cristina Neves de SOUZA²; Luiz Carlos SANTANA-DA-SILVA³

RESUMO - As Mucopolissacaridoses (MPS) correspondem a um grupo de doenças genéticas raras caracterizadas pela deficiência/ausência de enzimas lisossomais responsáveis pela degradação de glicosaminoglicanos (GAG). Uma vez não degradados, os GAG se acumulam em diversos tecidos do organismo, causando uma série de complicações patológicas, que iniciam desde o período fetal até a fase infantil. Foi realizada a implantação de um protocolo laboratorial para o diagnóstico de pacientes com MPS, através da mensuração da atividade de duas enzimas lisossomais: beta-glicuronidase e arilsulfatase B, deficientes nas MPS VII e VI, respectivamente. Os valores encontrados em indivíduos normais corresponderam aos valores de referência descritos para a doença. Um paciente com suspeita clínica de MPS demonstrou níveis normais de ambas as enzimas, o que exclui a possibilidade do mesmo possuir MPS VI ou VII. A implantação de protocolos laboratoriais de mensuração enzimática na investigação de MPS permite a realização de diagnósticos mais rápidos e, dessa forma, pode contribuir para as condutas clínicas mais apropriadas.

PALAVRAS-CHAVE - Mucopolissacaridoses, Beta-glicuronidase, Arilsulfatase B, Diagnóstico enzimático.

SUMMARY - Mucopolysaccharidosis (MPS) are a group of genetic diseases caused by a deficiency of some specific lysosomal hydrolases, which promote the glycosaminoglycans (GAG) degradation. Since they were not degraded, it leads to a cellular/organic complication due to the storage of these molecules which are responsible for the majority of pathologic alterations from birth to young age. The aim of this study was to establish two enzymatic activity measurement protocols [arylsulfatase B (ARSB) and beta-glucuronidase (GUSB)] to the diagnosis of Mucopolysaccharidosis VI and VII, respectively. The GUSB activity was determined on plasma and leukocytes by the synthetic 4-methylumbeliferil- β -D-glucuronide substrate assay and the ARSB leukocyte activity by 4-nitrocathecol photocolometric assay. The leukocyte enzyme values encountered in healthy controls were according to the normal range (GUSB: 23 to 151 nmoles/h/mg prot; ARSB: 72 to 176 nmoles/h/mg prot). Plasma values are also in the normal range (GUSB: 30 to 300 nmoles/h/mg prot). One patient with suspect of MPS has shown normal values of both enzymes. The evaluation of laboratorial protocols of lysosomal enzymes measurements allows faster and costless diagnostics and, consequently, appropriated clinical procedures.

KEYWORDS - Mucopolysaccharidosis; Arylsulphatase B; Beta-glucuronidase; Enzymatic diagnosis.

INTRODUÇÃO

As Mucopolissacaridoses (MPS) constituem um grupo de doenças lisossômicas de depósito (DLD), causadas pela deficiência de enzimas lisossomais essenciais para o metabolismo de componentes da matriz extracelular como os glicosaminoglicanos (GAG). Uma vez não degradados, os GAG são estocados nos compartimentos lisossômicos das células, promovendo uma série de complicações patológicas que iniciam desde o período fetal, até a intensa progressão dos sintomas na fase infantil (Scriver *et al.*, 2001). Apesar de apresentarem, em comum, características crônicas e progressivas, os sintomas apresentados por pacientes de MPS variam de acordo com o tipo. Dentre os sintomas descritos estão organomegalia, disostose múltipla, hepatoesplenomegalia, mão em garra e facies grosseiras. A audição, visão, respiração, funções cardiovasculares e a mobilidade podem, também, estar eventualmente comprometidas. A deficiência mental profunda é característica de pacientes com MPS IH (Síndrome de Hurler), com a forma grave da MPS II (Síndrome de Hunter) e de todos os tipos de MPS III (Síndrome de Sanfilippo). Já as MPS VI (Síndrome de Maroteaux-Lamy) e MPS II (forma moderada) não possuem, geralmente, comprometimento mental. Problemas ósseos são mais comumente descritos na MPS IV ou Síndrome de Mórquio (Neufeld & Muenzer, 2001). As MPS possuem uma incidência estimada em 1:10000 e 1:25000 recém-nascidos. As MPS I e II são consideradas as mais frequentes, enquanto a MPS III parece ser o tipo mais raro. Todas as MPS, com exceção da MPS II são herdadas

de forma autossômica recessiva. A MPS II possui herança ligada ao X (Solion, 1996; Nelson, 1997; Meikle *et al.*, 1999). Em função da escassez de centros de referência para a investigação de doenças genéticas raras e à falta de informação dos médicos, as MPS ainda são pouco diagnosticadas. Entretanto, a partir de 1990, com a implantação de novos centros de referência, esse retrospecto vem mudando gradativamente. Schwartz *et al.* (2002) verificaram, no Brasil, uma variação na frequência dos tipos de MPS de acordo com a região do país, com casos de MPS I aparentemente mais frequentes e casos de MPS VII mais raros. O diagnóstico laboratorial das MPS é realizado, inicialmente, através de testes de triagem, como o brometo de cetil trimetil-amônio (BCTMA) e o teste do Azul de Toluidina, os quais permitem avaliar, qualitativamente, uma possível excreção de GAG na urina. Caso seja observada positividade nestes testes, protocolos mais específicos, como a cromatografia e a dosagem de GAG, são realizados para identificação dos grupos de GAG excretados e, assim, verificar qual a MPS possivelmente relacionada. O diagnóstico laboratorial definitivo é fornecido através da mensuração da atividade de enzimas lisossomais a partir de leucócitos e/ou fibroblastos do paciente (Wajner *et al.*, 2001). O presente estudo teve como objetivo implantar, no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo da Universidade Federal do Pará (LEIM/UFPa), um protocolo laboratorial para o diagnóstico das MPS VI e VII, através da mensuração da atividade das enzimas arilsulfatase B (ARSB; E.C.: 3.1.6.12) e beta-glicuronidase (GUSB; E.C. 3.2.1.31), respectivamente.

Recebido em 09/10/2008

Aprovado em 05/10/2010

*Trabalho realizado no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará (LEIM/ICB/UFPa)

¹Biomédicos, Mestrandos do PPG em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará; ²Médica Pediatra do Hospital Universitário Bettina de Ferro Souza da Universidade Federal do Pará (HUBFS/UFPa); ³Biomédico, chefe do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo, Instituto de Ciências Biológicas,

Universidade Federal do Pará (LEIM/ICB/UFPa)

Fontes financiadoras: PROEX/UFPa, SEDECT/FAPESPA e GENZYME DO BRASIL

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras estudadas

Para a padronização dos ensaios enzimáticos, foram utilizadas amostras de sangue periférico de 30 indivíduos sadios voluntários, homens e mulheres, com faixa etária de 18 a 50 anos e de um paciente com suspeita clínica de MPS.

Coleta do sangue periférico

Foram coletados 10 mL de sangue periférico de cada indivíduo voluntário através de punção venosa. Após a coleta, o sangue foi homogeneizado com anticoagulante heparina e armazenado a 4° C.

Separação do plasma (GUSB)

Do volume total de sangue coletado (10 mL), foram retirados 3 mL para separação do plasma através de centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos. Após esse tempo, o plasma foi retirado e armazenado a -20°C para posterior análise.

Separação de leucócitos (GUSB e ARSB)

A separação de leucócitos foi realizada segundo a metodologia descrita por Skoog *et al.* (1956).

Determinação da concentração de proteínas

A dosagem de proteína foi realizada segundo a metodologia descrita por Lowry *et al.* (1951).

Determinação das atividades enzimáticas (GUSB e ARSB)

As atividades enzimáticas das enzimas GUSB e ARSB foram avaliadas através dos métodos fluorimétrico (Beudet *et al.*, 1975) e fotolorimétrico (Kresse *et al.*, 1982), respectivamente.

Análise Estatística

Para verificar possíveis diferenças significativas entre os níveis das enzimas GUSB e ARSB em cada amostra, foi utilizada como ferramenta estatística o teste "t" de Student através do programa BioStat 4.0. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

RESULTADOS

As figuras 1 e 2 mostram, respectivamente, as variações dos níveis plasmáticos e leucocitários da GUSB. Em relação aos níveis plasmáticos, os valores de atividade enzimática variaram entre 16,6 a 147,14 nmoles/h/mL, com uma média de $43 \pm 23,8$ nmoles/h/mL. A atividade enzimática leucocitária da GUSB variou entre 23 a 113 nmoles/h/mg prot., com um valor médio de $51,8 \pm 21,2$ nmoles/h/mg prot. Em relação a ARSB, os níveis enzimáticos leucocitários variaram entre 32,3 a 258,79 nmoles/h/mg de proteína, (média: $104,12 \pm 66,8$), como demonstrado na figura 03.

A variação dos níveis de atividade enzimática entre os indivíduos pertencentes aos grupos controles das enzimas GUSB e ARSB não foi significativa, correspondendo aos valores de referências previamente obtidos por outros centros de diagnóstico ($p > 0,05$).

Os valores de atividade enzimática da GUSB e da ARSB encontrados na amostra do paciente com suspeita clínica de MPS foram considerados dentro dos valores de referência (GUSB: 181,23 nmoles/h/mg prot; ARSB: 178,91 nmoles/h/mg prot), não havendo, portanto, diferença significativa entre estes valores e os encontrados no grupo controle de ambas as enzimas (quadro 1).

DISCUSSÃO

O diagnóstico de MPS é caracterizado através da avaliação clínica, baseada na investigação de possíveis comprometimentos orgânicos e da avaliação laboratorial. A avaliação laboratorial consiste em uma seqüência de protocolos de investigação bioquímica, os quais compreendem desde teste de triagem (BCTMA, Teste do Azul de Toluidina, cromatografia de GAG em camada delgada e dosagem de GAG urinários) até testes mais específicos como dosagens enzimáticas. Mais especificamente, para o diagnóstico de MPS VI e VII, são utilizados protocolos de dosagem das enzimas ARSB e GUSB, respectivamente, em diversos tecidos e fluidos biológicos.

Os valores de atividade enzimática encontrados no plasma e em leucócitos dos indivíduos controle corresponderam aos valores de referência descritos pela literatura (Beudet *et al.*, 1975; Kresse *et al.*, 1982). Apesar de algumas discrepâncias entre os valores, a média geral permaneceu dentro do intervalo de referência. Tais diferenças podem estar relacionadas a muitas variáveis, uma vez que ensaios enzimáticos apresentam muitas variações, por fatores ambientais, sensibilidade da técnica, calibração dos aparelhos utilizados entre outros (Scriver *et al.*, 2001).

Em função da reduzida quantidade de amostra coletada do paciente com suspeita de MPS, só foi possível realizar a mensuração da atividade leucocitária das enzimas GUSB e ARSB.

Através do protocolo de dosagem enzimática, foi possível descartar a hipótese de MPS VI e MPS VII para o paciente com suspeita de MPS, uma vez que as enzimas responsáveis por essas duas doenças (ARSB e GUSB, respectivamente) foram encontradas com níveis de atividade dentro dos valores de referência. Entretanto, o mesmo paciente demonstrou um alta taxa de excreção de GAG na urina (25,64 µg/mmol de creatinina; dados não publicados), além de resultados positivos nos testes de BCTMA e azul de toluidina, o que não exclui a possibilidade da presença de um outro tipo de MPS. Além disso, a discreta elevação da atividade enzimática da ARSB encontrada em leucócitos do paciente com suspeita de MPS parece ser um padrão celular típico em pacientes com MPS, pois apesar dos mecanismos pelos quais essa "compensação enzimática" ainda não serem totalmente esclarecidos, estudos indicam que o aumento de tamanho dos lisossomos ou a estabilização de enzimas em função do acúmulo de substâncias intralisossomais podem refletir numa descompensação da atividade de outras hidrolases lisossomais (Clarke *et al.*, 2008).

Novos protocolos de mensuração enzimática que utilizam menores quantidades de reagentes e de amostras estão sendo desenvolvidos pelos principais centros de referência para o diagnóstico de DLD. Técnicas como a mensuração da atividade enzimática em papel filtro, descrita por Civallero *et al.* (2006) surgem como novas perspectivas para a triagem de diversas patologias, através de métodos simples, rápidos e de baixo custo.

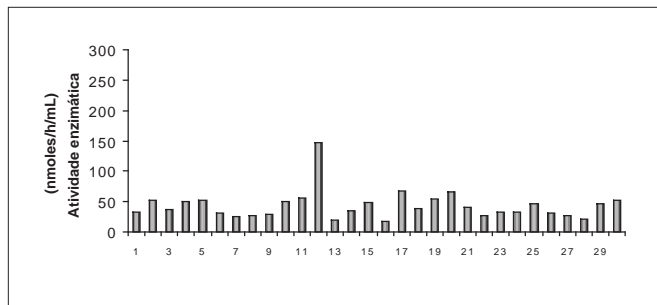


Figura 1: Atividade enzimática da GUSB plasmática em indivíduos do grupo controle (n=30). Valores encontrados: 16 – 147 nmoles / h / mL.

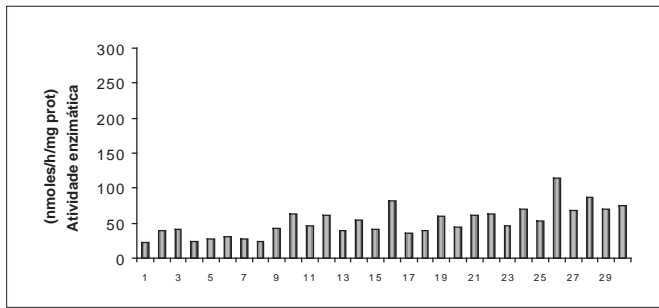


Figura 2: Atividade da enzima GUSB leucocitária de indivíduos do grupo controle (n=30). Valores encontrados: 23 – 113 nmoles / h / mg prot.

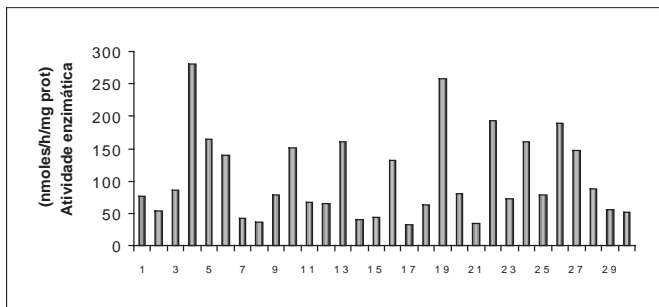


Figura 3: Atividade da enzima ARSB leucocitária em indivíduos do grupo controle (n=30). Valores encontrados: 32 – 280 nmoles / h / mg prot.

enzimas	Atividade plasmática (nmoles/h/ml) (média±DP)		Atividade leucocitária (nmoles/h/mg prot) (média±DP)	
	Controle (n=30)	MPS não determinada (n=1)	Controle (n=30)	MPS não determinada (n=1)
GUSB	43±23,8	-	51±21,2	181,23
ARSB	-	-	104±66,8	178,91

Valores de referência: GUSB (plasma): 30 – 300 nmoles / h / mL; GUSB (leucócitos): 23 – 151 nmoles / h / mg prot; ARSB (leucócitos): 72 – 176 nmoles / h / mg prot. *p < 0,05.

QUADRO 1: Atividade enzimática de GUSB e ARSB em indivíduos do grupo controle e em um paciente com suspeita clínica de MPS.

CONCLUSÕES

O diagnóstico enzimático para MPS, além de ser definitivo, é capaz de diferenciar qual subtipo da doença o paciente manifesta e, assim, fornecer uma orientação na elaboração de protocolos terapêuticos adequados.

A implantação de um protocolo enzimático para investigação de MPS no LEIM/ICB/UFPA tornou-se fundamental haja vista a necessidade da realização de um diagnóstico laboratorial definitivo para pacientes com essa doença na região Norte do país.

Em função disso, o LEIM/ICB/UFPA consolida-se como um centro de referência regional no diagnóstico para MPS, aumentando a rede nacional de apoio na identificação e tratamento de doenças metabólicas hereditárias, juntamente com outros centros de referência do país.

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer a todos os participantes do estudo e aos órgãos financiadores (PROEX/UFPA, SEDECT/FAPESPA e GENZYME DO BRASIL) por permitirem a realização do presente estudo.

REFERÊNCIAS

BEAUDET, A.L.; DIFERRANTE, N.M.; FERRY, G.D.; NICHOLS, B.L. & MULLINS,

C.E. Variations in the phenotypic expression of beta-glucuronidase deficiency. *Journal of Pediatrics*, 86:388, 1975.

BOND, C.S.; CLEMENTS, P.R.; ASHBY, S.J.; COLLYER, C.A.; HARROP, S.J.; HOPWOOD, J.J.; GUSS, J.M. Structure of a human lysosomal sulfatase. *Structure*. 5:277-289, 1997.

CIVALLERO, G.; MICHELIN, K.; DE MARI, J.; VIAPIANA, M.; BURIN, M.; COELHO, J.C.; 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*. 372:98-102, 2006.

GIBSON, G.J.; SACCONI, G.T.P.; BROOKS, D.A.; CLEMENTS, P.R.; HOPWOOD, J.J. Human N-acetylgalactosamine-4-sulphate sulphatase. *Biochemical Journal* 248:755-764, 1987.

CLARKE, L.A. The mucopolysaccharidosis: a success of molecular medicine. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 10(1), 2008.

HAMARTZ, P.; WHITLEY, C.B.; WABER, L.; PAIS, R.; STEINER, R.; PLECKO, B.; KAPLAN, P.; SIMON, J.; BUTENSKY, E.; HOPWOOD, J. Enzyme replacement therapy in Mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome). *The Journal of Pediatrics*. 144(5):574-580, 2004.

KRESSE H.; VON FIGURA, K.; KLEIN, U.; GLOSSI, J.; PASCHKE, E.; POHLMANN, R.; Enzymic diagnosis of the genetic mucopolysaccharide storage disorders. *Methods of Enzymology*; 83:559, 1982.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193(1):265-75, 1951.

LOWRY, R.B. & RENWICK D.H.G. Relative frequency of the Hurler and Hunter syndromes. *The New England Journal of Medicine*, 284: 221-222. 1971

LOWRY, R.B.; APPELGARTH, D.A., TOONE, J.R., MACDONALD, E. & THUNEM, N.T. An update on the frequency of mucopolysaccharide syndromes in British Columbia. *Human Genetics*, 85: 389-390.1990

MEIKLE, P.J.; HOPWOOD, J.J.; CLAGUE, A.E.; et al. Prevalence of lysosomal storage diseases. *JAMA*, 28:249-254, 1999.

MICHELIN, K. Estudos bioquímicos com a glicosidase de indivíduos com Doença de Gaucher: Comparação com a enzima de indivíduos normais. *Dissertação (Mestrado em Biologia Celular)*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2001. p123.

NELSON, J. Incidence of the mucopolysaccharidoses in Northern Ireland. *Human Genetics*, 101:355-358, 1997.

NEUFELD, E.F. & MUENZER J. In: *Metabolic and Molecular bases of inherited disease*. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al, eds. New York: McGraw Hill; 2001.

SCRIVER C.R.; BEAUDET A.L.; SLY, W.S. & VALLE, D. *The metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, 8th ed. New York: McGraw-Hill, Inc; 2001.

SCHWARTZ, I.V.D.; MATTE, U.S.; ARTIGALAS, O.; BROILLO, F.; BURIN, G.M.; GIUGLIANI, R. MPS no Brasil: Estudos clínicos e Dados Epidemiológicos [online]. Disponível em http://www.hcpa.ufrgs.br/genetica_genetica@hcpa.ufrgs.br, 2002.

SKOOG, W.A. & BECK W.S. Studies on the fibrinogen, dextran and phytohemagglutinin methods of isolating leukocytes. *Blood*, 11(5):436-54, 1956.

SOLYON, E. Incidence data for Mucopolysaccharidoses in Hungary. In: 4th International Symposium on Mucopolysaccharide and related diseases program. Wollongong (Austrália), p.75, 1996.

SIDDHARTH, L.; SHARMA, A.; SHRIVASTAVA, G.P.; JAIN, S.K. Maroteaux-Lamy Syndrome. *Indian Journal of Pediatrics*. 71:933-936, 2004.

WAJNER, M.; VARGAS, R.C.; BURN, G.M.; GIUGLIANI, R. & COELHO, J.C. Investigações de Erros Inatos do Metabolismo. *Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre* 21 (3): 343-360, 2001.

WEISSMANN, G.; ZURIER, R.B.; HOFFSTEIN, S. Leukocytic proteases and the immunologic release of lysosomal enzymes. *American Journal of Pathology*. 68:539-566. 1972.

WELLER, P.F. & AUSTEN, K.F. Human eosinophil arylsulfatase B. Structure and activity of the purified tetrameric lysosomal hydrolase. *The Journal of Clinical Investigation*. 71(1):114-23, 1983.

WENGER, D.A.; COPPOLA, S.; LIU, S. Insights into the diagnosis and treatment of lysosomal storage diseases. *Archives of Neurology*, 60:322-328. 2007.

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

WILKINSON, J.H. Clinical significance of enzyme activity measurements. *Clinical Biochemistry*, 16: 882-890. 1970.

WRAITH, J.E. Lysosomal disorders. *Semin. Neonatol*. 7:75-83. 2002.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Dr. Gustavo Monteiro Viana
ICB - UFPA
Rua Augusto Corrêa 1
CEP. 66075-970 Belém - PA