



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
FACULDADE DE BIOMEDICINA

NATHALIA OLIVEIRA DE LIMA

MONITORAMENTO DA EXCREÇÃO DE GLICOSAMINOGLICANOS  
EM PACIENTES COM MUCOPOLISSACARIDOSES SUBMETIDOS  
À TERAPIA DE REPOSIÇÃO ENZIMÁTICA

*Belém-PA*

*2009*

NATHALIA OLIVEIRA DE LIMA

MONITORAMENTO DA EXCREÇÃO DE GLICOSAMINOGLICANOS  
EM PACIENTES COM MUCOPOLISSACARIDOSES SUBMETIDOS  
À TERAPIA DE REPOSIÇÃO ENZIMÁTICA

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Faculdade de  
Biomedicina da Universidade Federal  
do Pará, como requisito parcial para  
obtenção do grau de Biomédico.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva,  
Faculdade de Biomedicina – ICB – UFPA.

BELÉM-PA  
2009

NATHALIA OLIVEIRA DE LIMA

MONITORAMENTO DA EXCREÇÃO DE GLICOSAMINOGLICANOS  
EM PACIENTES COM MUCOPOLISSACARIDOSES SUBMETIDOS  
À TERAPIA DE REPOSIÇÃO ENZIMÁTICA

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Faculdade de  
Biomedicina da Universidade Federal do  
Pará, como requisito parcial para  
obtenção do grau de Biomédico.

**Belém (PA), 18 de dezembro de 2009.**

Banca examinadora:

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva (ICB – UFPA)

Avaliador 1: Profa. Rosely Maria dos Santos Cavaleiro ( ICS / UFPA) (Titular)

Avaliador 2: Prof. Dr. Nazário de Souza Messias Júnior (ICB / UFPA) (Titular)

Avaliador 3: Profa. Dra. Gilmara de Nazareth Tavares Bastos (ICB / UFPA) (Suplente)

*Dedicatória*

Aos meus pais e avó pelas oportunidades dadas.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor Luiz Carlos Santana da Silva, pela amizade, pela oportunidade de realização deste estudo e orientação neste trabalho.

Aos meus pais Eduardo e Nazareth, por terem me dado a vida e a oportunidade de ter uma boa educação, sendo um dos principais responsáveis por tudo que conquistei até agora. E á minha irmã, Aline, por existir.

Aos meus familiares, principalmente minha vó (Adydozilda Lima), por todo amor, atenção e dedicação oferecidos não só no período deste trabalho, mas durante toda minha vida. E à Dilva Maria, por todo carinho e ajuda em todos os momentos.

Ao meu amigo e namorado André Ricardo (Andrezinho), por ter estado desde o início da graduação ao meu lado, nem sempre quando quis, mas certamente sempre que precisei.

Ás minhas melhores amigas: Evelyn Andrade, por estar comigo desde a infância até hoje; Gabriella Mota, que sempre me dedicou grande amizade e Sâmia Rafaela, por ter surgido na minha vida e estar ao meu lado sempre. Obrigada por me aturar, pelos momentos de diversão proporcionados, por terem se tornado fundamentais pra mim, enfim pela amizade verdadeira... vocês definitivamente tornam minha vida mais fácil e divertida.

Aos colegas de laboratório, um agradecimento especial àqueles que me deram carona até o Bettina, ao Pedro que me auxiliou na cromatografia e ao Clebinho (gerente) pelos inúmeros ofícios, declarações e afins elaborados. Enfim a todos que direta ou indiretamente me ajudaram a realizar este estudo.

Aos meus amigos de turma, em especial Livia e Alessandra por terem tornado minhas manhãs no estágio muito mais divertidas e prazerosas. Aos meninos, Ayan, Eduardo, Igor e Nilton por todos os momentos divertidos e caronas.

Aos pacientes e seus familiares por estarem sempre dispostos a colaborar com o desenvolvimento do trabalho.

Aos funcionários do Bettina por tornarem possível a coleta das amostras.

E á Deus, por último, mas não menos importante.

## SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA</b> .....	iv
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	v
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE TABELAS, QUADROS E FIGURAS</b> .....	ix
<b>RESUMO</b> .....	xi
<b>ABSTRACT</b> .....	xii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO (EIM).....	1
1.2 DOENÇAS DE DEPÓSITO LISOSSÔMICO (DLD).....	1
1.3 MUCOPOLISSACARIDOSES (MPS).....	2
<b>1.3.1 Bases celulares das MPS</b> .....	3
<b>1.3.2. Classificação das MPS</b> .....	5
<b>1.3.3 Epidemiologia</b> .....	5
<b>1.3.4 Manifestações clínicas</b> .....	7
<b>1.3.5 Diagnóstico</b> .....	9
<b>1.3.6 Tratamento</b> .....	9
a) Tratamento não-específico.....	10
b) Transplante de células hematopoiéticas.....	10
c) Terapia de reposição enzimática.....	11
<b>2.</b>	
<b>OBJETIVOS</b> .....	14
2.1 OBJETIVO GERAL.....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	15
3.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA DE PACIENTES COM MPS.....	15
3.2 ASPECTOS ÉTICOS.....	15
3.3 CRITÉRIO DE INCLUSÃO DAS AMOSTRAS.....	15
3.4 COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS.....	17
3.5 TRIAGEM URINÁRIA (MÉTODO QUALITATIVO).....	17

3.6 DOSAGEM DE CREATININA.....	18
3.7. SEPARAÇÃO DE GLICOSAMINOGLICANOS (GAG).....	18
3.8 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA.....	18
3.9 DOSAGEM DE GAG URINÁRIO.....	18
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	19
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>20</b>
4.1 DESCRIÇÃO DA TER EM PACIENTES COM MPS I, II E V.....	20
4.2. RESULTADOS OBTIDOS PARA MPS I (P1 E P2).....	20
4.3 RESULTADOS OBTIDOS PARA MPS II (P3).....	24
4.4 RESULTADOS OBTIDOS PARA MPS VI (P4 E P5).....	25
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>29</b>
5.1 MONITORAMENTO DA EXCREÇÃO DE GAG .....	29
<b>5.1.1 Pacientes com MPS I em TRE.....</b>	<b>29</b>
<b>5.1.2 Paciente com MPS II em TER.....</b>	<b>30</b>
<b>5.1.3 Paciente com MPS VI em TER.....</b>	<b>31</b>
<b>5.1.4. Testes qualitativos para a detecção de GAG: Azul de Toluidina.....</b>	<b>31</b>
5.2 PERSPECTIVAS E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	32
<b>6</b>	
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>33</b>
6.1 EM RELAÇÃO À ANÁLISE QUALITATIVA (AZUL DE TOLUIDINA E CROMATOGRAFIA)..	33
6.2 EM RELAÇÃO À ANÁLISE QUANTITATIVA (DOSAGEM URINÁRIA DE GAG).....	33
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>35</b>
<b>8 APÊNDICES E ANEXOS.....</b>	<b>41</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARSB	Arilsulfatase B
AT	Azul de Toluidina
AH	Ácido hialurônico
BCTMA	Brometo de Cetil-Trimetil-Amônio
CREA	creatinina
CS	Codrintin Sulfato
DLD	Doenças Lisossômicas de Depósito
DMB	azul de dimetileno
DS	Dermatan Sulfato
EIM	Erros Inatos do Metabolismo
EMEA	European Medicines Agency
FDA	Food and Drug Administration
GAG	Glicosaminoglicanos
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HS	Heparan Sulfato
IDUA	alfa-L-Iduronidase
IDS	Iduronato sulfatase
LEIM	Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo
LREIM	Laboratório de Referência em Erros Inatos do Metabolismo
MPS	Mucopolissacaridoses
QS	Queratan Sulfato
rhASB	Arilsulfatase B recombinante humana
SNC	Sistema Nervoso Central
TCH	Transplante de células hematopoiéticas
TRE	Terapia de Reposição enzimática
UFPA	Universidade Federal do Pará

## LISTA DE TABELAS, QUADROS E FIGURAS

### 1. TABELAS:

<b>Tabela 1:</b> Caracterização do Diagnóstico Bioquímico dos pacientes com MPS.	<b>16</b>
<b>Tabela 2.</b> Perfil Clínico e Epidemiológico dos pacientes com MPS.	<b>17</b>

### 2. QUADROS:

<b>Quadro 1. Classificação das Mucopolissacaridoses.</b>	<b>6</b>
--	----------

### 3. FIGURAS:

<b>Figura 1:</b> Estrutura dos glicosaminoglicanos	<b>3</b>
<b>Figura 2:</b> Esquema celular das Mucopolissacaridoses	<b>4</b>
<b>Figura 3:</b> Resultados do AT para P1 e P2 (MPSI)	<b>21</b>
<b>Figura 4.</b> Cromatografia em camada delgada P1 e P2	<b>21</b>
<b>Figura 5:</b> Gráfico com Valores da dosagem inicial de GAG urinários e valores médios da excreção urinária de GAG de P1 (MPS I) comparados com os valores de referência para a faixa etária	<b>22</b>
<b>Figura 6:</b> Porcentagem de excreção urinária de GAG de P1 (MPS I)	<b>23</b>
<b>Figura 7:</b> Gráfico com Valores da dosagem inicial de GAG urinários e valores médios da excreção urinária de GAG de P2 (MPS I) comparados com os valores de referência para a faixa etária	<b>23</b>
<b>Figura 8:</b> Porcentagem de excreção urinária de GAG de P2 (MPS I)	<b>24</b>

<b>Figura 9:</b> Cromatografia em camada delgada de P3	24
<b>Figura 10:</b> Gráfico com Valores da dosagem inicial de GAG urinários e valores médios da excreção urinária de GAG de P3 (MPS II) comparados com os valores de referência para a faixa etária	25
<b>Figura 11:</b> Resultados do AT para P4 e P5 (MPSVI)	26
<b>Figura 12:</b> Cromatografia em camada delgada de P3	26
<b>Figura 13:</b> Gráfico com Valores da dosagem inicial de GAG urinários e valores médios da excreção urinária de GAG de P4 (MPS VI) comparados com os valores de referência para a faixa etária	27
<b>Figura 14:</b> Porcentagem de excreção urinária de GAG de P4 (MPS VI)	27
<b>Figura 15:</b> Gráfico com Valores da dosagem inicial de GAG urinários e valores médios da excreção urinária de GAG de P5 (MPS VI) comparados com os valores de referência para a faixa etária	28
<b>Figura 16:</b> Porcentagem de excreção urinária de GAG de P5 (MPS VI)	28

## RESUMO

As mucopolissacaridoses (MPS) são um grupo de doenças causadas pela deficiência das enzimas responsáveis pela degradação intralissossomal de glicosaminoglicanos (GAG). Essa deficiência é responsável pelo acúmulo de GAG em diversos tecidos e órgãos, promovendo uma série de disfunções patológicas. Dentre as terapias empregadas no tratamento dos pacientes, a Terapia de Reposição Enzimática (TRE) vêm demonstrando resultados significantes, no que diz respeito à melhoria das complicações fisiopatológicas, assim como na diminuição da excreção de GAG urinários, parâmetro bioquímico utilizado para avaliação e monitoramento da eficácia do tratamento. O objetivo deste trabalho foi analisar o perfil bioquímico de pacientes com MPS sob TRE no Estado do Pará através de testes bioquímicos qualitativos e quantitativos. Foram coletadas amostras de urina antes e durante a TRE (1 mg de Laronidase/kg) de 02 pacientes com MPS I (P1 e P2), 1 paciente (P3) com MPS II (1 mg de idursulfatase/Kg) e 02 pacientes (P4 e P5) com MPS VI (1mg Galsulfase/kg). As amostras foram submetidas ao teste qualitativo do Azul de Toluidina (AT), além da dosagem de GAG urinários ajustados de acordo com os valores de creatinina. Foi utilizado Bioestat 5.0 para análise estatística. No teste qualitativo (AT) predominou resultados negativos para os paciente com MPS I e VI (P1, P2, P4 e P5), já o paciente com MPS II (P3) continuou com resultado positivo. Os testes quantitativos demonstraram uma significativa redução da excreção de GAG nos pacientes com MPS I 90% após 100 semanas de TRE em P1 e 72% de redução em P2 após 45 semanas de TRE. O mesmo ocorreu para o paciente com MPS II (P3: 66,6%) e para os pacientes com MPS VI (P4: 67%; P5: 65%). A redução dos níveis de GAG urinários, com a redução da reatividade das provas de triagem bioquímica indicaram que a TRE possui eficácia no monitoramento bioquímico de pacientes com MPS. Em conclusão nossos achados demonstram que com a TRE para MPS I, II e VI obtem-se melhora nos sintomas clínicos e bioquímicos, refletindo em melhora na qualidade de vida do paciente.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. ERROS INATOS DO METABOLISMO

Este conceito foi proposto por Sir Archibald Garrod, em 1908, quando estudava pacientes portadores de alcaptonúria, pentosúria, albinismo e cistinúria, por acreditar que essas doenças eram causadas por alterações no metabolismo intermediário de aminoácidos e monossacarídeos (CLARKE, 2008).

Os Erros Inatos do Metabolismo (EIM) são um grupo de doenças de origem genética, causadas por alterações na estrutura e/ou função de moléculas protéicas importantes para reações bioquímicas, e conseqüente alteração no metabolismo humano (SAINZ *et al.*, 2002; KARAM *et al.*, 2001).

A maioria desses distúrbios metabólicos apresenta um modelo de herança autossômica recessiva, ou seja, para que uma enzima seja deficiente ou totalmente inativa é necessário que o alelo mutante esteja em homozigose ou heterozigose composta. Uma pequena parcela desses distúrbios pode ser herdada de forma autossômica dominante ou ligada ao X (Giugliani, 1988; SCRIVER *et al.*, 2001).

Os EIM são compostos por quase 600 enfermidades, cuja maioria apresenta-se na infância (NEUFELD & MUENZER, 2001). Apesar de terem uma incidência individual relativamente baixa, os EIM são muito importantes do ponto de vista de sua magnitude como problema de saúde, acarretando em transtornos neurológicos, baixa qualidade de vida e mortes prematuras (SAINZ *et al.*, 2002).

## 1.2. DOENÇAS DE DEPÓSITO LISOSSÔMICO

As Doenças de Depósito lisossômico (DDL) representam um grupo importante dos EIM e são causadas pela deficiência de uma enzima lisossômica responsável por uma determinada rota catabólica, ou, em casos mais raros, de proteínas envolvidas na biogênese do lisossomo. O resultado da

interrupção da rota é o progressivo acúmulo de metabólitos (VOET *et al.*, 2004, MEIKLE *et al.*, 1999).

Foram descritas mais de 50 DDL, sendo classificadas de acordo com o tipo de substrato acumulado. Os principais grupos de DDL são as esfingolipidoses, glicoproteinoses e mucopolissacaridoses (WILCOX, 2004),

### 1.3 MUCOPOLISSACARIDOSES (MPS)

As mucopolissacaridoses (MPS) são DDL hereditárias causadas pela deficiência de uma das exoenzimas responsáveis pela degradação intralissossomal de glicosaminoglicanos (GAG). Estes elementos são polissacarídeos complexos distribuídos largamente nas membranas celulares e na matriz extracelular. No caso das MPS, em função de uma deficiência enzimática lisossomal, os GAG não são degradados e conseqüentemente são estocados nos compartimentos lisossômicos celulares, 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).

As MPS foram descritas pela primeira vez por Hunter em 1917, mas as bases bioquímicas só foram definidas a partir da década 50. Os mecanismos moleculares envolvidos nestas desordens metabólicas começaram a ser entendido a partir da década de 90 (WRAITH, 1995).

Assim como a maioria dos EIM, as MPS são herdadas de modo autossômico recessivo, com exceção da MPS tipo II, ou síndrome de Hunter, na qual a herança é ligada ao X (SCRIVER *et al.*, 2001).

#### 1.3.1 Bases celulares das MPS

Os GAG, também conhecidos como mucopolissacarídeos, são componentes do tecido conjutivo conectivo. Uma vez produzidos os GAGs residem primariamente na superfície da célula ou na matriz extracelular, onde podem estar livres ou associados a proteínas formando proteoglicanos (CLARKE,, 2008). As moléculas de proteoglicanos são constituintes da matriz extracelular e têm a função de controlar o fluxo de água e nutrientes para as células. Quando os GAG absorvem uma grande quantidade de água, acabam

adquirindo uma consistência mucóide, viscosa. Este aspecto garante uma função lubrificante e de união entre os tecidos, permitindo, por exemplo, o movimento das articulações do corpo (PRYDS & DALEN, 2000).

Os principais GAG que compõem proteoglicanos são: Condroitin Sulfato (CD), dermatan Sulfato (DS), Queratan Sulfato (QS) e heparan sulfato (HS). Cada um tem uma única estrutura constituída de unidades repetidas de dissacarídeos (BYERS *et al.*, 1998) (Figura 1).

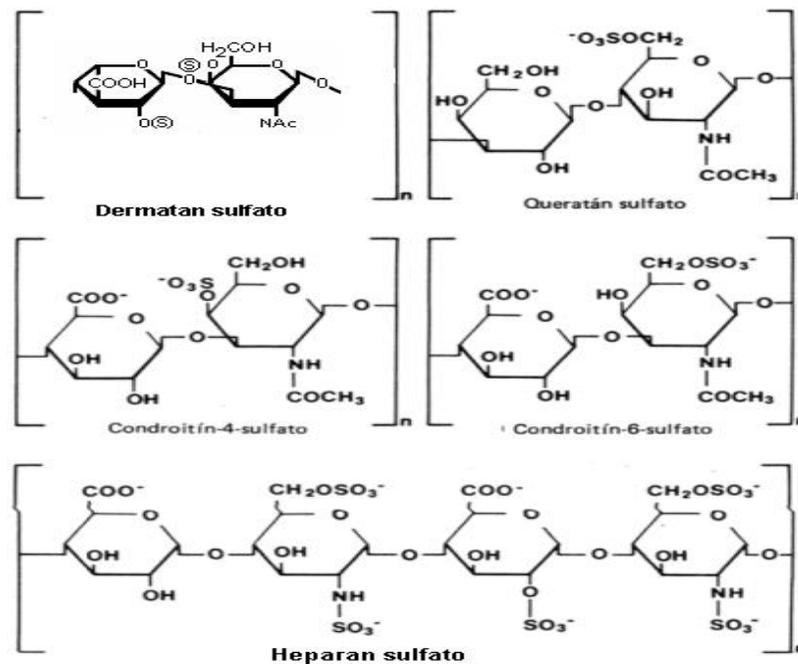
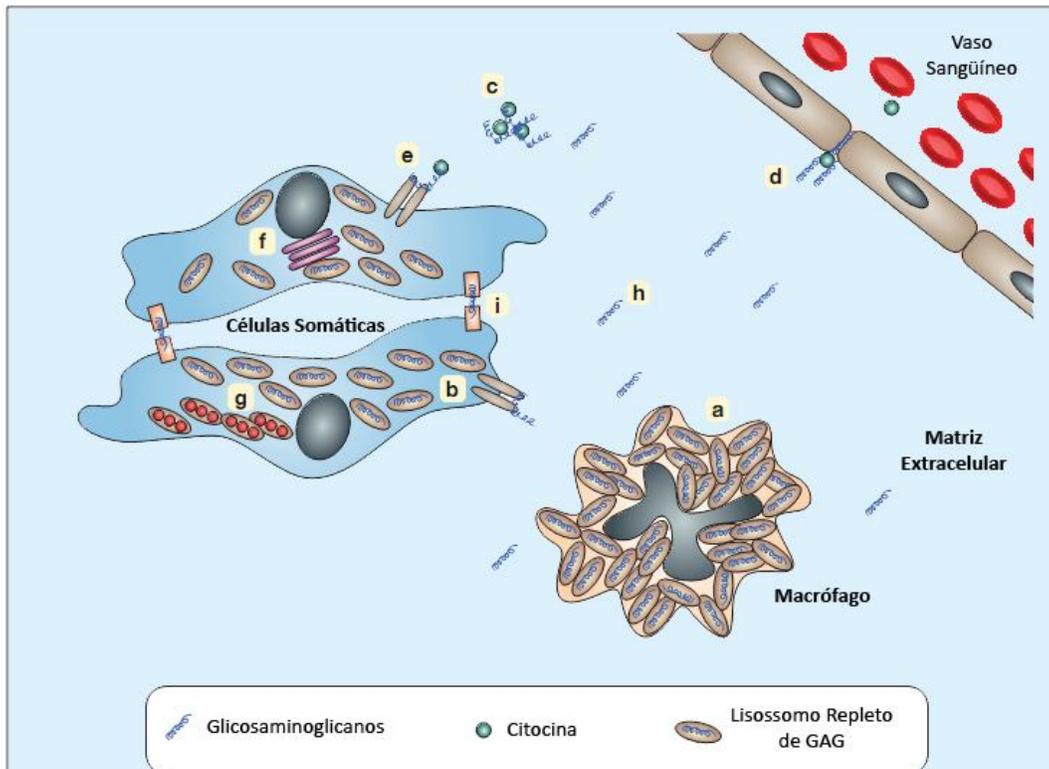


Figura 1: Estrutura dos glicosaminoglicanos.

Alguns proteoglicanos ainda podem estar ancorados na membrana celular, podendo se ligar a fatores de crescimento e a outras proteínas servindo como sinal para as células (Figura 2). Eles também podem formar géis que atuam como um filtro para regular a passagem de moléculas através do meio extracelular, e ainda, podem bloquear, ativar ou guiar a migração celular através da matriz (CLARKE, 2008).

A degradação dos GAGs ocorre a partir da clivagem de moléculas de proteoglicanos por proteases e pela remoção de suas porções endoglicosídicas. A catálise desses compostos pode, ocorrer tanto na matriz

extracelular quanto nos compartimentos lisossomais celulares (CLARKE, 2008).



**Figura 2:** Esquema celular das Mucopolissacaridoses. A figura ilustra os diversos processos fisiológicos que podem ser afetados pela deficiência na degradação de GAG, com conseqüente aumento do depósito desses compostos na matriz extracelular. (a) Macrófago disfuncional em função do acúmulo de GAG nos lisossomos; (b) padrão alterado de receptores da membrana plasmática; (c) Alteração na captação de citocinas e fatores de crescimento; (d) alteração no recrutamento de citocinas circulantes; (e) Alteração na apresentação de citocinas aos receptores; (f) interferência no tráfico celular; (g) Depósito lisossômico adicional pela interferência de hidrolases lisossomais; (h) interações anormais da matriz extracelular; (i) adesão celular alterada. Adaptado de CLARKE, 2008.

A ausência ou deficiência de uma ou mais enzimas relacionadas ao processo de catálise de GAG ocasiona a deposição destes compostos em diversos tecidos orgânicos. Modelos animais têm demonstrado um excessivo acúmulo de GAG em tecidos hepáticos, renais, pulmonares, cardíacos e esplênicos, com algum comprometimento de tecidos nervosos (LI *et al.*, 1999; VOGLER *et al.*, 2001; 2005)

Como consequência da catálise deficiente, os GAG não degradados são, portanto, excretados na urina, o que consiste em um importante parâmetro para investigação de MPS. Dependendo do tipo de MPS, o catabolismo de diferentes GAGs pode ser bloqueado isoladamente ou em conjunto (BYERS *et al.*, 1998; CLARKE, 2008).

### **1.3.2. Classificação das MPS**

Embora existam diferentes fenótipos clínicos para o mesmo defeito enzimático, bem como fenótipos semelhantes para deficiências enzimáticas diferentes, as MPS podem ser classificadas quanto à deficiência enzimática, ao tipo de GAG excretado e a localização lisossômica dos genes envolvidos, como descrito na Quadro 1 (CLARKE, 2008).

As MPS também podem ser classificadas em dois grupos dependendo do tipo de GAG armazenado, por exemplo, as MPS caracterizadas pelo acúmulo de QS e DS (MPS VI e IV A) apresentam graves alterações esqueléticas, enquanto que na MPS caracterizado pelo acúmulo de HS (MPS III), nota-se principalmente envolvimento do sistema nervoso central (SNC). Pacientes com deficiência na enzima de degradação tanto de DS quanto de HS, podem apresentar alterações esqueléticas e de SNC (BYERS *et al.*, 1998)

### **1.3.3. Epidemiologia**

As MPS estão entre as DDL mais freqüentes, com uma incidência estimada em 1:10000 a 1:25000 recém-nascidos. As MPS I e II são consideradas as mais freqüentes, enquanto a MPS VII 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 (SOLYON, 1996; MEIKLE *et al.*, 1999).

As doenças de depósito lisossômico são os EIM mais freqüentes, representando 59,8%, e as MPS são 54,5% das DLD. A incidência mundial de MPS é cerca de 1,9 a 4,5 casos por 100.000 nascidos vivos. No Brasil, a incidência ainda é desconhecida. Entretanto a rede MPS Brasil identificou 249 pacientes, entre estes 60 apresentam MPS I, 82 MPS II, 31 MPS III (7 MPS

IIIA, 14 MPS IIIB e 31 MPS IIIC), 15 MPS IV (11 MPS IVA e 4 MPS IVB), 57 MPS VI e 4 têm MPS VII (VIEIRA *et al.*, 2008).

**Quadro 1: Classificação das Mucopolissacaridoses**

<b>Classificação</b>	<b>Herança</b>	<b>Enzima deficiente</b>	<b>Localização gênica</b>	<b>GAG estocado</b>
<b>MPS I</b> (Hurler, Hurler/Scheie Scheie)	AR	$\alpha$ -L-iduronidase	4p16.3	DS/HS
<b>MPS II</b> (Hunter)	RX	Iduronato-2 sulfatase	Xq28	DS/HS
<b>MPS III A</b> (Sanfilippo)	AR	Glicosamina N - sulfatase	17q25.3	HS
<b>MPS III B</b> (Sanfilippo)	AR	$\alpha$ - N - acetilglicosaminidase	17q21	HS
<b>MPS III C</b> (Sanfilippo)	AR	Acetil CoA: $\alpha$ - glicosamina - N acetil transferase	8p11.1	HS
<b>MPS III D</b> (Sanfilippo)	AR	N- acetilglicosamina-6 sulfatase	12q14	HS
<b>MPS IV A</b> (Morquio A)	AR	N- acetilgalactosamina-6 sulfatase	16q24.3	QS
<b>MPS IV B</b> (Morquio B)	AR	$\beta$ - D - galactosidase	3p21.33	QS
<b>MPS VI</b> (Maroteaux-Lamy)	AR	N-acetilgalactosamina-4 sulfatase	15q12	DS/HS
<b>MPS VII</b> (Sly)	AR	$\beta$ - glucoronidase	7q21.11	DS/HS
<b>MPS IX</b> (Natowicz)	AR	glucoronato-2 sulfatase	3p21.1	AH

Adaptado de CLARKE, 2008. AR: autossômica recessiva, XR: recessiva ligada ao X, DS: dermatan sulfato;HS: heparan sulfato; QS: queratan sulfato; AH: ácido hialurônico.

O perfil epidemiológico de MPS no Estado do Pará foi descrito por Castro *et al.* (2007). Neste trabalho foram avaliados pacientes diagnosticados

no período de 1986 a 2005, foram encontrados vinte dois casos, destes 3 casos são de MPS I, 5 de MPS II, 4 de MPS VI e 10 caso de MPS não definido. No estado do Pará, a freqüência para todos os tipos de MPS é de 1:192.000 nascidos vivos. Dentre as MPS mais freqüentemente diagnosticadas estão a MPS II e VI (1:960.005 por nascidos vivos), seguida da MPS I (1:1.140.000 por nascidos vivos). A freqüência de 1:411.430 encontrada para nascidos vivos com MPS não classificada reflete a necessidade da implantação de protocolos de investigação dessa doença no Estado do Pará.

### **1.3.4 Manifestações Clínicas**

Em todas as MPS o curso é crônico e progressivo e o envolvimento multisistêmico, sendo acometidos principalmente o sistema esquelético e pulmonar, a córnea, a pele, o fígado, o baço, o cérebro e as meninges. Há uma grande heterogeneidade fenotípica Os sintomas apresentados por pacientes com MPS variam de acordo com o tipo (SCHWARTZ *et al.*, 2001).

O acúmulo de GAG parcialmente degradado nos tecidos causa as manifestações clínicas mais comuns à maioria das MPS, como as fáceis grosseiras, má espessamento cutâneo, hepatoesplenomegalia. O retardo mental e o retardo no crescimento resultam de alterações na função celular (MATTE, 1998). As contraturas articulares, presentes na maioria das MPS, ocorrem devido à interferência direta na estrutura de substâncias como o colágeno. A audição, visão, respiração, funções cardiovasculares e a mobilidade podem, também, estar eventualmente comprometidas (NEUFELD & MUENZER, 2001).

A MPS do tipo I apresenta um amplo espectro clínico, podendo ser classificada em Síndrome de Hurler (MPS I H, forma mais grave) de início precoce, comprometimento neurológico e de progressão mais rápida; Síndrome de Scheie (MPS I S) ou Síndrome de Hurler-Scheie (MPS I H/S) nas quais as manifestações clínicas variam, mas não há comprometimento do intelecto e a expectativa de vida é maior que 25 anos (SURESH & WRAITH, 2005; MUENZER, 2004).

Os sintomas mais comuns encontrados em pacientes com MPS do Tipo I são déficit de aprendizagem, deformidades ósseas, obstrução das vias aéreas superiores, turvação da córnea e doenças cardíacas (WRAITH *et al.*, 2004).

A MPS do Tipo II (Síndrome de Hunter) apresenta praticamente o mesmo quadro clínico característico da MPS do Tipo I, com exceção da opacificação de córnea e do comprometimento progressivo do sistema nervoso central (NEUFELD & MUENZER, 2001).

A MPS do Tipo III (Síndrome de Sanfilippo) inclui quatro subtipos A, B, C e D, caracterizados pelo acúmulo do GAG heparan sulfato e, no entanto, por deficiência de enzimas lisossomais diferentes. Em todos os subtipos pode-se encontrar um envolvimento físico mais leve do que nas outras MPS e com comprometimento neurológico mais grave. Crianças com MPS do tipo III geralmente apresentam dificuldade de aprendizado, e usualmente então, desenvolvem um grave distúrbio de comportamento (MUENZER, 2004; WRAITH & CLARKE, 2006).

Na MPS do Tipo IV A (Síndrome de Mórquio), os pacientes apresentam cognição normal, mas são afetados por uma grave displasia óssea, a qual na maioria das vezes acarreta em baixa estatura, deformidade do tórax, encurtamento do pescoço e instabilidade cervical. Na MPS do Tipo IV B, encontra-se algumas das deformidades esqueléticas do tipo A, acrescentado de déficit de aprendizagem (WRAITH & CLARKE, 2006).

A MPS do Tipo VI (Síndrome de Maroteaux-Lamy) é caracterizada pelo intelecto preservado, alterações esqueléticas acentuadas e dismorfismo facial (NEUFELD & MUENZER, 2001).

Os pacientes com MPS VII geralmente apresentam quadro clínico semelhante aos de MPS I. Quanto a MPS IX apenas um caso foi descrito na literatura (WRAITH & CLARKE, 2006)

Em geral, deficiência mental profunda é característica de pacientes com MPS I H, com a forma grave da MPS II e todos os tipos de MPS III. As

MPS VI e MPS II (forma moderada) não apresentam, geralmente, comprometimento mental. Problemas ósseos são mais comumente descritos na MPS IV (MUENZER *et al*, 2004).

### **1.3.5. Diagnóstico**

Nas MPS os GAG parcialmente degradados são armazenados nos lisossomos e excretados em grande quantidade na urina. O diagnóstico em pacientes com suspeita de inicia-se com testes de triagem urinária para direcionamento da investigação bioquímica, os testes são qualitativos e podem ser baseados na turvação urinária, como o Brometo de Cetil-Trimetil-Amônio (BCTMA) ou na visualização de manchas metacromáticas em papel impregnado com corantes como o Azul de Toluidina (AT). Quando estes testes resultam em positividade, análises mais específicas são demandadas. (SCHWARTZ *et al.*, 2001)

Os GAG excretados na urina de pacientes com MPS podem ser identificados pelas técnicas de cromatografia em camada delgada e eletroforese, análises determinantes para apontar a forma de MPS possivelmente relacionada com os GAG identificados (WAJNER *et al.*, 2001). Os GAG urinários também podem ser quantificados (WRAITH 1995; SCHWARTZ *et al.*, 2001).

O diagnóstico definitivo é dado através da dosagem das enzimas lisossomais deficientes em cada subtipo de MPS. Os ensaios enzimáticos podem ser processados em várias amostras biológicas, a saber: fibroblastos, leucócitos, plasma, sangue impregnado em papel filtro, líquido amniótico e vilosidades coriônicas, estes dois últimos associados ao diagnóstico pré-natal (BECK, 2000; NELFEUD & MUENZER, 2001; SCHWARTZ *et al*, 2001).

### **1.3.6. Tratamento**

Até 1980, apenas terapias paliativas e não específicas foram aplicadas para pacientes com MPS. Estas condutas terapêuticas não se mostraram tão eficazes, já que não produziam nenhuma mudança muito significativa no quadro clínico do paciente, provavelmente, por esses procedimentos não atuarem sobre as enzimas deficientes (NEUFELD & MUENZER, 2001; MUENZER, 2004).

O transplante de células hematopoiéticas (TCH) tem sido considerado uma ferramenta terapêutica com benefícios promissores em alguns casos específicos de MPS I e MPS VI (MUENZER, 2004). Mais recentemente a terapia de reposição enzimática (TRE) tornou-se realidade para MPS I, MPS II, MPS VI (HARMARTZ *et al.*, 2008)

#### **a) Tratamento não-específico**

O tratamento não específico das manifestações clínicas das MPS inclui uma abordagem multidisciplinar. Este tipo de tratamento pode melhorar a qualidade e aumentar a expectativa de vida de muitos pacientes e seus familiares (MUENZER, 2004).

Várias medidas de suporte podem ser tomadas para as manifestações clínicas da doença, tais com: tratamento medicamentoso para problemas cardíacos, respiratórios, neurológicos, entre outros. Tratamento cirúrgico para hidrocefalias, hérnias, algumas alterações esqueléticas, amigdalectomia. Transplante de córnea para os casos de opacificação mais graves (WRAITH & CLARKE, 2006).

A fisioterapia é importante para muitos pacientes com o objetivo de minimizar as contraturas e rigidez articular e melhorar a força muscular. A fonoaudiologia e a terapia ocupacional também podem contribuir para o paciente e sua família ajudando na aquisição de habilidades pelo paciente (MUENZER, 2004).

Devido à natureza progressiva da doença, pacientes com MPS precisam ser avaliados regularmente, com o objetivo de identificar potenciais problemas precocemente, uma vez que a intervenção pode diminuir a morbidade e prevenir a mortalidade precoce (WRAITH & CLARKE, 2006).

## **b) Transplante de células hematopoiéticas**

O transplante de células hematopoiéticas (TCH) é uma alternativa terapêutica utilizada como tentativa de corrigir defeitos enzimáticos desde 1979. Baseia-se no fato de que a enzima produzida pelas células do doador são liberadas no plasma do receptor, e podem ser absorvidas pelas células com a enzima deficiente (MATTE, 1998).

Os benefícios obtidos pelos pacientes com MPSI submetidos ao TCH foram a rápida redução do acúmulo de GAG, reduzindo drasticamente os problemas respiratórios, a hepatoesplenomegalia, opacificação da córnea e melhora significativa nos problemas cardíacos. Para a MPS VI houve redução da hepatoesplenomegalia, estabilização da função cardiopulmonar, melhora na acuidade visual e na mobilidade articular. No caso de pacientes com MPS VII foi ponderado que a melhora do quadro clínico dependeria da situação neurológica do paciente no momento do transplante (PETERS & STEWARD, 2003).

O entendimento dos benefícios e das limitações do transplante de medula óssea é acompanhado juntamente com extensas experiências clínicas com pacientes portadores de MPS e com numerosos estudos experimentais em modelos animais. O advento do transplante de medula óssea beneficiou alguns casos, principalmente, as formas graves da MPS I e MPS VI (MUENZER, 2004). Entretanto está associada a diversas complicações como, por exemplo, as pulmonares e o índice de mortalidade associada a este procedimento varia de 15% a 50% (COX-BRINKMAN *et al.*, 2006)

### **c) Terapia de reposição enzimática**

A Terapia de Reposição Enzimática (TRE) repõe a enzima ausente através de infusões intravenosas periódicas. Com o advento das técnicas de engenharia genética, a enzima humana recombinante pôde ser gerada, eliminando a necessidade de purificação da enzima de humanos ou de tecidos animais. A maior vantagem da TRE está no fato que ela pode distribuir mais enzimas do que as produzidas pelo transplante de células tronco hematopoiéticas. A TRE é indicada para um número maior de pacientes (MUENZER, 2004).

A maior desvantagem é que a administração intravenosa da enzima não ultrapassa a barreira hemato-encefálica, não revertendo assim danos neurológicos (MUENZER, 2004).

A TRE com enzimas humanas recombinantes é um tratamento que pretende fornecer enzima com atividade o suficiente para reduzir e prevenir o acúmulo de substratos não degradados e tem sido usada como tratamento para várias DDL: Doença de Gaucher, Doença de Pompe, Doença de Fabry, Doença de Niemann-Pick C e as MPS, foco deste estudo. A TRE está disponível para as MPS I, II e VI. (BRADY, 2006)

#### **TRE para MPS I**

O primeiro estudo de TRE para MPS I foi desenvolvido em 1997 e demonstrou algumas melhoras nos pacientes que participaram (Sifuentes *et al.*, 2006). Após o estudo de fase III (WRAITH *et al.*, 2004), os resultados apontaram para uma melhora da função pulmonar, distância caminhada em 6 minutos, diminuição da hepatomegalia e da excreção urinária de GAG. Nos pacientes com a MPS I H (forma mais grave) foram observados melhora da apnéia do sono e a flexão do ombro.

Com estes resultados a laronidase (Aldurazyme™, da Biomarin Phamaceutica Inc., EUA e Genzyme Corporation, EUA), primeira enzima disponível para o tratamento de MPS, foi aprovada para uso em pacientes com MPS I na União europeia (EMEA) e nos Estado Unidos (FDA). No Brasil, o Aldurazyme® foi aprovado pela ANVISA em 2006.

### **TRE para MPS II**

Um estudo de fase II/III (MUENZER *et al.*, 2006) demonstrou a segurança e eficácia da idursulfatase (Elaprase™ Shire Huma Genetics Therapies, EUA) atualmente aprovada para uso nos EUA e na União Européia. O estudo de avaliação foi conduzido com 96 pacientes, em três grupos: placebo, pacientes que recebiam a droga semanalmente e outro que eram medicados quinzenalmente. Melhoras foram encontradas em relação à função pulmonar, distância caminhada em 6 minutos, diminuição da excreção urinária e da organomegalia (MUENZER *et al.*, 2006).

### **TRE para MPS VI**

A TRE para MPS VI, a arilsulfatase B recombinante humana (RhASB) (Naglazyme™, da Biomarin Phamaceutica Inc., EUA ) já é uma realidade nos EUA e na Europa. Estudos de HARMARTZ e colaboradores (2006 e 2008) demonstraram a eficácia e segurança no tratamento de pacientes com MPS VI.

#### **d) Novas alternativas de tratamento**

Como futura opção de tratamento para as MPS, estão sendo desenvolvidas técnicas que envolvem as terapias de inibição da síntese do substrato e a terapia gênica (ETO & OHASHI, 2000)

Enquanto a TRE objetiva a remoção do material acumulado dentro do lisossomo, a terapia de inibição da síntese do substrato tem como meta inibir parcialmente o ciclo da biossíntese para reduzir a entrada de substrato para os lisossomos (BECK, 2006).

A terapia gênica consiste na inserção de fragmentos normais do gene defeituoso, através de vetores, dentro do organismo para permitir que sejam produzidas quantidades suficientes de enzima. Estudos de terapia gênica *in vitro* e/ou *in vivo* têm sido desenvolvidos para MPS I, MPS II, MPS III A, MPS III B, MPS VI e MPS VII (BECK, 2006).

## **2. OBJETIVOS**

### 2.1. OBJETIVO GERAL

- Avaliar a excreção de glicosaminoglicanos em pacientes com Mucopolissacaridoses sob terapia de reposição enzimática no Estado do Pará.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar qualitativamente o padrão de excreção de GAG em pacientes com MPS I, II e VI antes e durante a TRE;
- Avaliar quantitativamente o padrão de excreção de GAG em pacientes com MPS I, II e VI antes e durante a TRE.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA DE PACIENTES COM MPS

A seleção das amostras consistiu na análise do perfil clínico e nos resultados dos testes bioquímicos de triagem e confirmação do diagnóstico para cada paciente, realizados no Hospital Universitário Bettina de Ferro Souza da Universidade Federal do Pará (HUBFS/UFPA), no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo da Universidade Federal do Pará (LEIM/UFPA) e no Laboratório de Referência em Erros Inatos do Metabolismo do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – LREIM/SGM/HCPA.

Foram selecionados 5 pacientes com MPS: 02 com MPS I (P1 e P2), 01 com MPS II (P3) e 02 com MPS VI (P4 e P5) encaminhados pelo o Hospital Universitário Bettina Souza Ferro (HUBSF), local onde recebem a terapia de reposição enzimática.

#### 3.2. ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo procurou levar em consideração os princípios éticos básicos das diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos: autonomia, beneficência, não malevolência e justiça. As informações sobre o projeto foram fornecidas às famílias participantes. As famílias que expressaram concordância com o estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

#### 3.3. CRITÉRIO DE INCLUSÃO DAS AMOSTRAS

O critério fundamental para a inclusão dos pacientes na amostra foi o diagnóstico clínico e bioquímico de MPS. O diagnóstico foi dado mediante análise das enzimas lisossomais específicas para cada subtipo da doença:  $\alpha$ -L-

Iduronidase, IDUA (enzima deficiente em pacientes com MPS I), Iduronato sulfatase, IDS (enzima deficiente em pacientes com MPS II) e Arilsulfatase B, ARSB (enzima deficiente em paciente com MPS VI). Os critérios de inclusão laboratorial obtidos no diagnóstico estão descritos na tabela 1 e os dados clínicos pré- terapia e epidemiológicos dos pacientes em estudo encontram-se na tabela 2.

**Tabela 1:** Caracterização do Diagnóstico Bioquímico dos pacientes com MPS.

Pacientes	AT	GAG urinários (mg/mmol CREA)	Valores de referência (mg/mmol CREA)*	Atividade enzimática em leucócitos (nmoles/h/mg prot)	Valores de referência (nmoles/h/mg prot)
Paciente 1 (MPS I)	+	76,4	1,5 – 7,0 (18-20 anos)	0,03**	6,8-13,7 (IDUA) <sup>§</sup>
Paciente 2 (MPS I)	+	18,2	3,4 – 11,0 (< 14 anos)	0,25	32-52 (IDUA)
Paciente 3 (MPS II)	+	12,4	5,2 – 12,0 (< 9 anos)	ND	31-110 (IDS)
Paciente 4 (MPS VI)	+	31,9	3,4 – 11,0 (< 14 anos)	8,0	72-176 (ARSB)
Paciente 5 (MPS VI)	+	26,92	3,4 – 11 (< 14 anos)	10,0	72-176 (ARSB)

CREA: Creatinina; GAG: glicosaminoglicanos; prot: proteína; ARSB: arilsulfatase b; NAGLU: N-acetil-glicosaminidase; IDUA:  $\alpha$ -L-iduronidase; ND: não detectável. \*Os valores de referência de GAG urinários correspondem à faixa etária de cada paciente no momento da realização da primeira dosagem. \*\*Valor de atividade enzimática dosada em plasma (nmoles/h/mL).<sup>§</sup>Valores de referência em plasma humano (nmoles/h/mL). Fonte Prontuários LEIM/ICB/UFPa e LREIM/SGM/HCPA.

**Tabela 2.** Perfil Clínico e Epidemiológico dos pacientes com MPS

Pacientes	Sexo	Idade (anos)	Consangüinidade	ID (anos)	IIS (meses)	IUA (anos)	Altura (cm)	Opacificação córnea	Dano cardíaco
Paciente 1 (MPS I)	M	21	Sim	16	< 6	20	138	++++	Insuf. Mitral / Aórtica
Paciente 2 (MPS I)	M	15	Não	11	60	15	152	++	Insuf. Mitral
Paciente 3 (MPS II)	M	09	Não	7	36	8	104	-	Insuf. aórtica
Paciente 4 (MPS VI)	F	16	Não	9	14	16	121,5	+++	Insuf. Mitral / aórtica
Paciente 5 (MPS VI)	F	14	Não	7	24	14	121,5	++	Insuf. Mitral / Aórtica

IIS: Idade do início dos sintomas; ID: Idade de diagnóstico; IUA: Idade da última avaliação.  
++++: grave; +++: moderada; ++: branda; - ausente.

### 3.4. COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

Amostras de urina (30mL) dos pacientes com MPS I, II e VI foram coletadas antes do começo da TRE e semanalmente antes de cada infusão de reposição enzimática. Os períodos de coleta foram determinados de acordo com o tempo de tratamento de cada paciente, na maior parte das vezes semanalmente. As amostras foram estocadas a -20°C até a análise.

### 3.5. TESTE DO AZUL DE TOLUIDINA (MÉTODO QUALITATIVO)

Tanto para as análises laboratoriais iniciais visando o diagnóstico de MPS quanto para o monitoramento bioquímico da excreção de GAG nos pacientes foi utilizado o teste de AT, um dos testes de triagem urinária, descrito por BUIST (1968) e THOMAS & HOWELL (1973) no qual há a visualização de manchas com coloração púrpura metacromática em papel filtro quando na presença de GAG.

### 3.6. DOSAGEM DE CREATININA

A dosagem de creatinina, descrita por DICK (1970), na urina é um procedimento inicial prévio à separação e à quantificação de GAG que visa estimar a quantidade de soluto da amostra em função da excreção do metabólito creatinina.

### 3.7. SEPARAÇÃO DE GLICOSAMINOGLICANOS (GAG)

A separação de GAG é um procedimento anterior à técnica da cromatografia em camada delgada. Este método proposto por DIFERRANTE (1967) tem por finalidade separar os GAG urinários de sua parte protéica para que estes sejam aplicados puros em uma cromatoplaça de camada delgada como discutido em seguida.

### 3.8. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

A cromatografia em camada delgada é uma técnica que pode indicar o tipo ou conjunto de MPS através da visualização de padrões de bandas de heparan sulfato (HS), dermatan sulfato (DS), condroitin sulfato (CS) e queratan sulfato (QS). Este método descrito por LIPIELLO & MANKING (1971) e HUMBEL *et al.* (1972) consiste na aplicação de 8mL de GAG em cromatoplaça de celulose. Esta placa é colocada em um solvente contendo ácido acético 0,5N, etanol absoluto e acetato de cálcio a fim de que ocorra a migração dos GAG e a formação de bandas de acordo com o gradiente de densidade específico para cada tipo de GAG

### 3.9. DOSAGEM DE GAG URINÁRIO

A dosagem de GAG urinário consiste em um método simples e de fácil emprego, comumente utilizado por laboratórios que realizam a triagem urinária para investigação de MPS. Esse método produz resultados mais confiáveis em relação a falsos-negativos e indica a quantidade de GAG excretados na urina do paciente através do método espectrofotométrico

descrito por DE JONG *et al.* (1991), o qual mede a absorvância da reação obtida entre uma solução tamponada de azul de dimetileno (DMB) e os GAG presentes na urina. O resultado é expresso em mg de GAG / mmol de creatinina ou ug de GAG / mg de creatinina.

### 3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Calculou-se a média e o desvio padrão da excreção de GAG a cada quatro semanas de tratamento, assim como a variação em percentual dos valores encontrados durante a TRE em relação aos encontrados antes do início do tratamento. Para a análise dos resultados das dosagens bioquímicas (variáveis quantitativas) foi utilizado o teste t de Student.. Todas as análises foram feitas utilizando o aplicativo Biostat 5.0 (AYRES *et al.*, 2008).

Para a análise do teste qualitativo Azul de Toluidina foram considerados os valores percentuais para cada resultado (positivo, negativo ou duvidoso).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. DESCRIÇÃO DA TRE EM PACIENTES COM MPS I, II E VI:

Todos os pacientes recebem, por infusão, 1 mg de enzima/kg corpóreo. Os pacientes P1 e P2 (ambos MPS I) receberam a enzima laronidase; P3 (MPS II) recebe idursulfatase e os pacientes P4 e P5 (ambos MPS VI) recebem a galsulfase.

P1 começou a receber a TRE em 2007. Inicialmente realizava infusão enzimática uma vez a cada dez dias, durante dez semanas. Depois deste período inicial, por problemas na obtenção da medicação, passou doze semanas sem recebê-la. Após isto, começou a receber TRE uma vez por semana.

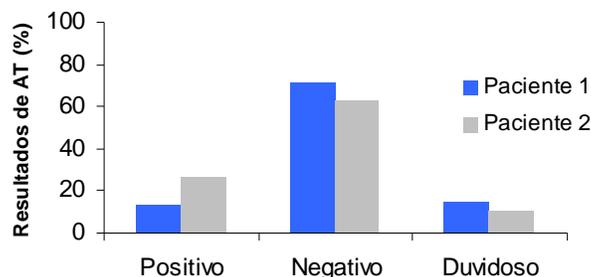
P2 iniciou a TRE em 2008 com TRE semanal, o tratamento foi interrompido desde maio deste ano até o presente momento, neste período foi colhida uma amostra de urina.

P3 começou a receber enzima no fim de 2008, porém aos 24 semanas de tratamento houve interrupção.

P4 e P5 recebem TRE uma vez por semana desde 2004. Durante o segundo mês em que foram acompanhadas por este estudo, houve uma semana na qual ambas não receberam a enzima.

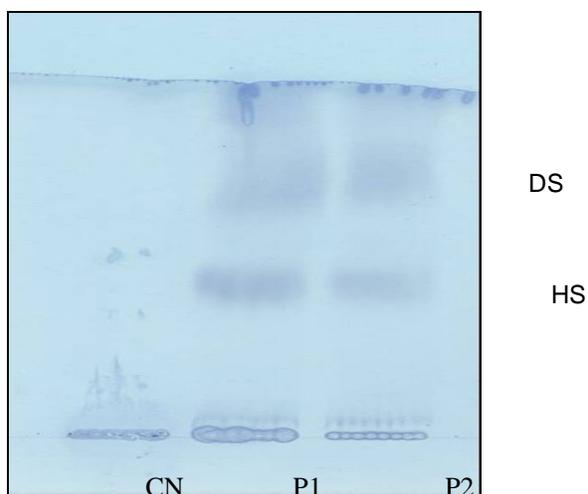
### 4.2. RESULTADOS OBTIDOS PARA MPS I (P1 E P2)

O teste de AT para P1 mostrou-se negativo em 71% das amostras de urina analisadas e em alguns casos (13%) forneceu resultados positivos. Para P2, apesar do alto número de resultados positivos (26%), foi predominante os resultados negativos em 63% das amostras de urina analisadas. Em ambos os pacientes, os resultados do teste qualitativo, mostraram uma significativa diminuição na excreção urinária de GAG (Figura 3).



**Figura 3:** Resultados do Teste do Azul de Toluidina (AT) empregado na análise qualitativa da excreção de GAG urinários de P1 e P2 (MPS I) durante a TRE

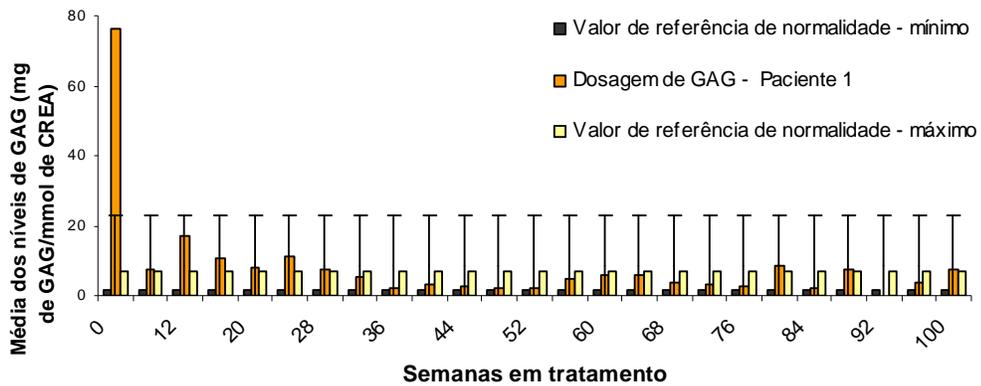
Na cromatografia em camada delgada observou-se o padrão de bandas dos GAG heparan sulfato (HS) e dermatan sulfato (DS) nas urinas desses pacientes, o que corresponde ao padrão de excreção de GAG característicos de pacientes com MPS I (Figura 4).



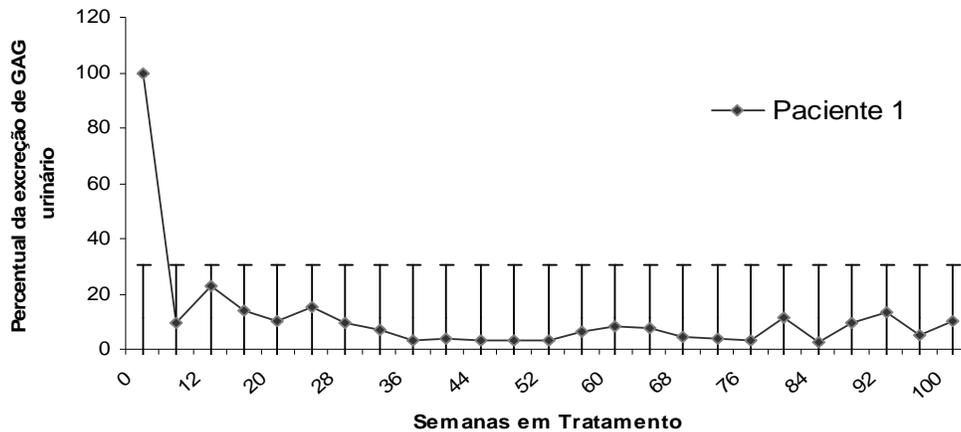
**Figura 4.** Cromatografia em camada delgada revelando padrões de migração de GAG. CN (controle negativo). P1 e P2: padrão positivo para MPS I, indicando a presença de HS (heparan sulfato) e DS (dermatan sulfato). Fonte: LEIM/ICB/UFPA.

A análise quantitativa de GAG urinários demonstrou uma redução significativa da excreção de GAG em todos os pacientes com MPS I submetidos à TRE em relação aos níveis anteriores à terapia. Em P1, (Figura 5) os níveis de excreção de GAG chegaram ao valor de referência a partir da 24<sup>o</sup> semana em tratamento.

O nível de excreção de GAG antes do início da terapia era de 76,38 mg/mmol de CREA, havendo uma redução de aproximadamente 85% ( $p < 0,001$ ) na taxa de excreção de P1 durante as 16 primeiras semanas de TRE. Essa redução se tornou mais evidente nas semanas posteriores, chegando a 90% a partir da 44ª semana e se manteve em níveis relativamente constantes até o final do período analisado (Figura 6).

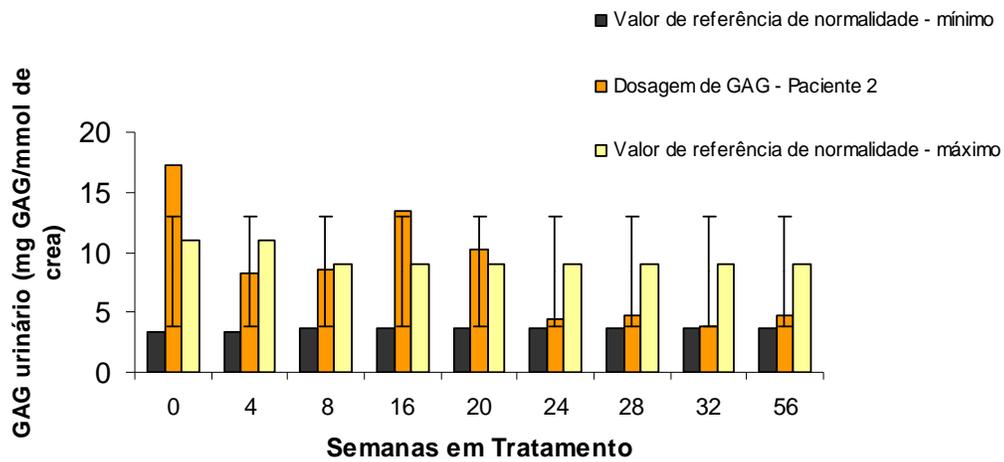


**Figura 5:** Valor da dosagem inicial de GAG urinários e valores médios da excreção urinária de GAG de P1 (MPS I) a cada quatro semanas de TRE comparados com os valores de referência para a faixa etária (18 á 20 anos: 1,5 – 7 mg/mmol).

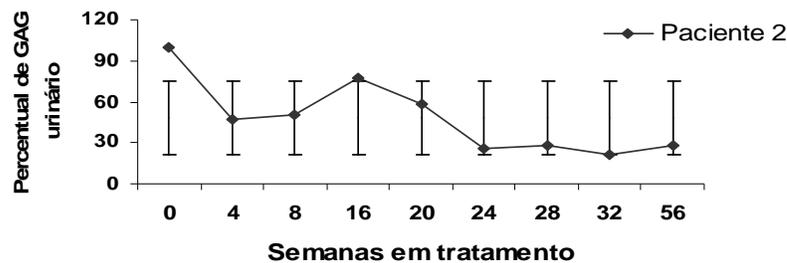


**Figura 6:** Porcentagem de excreção urinária de GAG de P1 (MPS I) no intervalo de quatro semanas em relação aos valores de GAG urinários obtidos antes do início da TRE.

Em P2 (MPS I) observa-se significativa redução inicial, alcançando o valor de normalidade também a partir da 24<sup>o</sup> semana de tratamento (Figura 7). Em relação à concentração de GAG obtida antes do início da TRE, houve uma redução inicial de aproximadamente 47% ( $p < 0,05$ ). Esses valores oscilaram acentuadamente, aproximando-se do valor de GAG antes do início da TRE na 16<sup>o</sup> semana e retornando a valores menores durante a 20<sup>a</sup> e 24<sup>a</sup> semana ( $p < 0,05$ ). Houve interrupção da terapia após a 45<sup>o</sup> semana de tratamento. A concentração de GAG urinário encontrada na 56<sup>o</sup> semana corresponde ao GAG excretado pelo paciente sem receber a enzima (Figura 8).



**Figura 7:** Valor da dosagem inicial de GAG urinários e valores médios da excreção urinária de GAG de P2 (MPS I) a cada 4 semanas de TRE comparados com os valores de referência para a faixa etária. (10 á 14 anos: 3,4 – 11 mg/mmol; 15 á 18 anos: 2,6 - 9 mg/mmol)

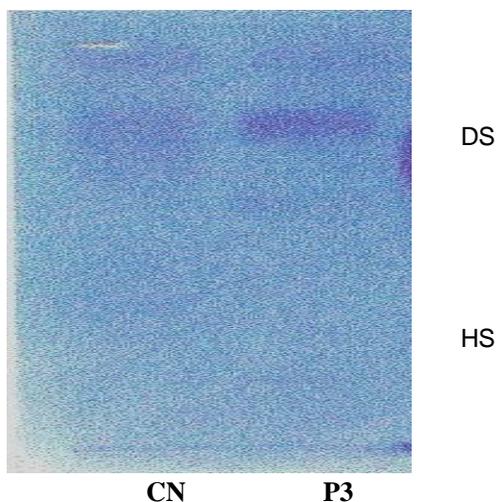


**Figura 8:** Porcentagem de excreção urinária de GAG de P2 (MPS I) no intervalo de quatro semanas em relação aos valores de GAG urinário obtido antes do início da TRE.

#### 4.3. RESULTADOS OBTIDOS PARA MPS II (P3)

Nas amostras de urina de P3 (MPS II), foi encontrado, em sua maioria, padrões positivos para o teste AT antes e durante a TRE, comprovando a existência de GAG em elevada concentração, mesmo após o início da terapia.

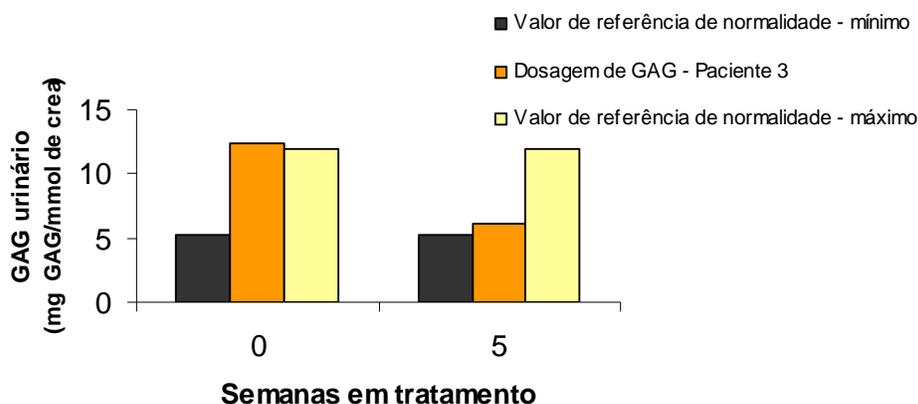
A cromatografia em camada delgada revelou a presença dos GAG dermatan sulfato e heparan sulfato nas amostras de urina de P3, o que condiz com o padrão de excreção de GAG em pacientes com MPS II (Figura 9).



**Figura 9.** Cromatografia em camada delgada revelando padrões de migração de GAG. CN (controle negativo). P3: padrão positivo para MPS II, indicando a presença de HS (heparan sulfato) e DS (dermatan sulfato). Fonte: LEIM/ICB/UFPA.

Apesar de poucas semanas de tratamento analisadas, foi possível verificar uma diminuição significativa da excreção de GAG de P3 após a 1ª infusão enzimática ( $p < 0,001$ ). O valor inicial de 12,41 mg/mmol CREA (antes da terapia) decaiu para 6,1 mg/mmol CREA na 5ª semana, o que corresponde

a uma diminuição de, aproximadamente, 66% em relação à dosagem inicial (Figura 10).

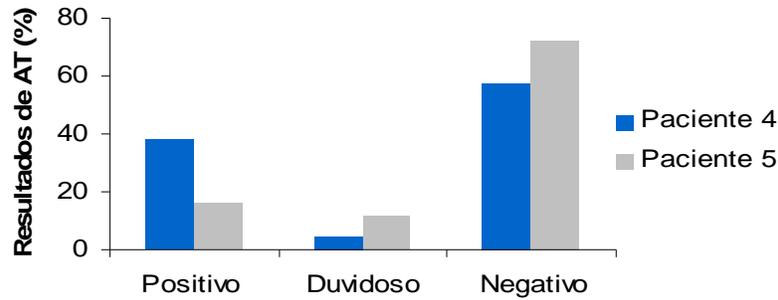


**Figura 10:** Valor da dosagem de GAG urinário de P3 (MPS II) antes da TRE e 5 semanas após o início da TRE comparados com os valores de referência para a faixa etária. (7 á 9 anos: 5,2 – 12 mg/mmol)

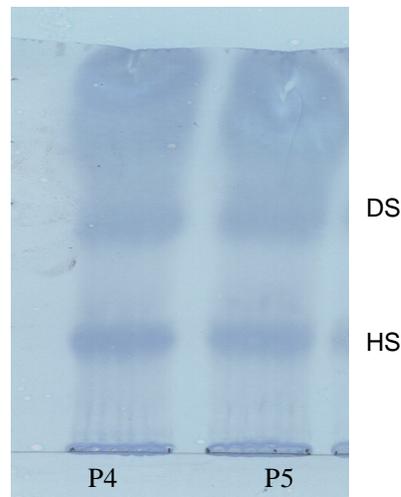
#### 4.4. RESULTADOS OBTIDOS PARA MPS VI (P4 E P5)

Os pacientes com MPS VI fizeram parte do estudo de HARMARTZ *et al.* (2004), onde foi relatada uma diminuição progressiva na excreção de GAGs (71% na 24<sup>o</sup> semana e 76% na 48<sup>o</sup>) em relação ao valores encontrados antes do início da terapia. As amostras analisadas no presente estudo foram obtidas a partir da 192<sup>o</sup> semana de tratamento.

No teste de AT foi observado, na maioria das amostras de ambas as pacientes padrão negativo (P4: 57%; P5: 72%), porém em P4 encontrou-se um número significativo de positivos comparado à P5 (P4: 38%; P5: 16%), evidenciando ainda, a presença de GAG (Figura 11). Na cromatografia, foram detectadas bandas correspondentes ao GAG dermatan sulfato e heparan sulfato nas urinas das mesmas, estando de acordo com o padrão de excreção de GAG em pacientes com MPS VI (Figura 12).

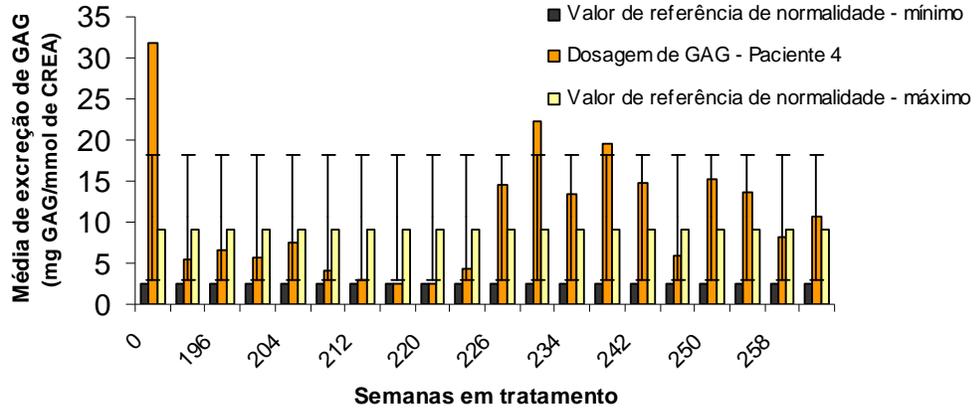


**Figura 11:** Resultados do Teste do Azul de Toluidina (AT) empregado na análise qualitativa da excreção de GAG urinários de P4 e P5 durante a TRE.

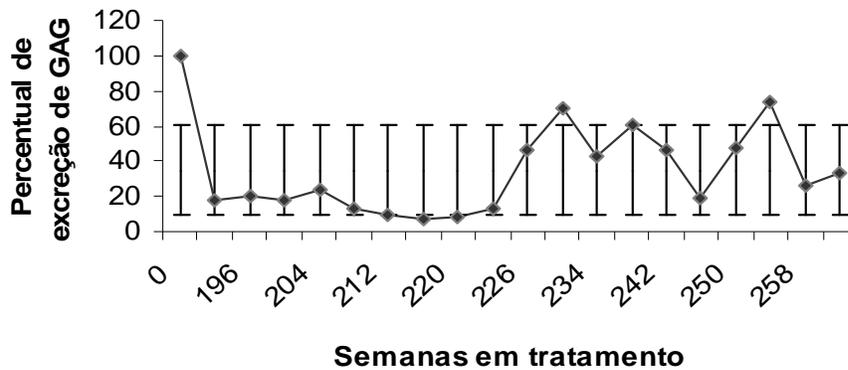


**Figura 12:** Cromatografia de GAGs de P4 e P5 evidenciando o padrão de bandas compatível a excreção de GAG em MPS VI. Fonte: LEIM – ICB/UFPA. DS: Dermatan Sulfato; HS: Heparan Sulfato.

A concentração de GAG urinário de P4 e P5 (MPS VI) também estava significativamente reduzida no período analisado em relação ao valor de antes do início da TRE (Figura 13 e 15). Em relação a P4, a dosagem inicial de 31,9 mg/mmol foi reduzida a 5,45 mg/mmol na 192<sup>o</sup> semana, representando uma redução de, aproximadamente, 82% ( $p < 0,01$ ). Esses valores permaneceram relativamente constantes até a 216<sup>a</sup> semana, quando foi observado um discreto aumento na concentração, porém não-significativo em relação à dosagem inicial (Figura 14).

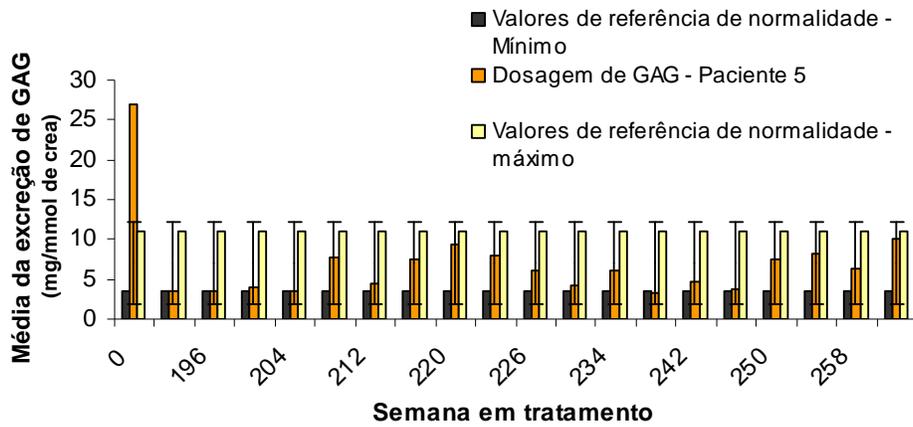


**Figura 13:** Valor da dosagem inicial de GAG urinários e valores médios da excreção urinária de GAG de P4 (MPS VI) a cada 4 semanas de TRE comparados com os valores de referência para a faixa etária ( 10 á 14 anos: 3,4 – 11 mg/mmol).

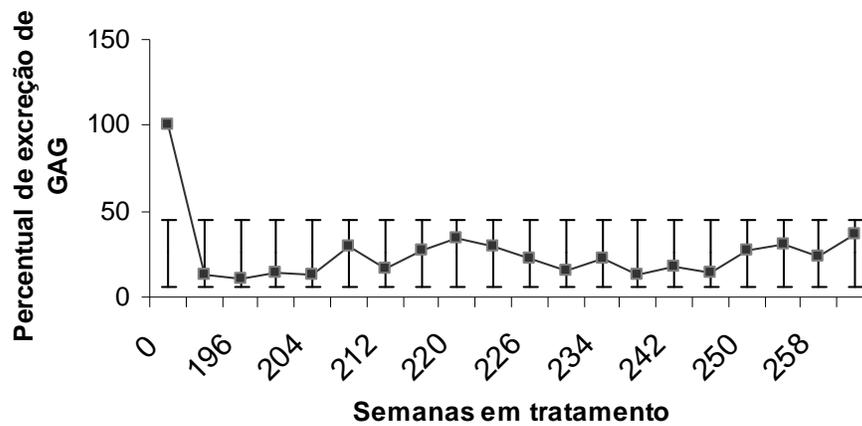


**Figura 14:** Porcentagem de excreção urinária de GAG de P4 (MPS VI) no intervalo de 4 semanas em relação aos valor de GAG urinários obtido antes do início da TRE.

Em relação a P5, foi observada uma taxa reduzida de excreção de GAG em direção ao limite aceitável de normalidade (Figura 15). O nível de GAG urinário antes do início da terapia era de 26,92 mg/mmol de CREA, havendo uma redução de aproximadamente 87% ( $p < 0,001$ ) nesta taxa desde o início da nossa análise (196ª semana). Esse nível manteve-se constante até a 216ª semana, quando foi observado um discreto aumento, seguido de uma redução e novamente de uma elevação, chegando ao final do período analisado com uma redução de 62% (Figura 16).



**Figura 15:** Valor da dosagem inicial de GAG urinários e valores médios da excreção urinária de GAG de P5 (MPS VI) a cada 4 semanas de TRE comparados com os valores de referência para a faixa etária ( 14 á 18 anos: 2,6 – 9 mg/mmol)



**Figura 16:** Porcentagem de excreção urinária de GAG de P5 (MPS VI) no intervalo de quatro semanas em relação aos valor de GAG urinários obtido antes do início da TRE.

## 5. DISCUSSÃO

A dosagem da excreção total de GAG na urina fornece forte evidência bioquímica de um efeito estável, dependendo da dose de TRE administrada nesses pacientes. A dose mais elevada de 1.0 mg/kg, como esperado, é mais eficaz do que doses mais baixas na diminuição da excreção urinária de GAG em pacientes com MPS (Harmartz *et al.*, 2004).

É importante ressaltar que apesar de todos os pacientes deste estudo terem mais de 5 anos e apresentarem a doença em estágio avançado, a TRE tem trazido benefícios à qualidade de vida destes pacientes. No entanto, é esperado que a TRE quando administrada precocemente evite a progressão da doença. Estudos utilizando modelo felino demonstram que quanto mais cedo for iniciado o tratamento, haverá um efeito mais profundo nas patologias esqueléticas (Crawley *et al.*, 1997), em que o tratamento prévio antes do aparecimento dos sintomas irreversíveis da doença maximizará os benefícios da terapia.

A terapia precoce depende da triagem eficiente em recém-nascidos e identificação de pacientes com risco de ter a doença. Programas para triagem de recém-nascidos tem sido propostos (MEIKLE *et al.*, 1999; Whitley *et al.*, 1989; 2002), mas ainda estão em desenvolvimento e não estão disponíveis para uso.

### 5.1 MONITORAMENTO DA EXCREÇÃO DE GAG

#### 5.1.1 Pacientes com MPS I em TRE

A redução de GAGs encontrada em P1 de 85% em 26 semanas e 97% em 52 semanas e de P2 em 74% na 26ª semana que até a 52ª semana se manteve constante, foi superior à descrita na literatura, que varia entre 54,1% e 59,7% em 26 semanas, mantêm-se 59,1% em 52 semanas e alcança patamares entre 69,1% e 88,4% em um estudo que durou seis anos (Sifuentes *et al.*, 2006; WRAITH *et al.*, 2004; 2007).

Em tais estudos, por outro lado, a quantidade de enzima por kg corpóreo aplicada por infusão foi menor – 0,58mg/kg, enquanto neste estudo aplicou-se 1mg/kg. Em pacientes que receberam 1,06mg/kg corpóreo, WRAITH *et al.* (2007) relataram em 52 semanas uma redução média de 67,7% - valor ainda inferior ao encontrado no presente estudo, mas superior ao encontrados no mesmo estudo com uma dosagem inferior da enzima.

Por outro lado, diferentemente do relatado na literatura (Sifuentes *et al.*, 2007; WRAITH *et al.*, 2004; 2007), a quantidade de GAGs excretada na urina dos pacientes continuou acima do patamar normal por um período maior do que o esperado. Para a faixa etária de P1 (19 anos), os valores de referência são entre 3,5 e 7 mg / mmol de creatinina; já para P2, entre 3,4 e 11 mg / mmol de creatinina (13 anos) (Fonte: Hospital de Clínicas de Porto Alegre).

Houve uma interrupção da TRE para P1 (MPS I) durante dois meses. Neste período foi observada uma pequena elevação dos níveis de GAG na 12ª semana após o início da TRE. No entanto, este incremento não foi significativo ( $p>0,01$ ) quando comparado com a última dosagem realizada na 4ª semana de tratamento. Foi também observada uma interrupção da TRE para P2 (MPS I) durante 10 meses, porém, também os valores encontrados de GAG não diferiram estatisticamente da última infusão ( $p>0,01$ ).

Tais resultados sugerem que a enzima recombinante apresenta atividade residual por um tempo ainda não conhecido. Na literatura há poucos artigos relatando efeitos da descontinuidade do tratamento. Anbu *et al.* (2006) relataram uma grande regressão clínica em uma paciente que teve a TRE suspensa após 80 semanas de tratamento. Neste caso, a interrupção foi por um período muito mais longo – 2 anos.

### **5.1.2 Paciente com MPS II em TRE**

A redução de GAGs encontrada em P3 de 66% em 5 semanas, foi superior à descrita na literatura de 49% após a 48 semanas (MUENZER *et al.*, 2006). Este mesmo trabalho relata uma redução na hepatoesplenomegalia

após 24 semanas, que está de acordo com observado em P3. No presente estudo, após 20 semanas de tratamento, foi observado melhora principalmente na mobilidade articular e redução da hepatoesplenomegalia. Porém com a longa interrupção do tratamento (cerca de 28 semanas) houve regressão dos sintomas.

### **5.1.3 Pacientes com MPS VI em TRE**

Como dito anteriormente as pacientes com MPS VI do nosso estudo fizeram parte do estudo de HARMARTZ *et al.* (2004) no início do tratamento, onde foi relatada uma diminuição progressiva na excreção de GAGs (71% na 24<sup>o</sup> semana e 76% na 48<sup>o</sup>) em relação ao valores encontrados antes do início da terapia. Nossos resultados demonstram que esses valores reduzidos mantiveram-se relativamente constantes como uma média de 71% em P4 e 86% em P5 até a 262<sup>o</sup> semana. A ausência de estudos dos efeitos da galsulfase na excreção de GAG a longo prazo torna os resultados aqui encontrados particularmente relevantes.

BYERS *et al.* (1998) relataram em estudos preliminares que a injeção de rhASB nas junções ósseas de gatos auxilia na preservação da cartilagem. O dado mais relevante desse estudo foi o achado de que essas injeções poderiam ser administradas em um curto intervalo de tempo, dando a esta terapia potencial de uso em humanos. Simonaro *et al.* (2001) descreveram a diminuição da liberação de óxido nítrico e de fatores de necrose tumoral em cultura de condrócitos das articulações de humanos com MPS VI, sugerindo que a TRE deve atuar reduzindo a inflamação ao redor das junções. No estudo de Harmartz *et al.* (2008) foi observada regressão nos sintomas referentes às junções com diminuição da dor e melhora na capacidade de movimento.

Nas pacientes desse estudo foi observada redução da hepatoesplenomegalia, melhora na mobilidade articular, redução da opacificação de córnea e da apnéia.

#### **5.1.4. Testes qualitativos para a detecção de GAG: Azul de Toluidina**

Na literatura há alguns dados sobre a confiabilidade do teste de azul de toluidina como de Pennock (1976) que relatou grande incidência de falsos negativos; já Goldenfum (1990) relatou menor incidência de falsos negativo quando comparado a outros testes, confirmando ser o mais sensível e específico na detecção de pacientes com MPS. Jong *et al.* (1991) observou grande incidência tanto de falsos negativos quanto de falsos positivos. Mabe *et al.* (2004) relataram grande grau de confiabilidade no teste.

No presente estudo, os resultados de AT foram coerentes com a redução de GAG observada na dosagem quantitativa, já que a maioria dos resultados nos pacientes aqui analisados foram negativos. Porém não foi possível traçar uma correlação entre o teste quantitativo (Dosagem de GAG) e qualitativo utilizado (AT)

#### **5.2 PERSPECTIVAS E CONSIDERAÇÕES FINAIS**

É importante frisar que o monitoramento da TRE através da dosagem de GAG ressalta a importância dos marcadores bioquímicos para a avaliação da eficácia da TRE. O monitoramento clínico dos pacientes com MPS submetidos à TRE, salientando a redução da progressão ou estadiamento desta doença de depósito lisossômico, representa um parâmetro muito mais significativo para a qualidade de vida dos pacientes.

A continuação do monitoramento dos GAG dos pacientes com MPS submetidos à TRE é muito relevante, uma vez que mensura as possíveis flutuações destes metabólitos urinários em função da interrupção do tratamento, visto que ainda não se sabe o quanto de atividade residual das enzimas recombinantes pode permanecer nas células, nem os mecanismos implícitos neste processo.

## **6. CONCLUSÕES**

### **6.1 EM RELAÇÃO À ANÁLISE QUALITATIVA (AZUL DE TOLUIDINA E CROMATOGRAFIA):**

#### **Pacientes com MPS I (P1 e P2)**

- § Na cromatografia de camada delgada observou-se o padrão de banda característico de pacientes com MPS I.
- § No teste de Azul de toluidina em amostras de pacientes com MPS I resultados negativos foram predominantes: 71% em P1 e 63% em P2.
- § Os resultados do teste qualitativo indicam que houve diminuição na excreção urinária de GAG após o início da TRE.

#### **Paciente com MPS II (P3)**

- § Na cromatografia de camada delgada observou-se o padrão de banda característico de pacientes com MPS II.
- § No teste de Azul de toluidina na amostra do paciente com MPS II mostrou-se positiva mesmo após o início da TRE.

#### **Pacientes com MPS VI (P4 e P5)**

- § Na cromatografia de camada delgada observou-se o padrão de banda característico de pacientes com MPS VI
- § No teste de Azul de toluidina em amostras de pacientes com MPS VI predominaram resultados negativos. P4: 57%; P5: 72%
- § Os resultados do teste qualitativo indicam que houve redução na excreção urinária de GAG após o início da TRE.

### **6.2 EM RELAÇÃO À ANÁLISE QUANTITATIVA (DOSAGEM URINÁRIA DE GAG):**

**MPS I:** A excreção de GAG reduziu em 90% após 100 semanas de TRE em P1. Em P2 a redução foi de 72% em 45 semanas de TRE.

**MPS II:** Em P3 houve redução de 66,6% da excreção de GAG até a 5ª semana de TRE.

**MPS VI :** Em P4 após 256 semanas de TRE a excreção de GAG reduziu em 67%, e 65% em P5.

Em conclusão nossos achados demonstram que com a TRE para MPS I, II e VI obtem-se melhora nos sintomas clínicos e bioquímicos, refletindo em melhora na qualidade de vida do paciente.

## 7. REFERÊNCIAS

AYRES, M; JUNIOR. MA; AYRES, DL; SANTOS AS. **BioEstat 5.0. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas.** Sociedade civil Mamirauá, Belém-PA. 2008

BECK M. Mucopolysaccharidosis and oligosaccharidosis, in: Fernandes J., Saudubay M, Van Der Bergh G. **Inborn Metabolic disease, diagnosis and treatment.** 3 ed. New York. Springer, p 415- 421. 2000

BECK M. New therapeutic options for lysosomal storage diseases: enzyme replacement . small molecules e gene therapy . **Human genetic.** 2006.

BRADY, R.O. Enzyme replacement for lysosomal diseases. **Annu. Rev. Med.** 57:283–96.2006.

BUIST, N.R. Set of simple side-room urine tests for detection of inborn errors of metabolism. **British Medical Journal**, 2:745-749. 1968.

BYERS, S; ROZAKLIS, T; BRUMFIELD, LK; RANIERI, E; HOPWOOD, JJ. Glycosaminoglycan accumulation and excretion in mucopolysaccharidosis: characterization and basis of the diagnostic test for MPS. **The Journal of Pediatrics** 65: 222-290. 1998.

CASTRO, N.S.S.; BENTES, E.S.; SOUZA, I.C.N.; GIUGLIANI, R.; SANTANA-DA-SILVA, L.C. Estimativa do perfil epidemiológico de mucopolissacaridoses no Estado do Pará. **Pediatria Moderna**, XLIII:23-28. 2007.

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

CRAWLEY JN, BELKNAP JK, COLLINS A, CRABBE JC, FRANKEL W, HENDERSON N, HITZEMANN RJ, MAXSON SC, MINER LL, SILVA AJ, WEHNER JM, WYNshaw- BORIS A, PAYLOR R. Behavioral phenotypes of inbred mousestrains: Implications and recommendations for molecular studies. **Psychopharmacology** 132:107-24. 1997.

COX-BRINKMAN J, BOELENs JJ., WRAITH JE, O'MEARA A, VEYS P, WIJIBURGS FA. Hematopoietic cell transplantations (HCT) in combination with enzyme replacement therapy (ERT) in patients with Hurler syndrome. Bone Marrow transplantation. 38:17-21, 2006.

DICK, T. **Praticas de bioquímica**. Porto Alegre, Instituto de Pesquisas Bioquímicas. 1970.

DIFERRANTE, N.M. The measurement of urinary mucopolysaccharides. **Analytical Biochemistry**, 21: 98-106. 1967.

ETO, Y. & OHASHI, T. Gene therapy/cell therapy for lysosomal storage Disease. **J. Inherit. Metab. Dis.** 23: 293-298.2000.

GIUGLIANI, R. Erros Inatos do Metabolismo: Uma Visão Panorâmica. **Pediatria Moderna**, 23 (1): 29-39, 1988.

GOLDENFUM, S.L. **Diagnóstico diferencial das mucopolissacarídeos: um estudo de 40 casos no Brasil**. Dissertação de mestrado em Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 1990.

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

HARMARTZ, P.; KETTERIDGE, D.; GIUGLIANI, R.; GUFFON, N.; TELES, E.L.; MIRANDA, M.C.S.; YU, Z.; SWIEDLER, S.J.; HOPWOOD, J.J. Direct comparison of measures of endurance, mobility, and joint function during enzyme-replacement therapy of Mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy Syndrome): results after 48 weeks in a phase 2 open-label clinical study of recombinant human N-acetylgalactosamine-4-sulfatase. **Pediatrics**, 115:681-689. 2008.

HUMBEL , R & CHAMOLES, N.A. Sequential thin layer chromatography of urinary acidic glycosaminoglycans. **Clinica Chimica Acta**, 40: 290-293. 1972.

KARAM SM, SCHWARTZ IV, GIUGLIANI R. *Introdução e aspectos clínicos dos erros inatos do metabolismo*. In: Carakushansky G. *Doenças Genéticas em Pediatria*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.155-158. 2001.

JONG, J. G. N.; HASSELMAN, J. J. F.; VAN LANDEGHEM, A. A. J.; VADER, H. L.; WEVERS, R. A. *The spot tests is not a reliable screening procedure for mucopolysaccharidosis*. *Clinical Chemistry*, v 37, p 572 – 575.1991.

LI, H.H.; YU, W.H.; ROZENGURT, N.; ZHAO, H.Z.; LYONS, K.M.; ANAGNOSTARAS, S.; FANSELOW, M.S.; SUZUKI, K.; VANIER, M.T.; NEUFELD, E.F. Mouse model of Sanfilippo syndrome type B produced by targeted disruption of the gene encoding  $\alpha$ -N-acetylglucosaminidase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 96(25):14505-14510, 1999.

LIPIELLO,L & MANKIN,H.J. Thin-layer chromatographic separation of the isomeric chondroitin sulfates, dermatan sulfate, and keratan sulfate. **Analytical Biochemistry**, 39: 54-58. 1971.

MABE, P.; VALIENTE, A.; SOTO, V.; CORNEJO, V.; RAIMANN, E. Evaluation of reability for urine mucopolysaccharidosis screening by

dimethylmethylene blue and Berry spot tests. **Clinica Chimica Acta**, v 345, p 135 – 140. 2004.

MATTE, US. **Caracterização molecular dos pacientes com mucopolissacaridose tipo I: um estudo no Brasil** [Dissertação de estrado]. Porto Alegre (RS). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998.

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

MUENZER, J. The mucopolysaccharidoses: a heterogeneous group of disorders with variable pediatric presentations. **The Journal of Pediatrics**, 144: 27-34. 2004.

MUENZER J, WRAITH, J. E.; BECK, M, GIUGLIANI, R.; HARMARTZ, P, ENG C. A phase II/III clinical study of enzyme replacement therapy with idursulfase in mucopolysaccharidosis II (Hunters's syndrome) **Genet Med.** 8 (8) : 465-73, 2006.

NEUFELD, EF. & MUENZER, J. In: **Metabolic and Molecular bases of inherited disease**. SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; *et al.*, eds. New York: McGraw Hill; 2001.

PENNOCK, C. A. A review and selection of simple laboratorial methods used for the study of the glycosaminoglycan excretion and the diagnosis of the mucopolysaccharidosis. **Journal of Clinical Pathology**, v 129, p 111 – 123, 1976.

PETERS C & STEWARD CG. Hematopoietic cell transplantation for inherited metabolic diseases: an overview of outcomes and practice guidelines . **Bone Marrow transplantation.** 31:229-239, 2003.

PRYDZ, K. & DALEN, K.T. Synthesis and sorting of proteoglycans. **J. Cell. Sci.** 113:193-205, 2000.

SAINZ CM, MUNOS CZ, MONTEAGUDO AGQ. Errores innatos del metabolismo: Enfermedades lisosomales. **Ver Cubana de Pediatr.** 74 (1) 68-16. 2002.

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

SIFUENTES, M; DOROSHOW, R; HOFT, R; MASON, G; WALOT, I; DIAMENT, M; OKASAKI, S; HUFF, K; COX, GF; SWIDLER, SJ; KAKKIS E. A follow-up study of MPS I patients treated with laronidase enzyme replacement therapy for 6 years. **Mol Gen. Metabolic**, 2006.

SIMONARO CM, HASKINS ME, SCHUCHMAN EH. Articular chondrocytes from animals with a dermatan sulfate storage disease undergo a high rate of apoptosis and release nitric oxide and inflammatory cytokines: a possible mechanism underlying degenerative joint disease in the mucopolysaccharidoses. **Lab Invest** 81:1319-28. 2001

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

SCHWARTZ, IV; MATTE, US; LEISTNER, S; GIUGLIANI, R. Mucopolissacaridoses. In: **Carakuschanki G. Doenças genéticas em pediatria**. 1<sup>o</sup> edição. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. p. 180-184. 2001.

SURESH, V & WRAITH, J. Clinical presentation and follow-up of patients with attenuated phenotype of mucopolysaccharidosis type I. **Acta Pediatric** 94: 872-877. 2005.

THOMAS, G.H. & HOWELL, R.R. Selected screening tests for genetic metabolic diseases. **Chicago, Year Book Medical Publishers Inc**, pag 36, 1973.

VIEIRA, T; SCHWARTZ, I; MUÑOZ, V. Mucopolysaccharidoses in Brazil: What Happens From Birth to Biochemical Diagnosis? **American Journal of Medical Genetics Part A** 146A: p. 1741–1747, 2008.

VOET, D; VOET, J.D; PRATT, C.W, **Fundamentos de bioquímica**. Porto Alegre. 2004.

VOGLER, C.; BARKER, J.; SANDS, M.S.; LEVY, B.; GALVIN, N.; SLY, W.S. Murine mucopolysaccharidosis VII: impact of therapies on the phenotype, clinical course, and pathology in a model of a lysosomal storage disease. **Pediatr. Dev. Pathol.** 4, 421–33, 2001

VOGLER, C; LEVY, B; GALVIN, N; LESSARD, M; SOPER, B; BARKER, J. Early onset of lysosomal storage disease in murine model of mucopolysaccharidosis type VII: undegraded substrate accumulates in many tissues in the fetus and very young MPS VII mouse. **Pediatr. Dev. Pathol.**, 8(4), 453-462, 2005.

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

WRAITH JE. The Mucopolysaccharidosis: A clinical review and guide to management. **Arch. Dis. Chil.** 75: 263 -267, 1995.

WRAITH, J. E.; CLARKE, L. A.; BECK, M.; KOLODNY, E. H.; PASTORES, G. M.; MUENZER, J.; RAPOPORT, D. M.; BERGER, K. I.; SWIEDLER, S. J.; KAKKIS, E. D.; BRAAKMAN, T.; CHADBOURNE, E.; WALTON-BOWEN, K.; COX, C.; COX, G. Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis I: a randomized, double-blinded, placebo-controlled, multinational study of recombinant human  $\alpha$ -L-iduronidase (laronidase). **The Journal of Pediatrics**, v 144, p 581 – 588, 2004.

WRAITH, J.E. & CLARKE,, C.P. The mucopolysaccharidosis: Diagnosis, molecular genetics and treatment. **Mol. Biol. Med.**, 7(5):381-404. 2006.

WRAITH, J. E.; BECK, M.; LANE, R.; VAN DER PLOEG, A.; SHAPIRO, E.; XUE, Y.; KAKKIS, E. D.; GUFFON, N. Enzyme replacement therapy in patients that are younger than 5 years: results of a multinational study of recombinant  $\alpha$ -l-iduronidase (laronidase). **Pediatrics**, v 120, p 37 – 46, 2007.

WILCOX WR. **Lysosomal storage disorders: the need for better pediatric recognition and comprehensive care.** *Jornal Pediatracs.* 144(5 Suppl):S3-14. Review.2004

WHITLEY CB, DRAPER KA, DUTTON CM, BROWN PA, SEVERSON SL, FRANCE LA. Diagnostic test for mucopolysaccharidosis II. Rapid quantification of glycosaminoglycan in urine samples collected on a paper matrix. **Clin Chem** 35:2074-81. 1989

WHITLEY CB, SPIELMAN RC, HERRO G, SEVERSON ST. Urinary glycosaminoglycan excretion quantified by an automated semimicro method in specimens conveniently transported from around the globe. **Mol Genet Metabol** 75:56-64. 2002

## 8. APÊNDICES OU ANEXOS

### Carta de aceite do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos



Universidade Federal do Pará

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS



Carta Provisória: 183/08 CEP-ICS/UFPA

Belém, 19 de novembro de 2008.

Ao:  
Prof. Dr. **Luiz Carlos Santana da Silva**

Senhor Pesquisador,

Temos a satisfação de informar que seu projeto de pesquisa “**Caracterização molecular e bioquímica de pacientes com mucopolissacaridose**” protocolo nº**172/08 CEP-ICS/UFPA**, foi apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, na reunião do dia 11 de novembro de 2008.

Assim, Vossa Senhoria tem o compromisso de entregar o relatório parcial do mesmo no dia 20 de janeiro de 2010, no CEP-ICS/UFPA, situado na Cidade Universitária Professor José da Silveira Netto - Guamá, Campus profissional, no Complexo de sala de aula do ICS – sala 13 (Altos).

Atenciosamente,

Prof. Dr. **Wallace Raimundo Araujo dos Santos**.  
Coordenador do CEP-ICS/UFPA

## **6.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

### **INFORMAÇÕES PARA OS PAIS OU RESPONSÁVEIS LEGAIS**

#### **TÍTULO DO ESTUDO: “CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E BIOQUÍMICA DE PACIENTES COM MUCOPOLISSACARIDOSES”**

**O QUE SÃO MUCOPOLISSACARIDOSES:** Mucopolissacaridoses são doenças genéticas raras, causadas pela ausência ou insuficiência de enzimas responsáveis pela quebra dos mucopolissacarídeos. Também são conhecidas por: MPS, Síndrome de Hurler (MPS-IH), Síndrome de Scheie (MPS-IS), Síndrome de Hurler-Scheie (MPS-IHS), Síndrome de Hunter (MPS-II), Síndrome de Sanfilippo (MPS-III), Síndrome de Morquio (MPS-IV), Síndrome de Maroteaux-Lamy (MPS-VI) e Síndrome de Sly (MPS-VII). Os mucopolissacarídeos - atualmente denominados GAGs ou glicosaminoglicanos - não são corretamente processados nem eliminados pelo organismo. O acúmulo dessas substâncias causa distúrbios, incluindo o progressivo mau funcionamento físico e/ou mental. Os sintomas podem aparecer nos primeiros meses de vida ou demorar alguns anos, a medida em que mais e mais células são danificadas.

**QUAIS AS CONSEQUÊNCIAS DESSA DOENÇA?:** Uma das características de muitas dessas síndromes pode ser observada nas mãos que ficam com dedos "encurvados" para dentro e "grossos". São freqüentes algumas alterações no rosto, enrijecimento das articulações, dificuldades respiratórias e cardíacas, alterações no crescimento, deformações ósseas, aumento do fígado e baço e das mucosas em geral. Deficiência visual, auditiva e retardamento mental também podem ocorrer.

**COMO O MÉDICO FAZ O DIAGNÓSTICO?:** O diagnóstico para MPS é realizado através de uma triagem inicial na urina do paciente. Caso a triagem detecte alterações indicativas de uma excreção excessiva de GAG (característico em pacientes com MPS), testes mais específicos (ex.: dosagem

enzimática em leucócitos do sangue periférico) são realizados para confirmação do diagnóstico.

**COMO SE TRATA?:** A Terapia de Reposição Enzimática (TER) consiste no principal tratamento para pacientes com MPS. O tratamento, entretanto, só está disponível atualmente apenas para alguns tipos de MPS (MPS I, II e VI). O procedimento terapêutico consiste na administração semanal de uma enzima recombinante intravenosamente. Esta enzima irá atuar de forma semelhante à enzima deficiente, causando uma melhora significativa do quadro clínico geral do paciente, apesar da enzima recombinante não possuir efeito na reversão de quadros com comprometimento ósseo e/ou neurológico. O controle do tratamento consiste na medida semanal dos níveis de GAG na urina do paciente em tratamento.

**POR QUE ESTE ESTUDO ESTÁ SENDO REALIZADO?:** O objetivo desse estudo é identificar a causa genética (mutações – alterações no DNA) e sua possível correlação com os sintomas clínicos apresentados pelos pacientes com MPS.

**COMO E ONDE ESTE ESTUDO SERÁ REALIZADO?:** Deverão participar deste estudo pacientes do Estado do Pará. Os pacientes selecionados serão solicitados a fornecer informações sobre sua história médica. Se você permitir, estas informações poderão ser obtidas através do seu médico ou de registros médicos hospitalares. O seguinte procedimento será realizado: **Coleta de sangue** (5 a 10mL) e **Coleta de urinas** (30 mL): O material coletado será processado e analisado no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo da UFPA.

**QUAIS OS RISCOS DESTE ESTUDO?** A coleta de sangue poderá causar um desconforto temporário por causa da picada de agulha, hematoma e raramente, infecção. Às vezes, uma pessoa pode ficar tonta ou desmaiar quando o sangue for coletado.

**QUAIS SÃO OS BENEFÍCIOS DESTE ESTUDO?:** Como esse diagnóstico, poderá ser possível estabelecer correlação com a gravidade da doença. Além disso, para as famílias interessadas, este estudo pode ser oferecido para

encontrar pessoas portadoras da mutação, ou seja, identificar pessoas da mesma família que têm o risco de ter um filho com MPS.

**POSSO RECUSAR A PARTICIPAÇÃO?** Seu filho não é obrigado a participar deste estudo. A sua participação neste estudo é voluntária. A recusa em participar não terá conseqüências para os seus cuidados presentes e futuros. Seu filho poderá se retirar do estudo a qualquer momento.

**TENHO QUE PAGAR PARA PARTICIPAR?** Não há nenhum custo para participar dessa pesquisa. Seu filho não será pago para participar deste estudo.

**E SE EU / MEU FILHO FOR PREJUDICADO?:** O Dr. Luiz Carlos Santana da Silva deverá ser notificado se você suspeitar que seu filho foi prejudicado por estar no estudo.

**AS INFORMAÇÕES SOBRE MEU FILHO SE TORNARÃO PÚBLICAS?** A identidade de seu filho e outras informações pessoais obtidas neste estudo serão confidenciais. Informações científicas e médicas obtidas neste estudo, das quais a identidade de seu filho não poderá ser revelada, deverão ser apresentadas em encontros e publicadas a fim de tornar as informações obtidas neste estudo de benefício para os outros.

**COM QUEM POSSO TIRAR DÚVIDAS?:** Você está livre para fazer perguntas sobre este estudo. Quando você tiver dúvidas relacionadas a este estudo, poderá falar com: Dr. Luiz Carlos Santana da Silva e/ou Mestrando Gustavo Monteiro Viana.

Lab. Erros Inatos do Metabolismo, Instituto de Ciências Biológicas. UFPA. Av. Augusto Correa, S/N, Guamá, CEP. 666075900 Belém-Pa. Fone: 32018030; e-mail: lcass@ufpa.br

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PACIENTE)

Eu \_\_\_\_\_ manifesto meu consentimento com envolvimento do meu(minha) filho(a) no projeto de pesquisa intitulado: “CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E BIOQUÍMICA DE PACIENTES COM MUCOPOLISSACARIDOSES”.

1. A natureza e objetivo do projeto de pesquisa, descritos na folha de informação em anexo, foram explicadas a mim. Eu compreendo e concordo em participar.
2. Eu compreendo que meu (minha) filho (a) poderá não ter benefício direto por participar do estudo
3. Eu entendo que os possíveis riscos e/ou efeitos adversos, desconforto e inconveniências, como foi destacado na folha de informações, foram explicadas a mim.
4. Eu compreendo que, apesar das informações obtidas no estudo poderem ser publicadas, elas serão confidenciais e meu (minha) filho(a) não será identificado(a) a partir delas.
5. Eu compreendo que posso retirar meu (minha) filho(a) do estudo em qualquer etapa e que isto não irá afetar os cuidados médicos ou quaisquer outros aspectos da relação recebidos a ele(a).
6. Eu compreendo que não haverá pagamento para meu(minha) filho(a) por participar deste estudo.
7. Eu tive a oportunidade de discutir a participação de meu(minha) filho(a) neste projeto de pesquisa com um membro da família ou amigo e/ou tive a oportunidade de ter um membro da família ou amigo presente enquanto o projeto de pesquisa estava sendo explicado pelo pesquisador.

8. Eu estou ciente de que devo guardar uma cópia do Termo de Consentimento, quando completo, e da folha de Informações.
9. Eu concordo que o material (sangue e urina) coletado de meu(minha) filho(a) seja utilizado no projeto acima.

Assinatura do Responsável: \_\_\_\_\_

Relação de parentesco com o paciente: \_\_\_\_\_

Nome completo do paciente: \_\_\_\_\_

Data: \_\_ / \_\_ / \_\_

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO  
(FAMILIAR DO PACIENTE)

Eu \_\_\_\_\_ manifesto meu consentimento em participar do projeto de pesquisa intitulado: "CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E BIOQUÍMICA DE PACIENTES COM MUCOPOLISSACARIDOSES".

1. A natureza e objetivo do projeto de pesquisa, descritos na folha de informação em anexo, foram explicadas a mim. Eu compreendo e concordo em participar.
2. Eu compreendo que poderei não ter benefício direto por participar do estudo.
3. Eu entendo que os possíveis riscos e/ou efeitos adversos, desconforto e inconveniências, como foi destacado na folha de informações, foram explicadas a mim.
4. Eu compreendo que, apesar das informações obtidas no estudo poderem ser publicadas, elas serão confidenciais e eu não serei identificado(a) a partir delas.
5. Eu compreendo que posso me retirar do estudo em qualquer etapa e que isto não irá afetar os cuidados médicos ou quaisquer outros aspectos da relação recebidos.
6. Eu compreendo que não haverá pagamento em nenhuma espécie por participar deste estudo.
7. Eu tive a oportunidade de discutir a minha participação neste projeto de pesquisa com um membro da família ou amigo e/ou tive a oportunidade de ter

um membro da família ou amigo presente enquanto o projeto de pesquisa estava sendo explicado pelo pesquisador.

8. Eu estou ciente de que devo guardar uma cópia do Termo de Consentimento, quando completo, e da folha de Informações.

9. Eu concordo com a utilização do meu material biológico (sangue) como amostra do projeto acima citado.

Assinatura do Participante: \_\_\_\_\_

Nome do paciente do qual possui parentesco: \_\_\_\_\_

Grau de parentesco: \_\_\_\_\_

Data: \_\_ / \_\_ / \_\_