

Mucopolissacaridoses em população pediátrica: resultados de uma abordagem precoce no âmbito do projeto FIND

Mucopolysaccharidosis in the pediatric population: results of an early diagnosis approach in the scope of the FIND project

Paulo Gaspar¹, Raquel Neiva¹, Lisbeth Silva¹, Luísa Diogo², Ana Cristina Ferreira³, Ana M Miranda⁴, Diana Antunes⁵, Pedro Louro^{2,6}, Sara Ribeiro², Sara Oliveira², Paula Garcia⁷, Esmeralda Rodrigues⁸, Teresa Campos⁸, Carmen Silva⁸, Patricia Janeiro⁹, Sérgio Sousa², Altina Lopes¹, Célia Nogueira¹, Cristina Pereira¹, Sandra Alves¹⁰, Elisa Leão Teles⁸, Laura Vilarinho^{1,10}

paulo.gaspar@insa.min-saude.pt

(1) Unidade de Rastreo Neonatal, Metabolismo e Genética. Departamento de Genética Humana. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa Portugal

(2) Centro de Referência das Doenças Hereditárias do Metabolismo. Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal

(3) Centro de Referência das Doenças Hereditárias do Metabolismo. Centro Hospitalar Universitário de Lisboa Central, Lisboa, Portugal

(4) Departamento de Pediatria, Hospital Prof. Doutor Fernando Fonseca, Amadora, Portugal

(5) Departamento de Genética. Hospital de Dona Estefânia, Centro Hospitalar de Lisboa Central, Lisboa, Portugal

(6) Clínica de Risco de Cancro Familiar. Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil, Lisboa, Portugal

(7) Departamento de Genética. Centro Materno-Infantil do Norte, Centro Hospitalar Universitário do Porto, Porto, Portugal

(8) Centro de Referência das Doenças Hereditárias do Metabolismo, Hospital de São João, Porto, Portugal

(9) Centro de Referência das Doenças Hereditárias do Metabolismo. Hospital Santa Maria, Centro Hospitalar de Lisboa Norte, Lisboa, Portugal

(10) Unidade de Investigação e Desenvolvimento. Departamento de Genética, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

_Resumo

As Mucopolissacaridoses (MPSs), constituem um subgrupo das Doenças Lisossomais de Sobrecarga, causadas por deficiências em enzimas lisossomais, que catalisam a degradação dos glicosaminoglicanos. As MPSs têm apresentação multissistémica, heterogénea e consequentemente de diagnóstico difícil. O projeto FIND tem como objetivo alertar os clínicos para sinais e sintomas de risco ao mesmo tempo que disponibiliza uma ferramenta de diagnóstico.

Este estudo pretende descrever uma abordagem desenvolvida no âmbito do projeto FIND para identificar doentes com mucopolissacaridoses (MPSs) em idade pediátrica, antes do aparecimento dos sintomas mais graves. A identificação atempada permitirá uma intervenção terapêutica precoce, assim como oferecer aconselhamento genético às famílias afetadas.

O projeto FIND permitiu a identificação de 12 doentes de MPSs e a sua referenciação para os respetivos centros de tratamento.

Este estudo, para além da sua vertente educativa, coloca à disposição dos clínicos um ótimo meio para a identificação e caracterização de casos sintomáticos de MPS em idade pediátrica.

_Abstract

Mucopolysaccharidoses are a subgroup of Lysosomal Storage Disorders characterized by the accumulation of glycosaminoglycans in cells, tissues, and organs due to specific enzyme deficiencies. In early disease stages, diagnosis can be postponed for years or even missed in late onset forms. This study aims to describe an approach developed within the scope of the FIND project to identify patients with mucopolysaccharidoses (MPSs) at a pediatric age, before the appearance of the most severe symptoms,

allowing early therapeutic intervention, as well as offering genetic counseling to affected families.

The FIND project was designed to claim awareness to the red flags of MPS at pediatric age and to provide a tool for physicians to diagnose these pathologies, since most of them are amenable to enzyme replacement therapy. The clinical suspicion was addressed by performing seven distinct enzymatic assays in dried blood spots. In the cases of a deficiency, the quantification and identification of the glycosaminoglycans were performed and the genetic study carried out.

In the first eight years of the project, we have identified twelve patients among the 385 samples received. FIND project allows an early identification and characterization of symptomatic MPSs patient, as well as other related pathologies at pediatric age.

_Introdução

As Mucopolissacaridoses (MPSs) são um sub-grupo das Doenças Lisossomais de Sobrecarga (DLs), onde ocorre a acumulação de glicosaminoglicanos (conhecidos como GAGs ou mucopolissacarídeos). Os GAGs são uma família de glicoconjugados que incluem o sulfato de dermatano, sulfato de queratano, sulfato de heparano, sulfato de condroitina e o ácido hialurónico. Cada MPS é caracterizada por uma acumulação específica de GAGs, dependendo da deficiência enzimática presente, conduzindo consequente-

mente a diferentes fenótipos (1,2). Todas as MPSs são de transmissão autossómica recessiva, com exceção da MPS II, que é ligada ao cromossoma X. Estas patologias são crónicas, progressivas e multissistémicas, com diferentes graus de gravidade e evolução. O largo espectro de apresentações clínicas, torna o diagnóstico difícil e complexo, podendo conduzir a um diagnóstico tardio, especialmente em doentes com formas mais leves. Mesmo nos doentes com comprometimento cognitivo grave o seu diagnóstico pode ocorrer até 18 meses após o início dos sintomas, período durante o qual se podem registar alterações irreversíveis nos órgãos (1,3-5). Cimaz, *et al.* afirmaram que apenas 20% das formas leves de MPS I são diagnosticadas corretamente, levando a intervenções tardias e ao surgimento de sintomas deletérios (6). As principais características das MPSs são a baixa estatura, organomegalia, infecções respiratórias recorrentes, hérnias, fácies grosseiros, alterações ósseas e atraso no desenvolvimento psicomotor (1). O tratamento das MPS envolve uma abordagem multidisciplinar, com o objetivo de atenuar os sintomas e melhorar a qualidade de vida dos doentes. Isso pode incluir terapias de substituição enzimática (TSE), tratamento cirúrgico para corrigir complicações ortopédicas e uma intervenção especializada para problemas respiratórios e cardíacos. A TSE encontra-se disponível para a maioria destas doenças. O transplante de células-tronco hematopoéticas também é uma opção para doentes de MPS I com forma grave, antes dos 2 anos (7-9). Avanços significativos têm sido feitos na pesquisa e desenvolvimento de novos tratamentos, como a terapia génica, que poderão melhorar o prognóstico e qualidade de vida dos doentes com MPSs. O tratamento precoce pode retardar significativamente ou prevenir o início dos principais sinais clínicos, modificando substancialmente a história natural da doença, especialmente nas formas atenuadas (10). A colaboração entre diferentes especialidades médicas, cuidadores e doentes é crucial para garantir uma intervenção eficaz da doença. Por conseguinte, a educação contínua e a partilha de conhecimentos entre profissionais de saúde são essenciais para melhorar os resultados e a qualidade de vida dos doentes com MPSs (11).

O projeto FIND, resultante de uma parceria entre a Secção de Doenças Hereditárias do Metabolismo da Sociedade Portuguesa de Pediatria (SDHM-SPP) e o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), foi iniciado com o intuito de realizar um diagnóstico atempado, podendo melhorar o prognóstico destes doentes, especialmente quando opções terapêuticas estão disponíveis. O projeto tem como objetivos principais: a divulgação dos sinais de alerta que permitam equacionar o diagnóstico das MPSs e a disponibilização de uma ferramenta que possibilite o estudo e diagnóstico deste grupo de patologias o mais precocemente possível.

_Objetivos

Este estudo pretende descrever uma abordagem desenvolvida no âmbito do projeto FIND para identificar doentes com mucopolissacaridoses (MPSs). Visa, por um lado, chamar a atenção para os principais sintomas deste grupo de patologias e, por outro, conduzir à sua identificação precoce.

_Métodos

Formação de profissionais de saúde

Devido à sobreposição dos sintomas de MPS com patologias mais comuns, o projeto FIND foi lançado para aumentar a consciencialização das MPSs entre as diversas especialidades médicas. Foi distribuído um folheto informativo (figura 1) em todos os hospitais gerais e divulgação em reuniões científicas, *workshops*, versando fundamentalmente a área pediátrica. Foi igualmente criado um site informativo (<http://projetofind.pt/>)

Colheita de amostras

Paralelamente, o projeto também disponibilizou um ensaio fácil e rápido que permite o diagnóstico precoce destas patologias. Em caso de suspeita de MPSs, o clínico poderá solicitar um *kit* de diagnóstico, enviando um *email* para projecto.find@gmail.com, fornecendo o nome e endereço para entrega dos *kits*. Após a colheita de sangue, as amostras de sangue seco (DBS) foram enviadas através de um envelope

pré-pago, endereçado à Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética, Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Porto, onde os testes enzimáticos destas patologias foram realizados.

Ensaio enzimáticos

Sete ensaios enzimáticos foram realizados em DBS (tabela 1), com recurso a substratos fluorescentes específicos, para cada uma das MPSs. A fluorescência foi medida (ex345nm; em 460nm) e os resultados foram obtidos com recurso a uma curva de calibração de 4-metilumbeliferona e expressos em nmol/h/spot (12,13).

Determinação de GAGs

Os GAGs foram determinados na primeira urina da manhã ou em urina ocasional, de acordo com o protocolo descrito em Withman, *et al.* (14).

Estudo molecular

Nas amostras em que uma atividade enzimática reduzida foi identificada, prosseguiu-se com o estudo molecular do respectivo gene codificante.

Figura 1: Folheto informativo sobre as MPS no âmbito do projeto FIND.



Tabela 1: Deficiência enzimáticas e GAGs excretados nas Mucopolissacaridoses

Mucopolissacaridose	Doença	Gene	Deficiência Enzimática	Glicosaminoglicanos excretados
MPS I	Hurler, Scheie, Hurler\Scheie	IDUA	α -iduronase	SD/SH
MPS II	Hunter	IDS	Iduronato-2-sulfatase	SD/SH
MPS III B	Sanfillippo B	NAGLU	N-acetyl- α -D-glucosaminidase	SH
MPS IV	Morquio A	GALNS	Galactose-6-sulfatase	SK/SC
	Morquio B	GLB1	β -galactosidase	SK
MPS VI	Maroteaux-Lamy	ARSB	Arilsulfatase B	SD
MPS VII	Sly	GUSB	β -glucuronidase	SD/SH/SC

SD – sulfato de dermatano; SK – sulfato de queratano; SH – sulfato de heparano; SC – sulfato de condroitina

_Resultados

Dos 419 kits solicitados em todo o país, recebemos 385 amostras. Todas as amostras foram acompanhadas por uma breve história clínica e uma requisição médica. A média de idade dos doentes foi de 5,4 anos e a mediana foi de 3,2 anos. Os principais sintomas que levaram os pediatras a suspeitar de MPSs estão representados no **gráfico 1**. Na maioria dos doentes, foram observados dois a três sintomas, sendo a fâcies grosseira (24%) e o envolvimento cognitivo (19%) os mais frequentes. Os sintomas menos frequentes foram a opacidade corneana, a perda auditiva e o síndrome do túnel cárpico.

Foram determinadas as sete atividades enzimáticas, descriminadas na **tabela 1**, apresentando 90% das amostras rececionadas, resultados dentro dos valores de referência. Nas restantes amostras, uma ou mais atividades enzimáticas estavam alteradas em comparação com os valores de referência. Nesses casos, novas amostras de sangue total, colhidas em heparina de lítio, foram solicitadas para confirmar ou excluir a deficiência enzimática identificada. Após a confirmação da deficiência enzimática leucocitária, foi realizado o respetivo estudo molecular e quando possível a análise dos GAGs. Nas 385 amostras analisadas, identificamos 12 doentes (**tabela 2**). Este estudo permitiu a identificação de 5 doentes de MPS I, 1 doente de MPS II, 2 doentes de MPS IIIB, 1 doente de MPS IVA, 2 doentes de GM1 e 1 doente de MPS VI.

Gráfico 1: ▾ Dados fenotípicos relativos às MPSs observados na população em estudo (n de amostras=385).

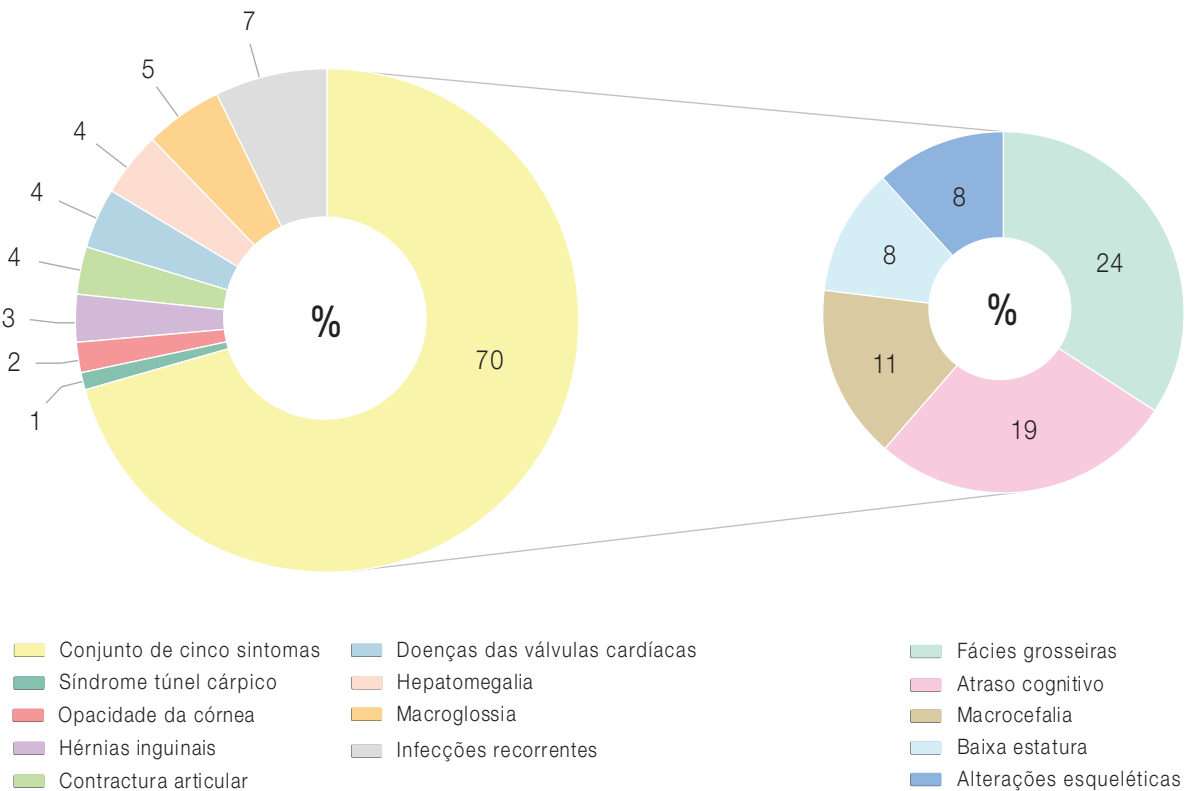


Tabela 2 : Breve descrição dos 12 casos de MPSs identificados neste estudo.

	Doença	Gene	Enzima deficiente	Idade ao diagnóstico	Atividade enzimática em DBS (nmo/h/spot)	GAGs (mg/mmol creat)	Estudo molecular
D1	MPS I	<i>IDUA</i>	α -iduronidase	2 anos	0.01 (VR: 0.1 – 0.9)	N.D.	p.W402X./p.P533R
D2	MPS I	<i>IDUA</i>	α -iduronidase	2 anos	0.01 (VR: 0.1 – 0.9)	56 (VR: 6.0 – 22.0)	p.W402X./p.P533R
D3	MPS II	<i>IDS</i>	Iduronate-2-sulfatase	3 anos	0.01 (VR: 0.1 – 0.9)	79 (VR: 9.0 – 20.0)	GAATC> AGAGG (IDSP1> IDS)+
D4	glangliosidosis GM1	<i>GLB1</i>	β -galactosidase	10 meses	0.09 (VR: 2.0 – 7.0)	104 (VR: 4.0 – 31.0)	c.588-89insT/ p.W527X
D5	glangliosidosis GM1	<i>GLB1</i>	β -galactosidase	10 anos	0.05 (VR: 0.2 – 7.0)	11 (VR: 4.0 – 11.0)	p.R201H/ c.1572_1577insG
D6	MPS I	<i>IDUA</i>	α -iduronidase	3 anos	0.01 (VR: 0.1 – 0.9)	107 (VR: 6.0 – 16.0)	c.144-146delT (R48del)/p.W402X
D7	MPS I	<i>IDUA</i>	α -iduronidase	6 anos	0.01 (VR: 0.1 – 0.9)	88 (VR: 4.0 – 11.0)	p.P533R/p.P533R
D8	MPS I	<i>IDUA</i>	α -iduronidase	2 anos	0.01 (VR: 0.1 – 0.9)	46,5 (VR: 6.0 – 22.0)	p.P533R/p.P533R
D9	MPS IIIB	<i>NAGLU</i>	N-acetyl- α -D-glucosaminidase	4 anos	0.01 (VR: 0.1 – 0.6)	25 (VR: 6.0 – 22.0)	p.N435T/p.R643C
D10	MPS VI	<i>ARSB</i>	Ariisulfatase B	2 anos	0.02 (VR: 0.1 – 0.5)	N.D.	p.D53G/p.L72R
D11	MPS IIIB	<i>NAGLU</i>	N-acetyl- α -D-glucosaminidase	9 anos	0.01 (VR: 0.1 – 0.9)	N.D.	p.Gln662*/p.Gln662*
D12	MPS IVA	<i>GALNS</i>	Galactose-6-sulfatase	N.D.	0.01 (VR: 0.02 – 0.20)	N.D.	p.A291T/ p.A291T

D - Doente; VR - Valores de Referência; N.D. - Não disponível; + - troca entre o pseudogene e o gene; * - codão stop

Discussão

Este estudo, assim como um similar a decorrer em Espanha, tem uma parte educacional, com ênfase nos principais sinais de alerta de um grupo de doenças raras, que afetam 4,8 em 100.000 pessoas, que por vezes passam despercebidos ou são erroneamente diagnosticados como outra patologia, devido ao seu envolvimento multissistémico (15,16).

Por outro lado, o projeto FIND, devido à forma fácil e económica de obter uma amostra para análise, associada à baixa quantidade de amostra de sangue necessária para realizar um ensaio enzimático, disponibiliza aos médicos uma ferramenta para caracterizar doentes pediátricos com sintomas de MPS. Devido à sua estabilidade, a colheita de sangue em papel filtro pode ser enviada por correio normal, sem a necessidade de transporte especial, permitindo estudos de populações de alto risco, o que não é possível com um tubo de sangue total.

Este estudo permite simultaneamente o diagnóstico de um grupo de patologias que compartilham muitas características clínicas em idade pediátrica. Nesta população pediátrica de alto risco, temos uma incidência de MPSs de 1 em 32 doentes estudados. Em 60% dos doentes identificados, a idade média de diagnóstico foi de 3 anos, o que é inferior em comparação com a idade média de diagnóstico para MPSs descrita por Pinto, *et al.* (17).

Este estudo revela, para além da eficácia desta abordagem, que foi bem-sucedido também na parte educacional para este grupo de doenças. Por outro lado, ao comparar o estudo com projetos similares, que basicamente diagnosticam MPSs e mucopolisacarídeos, medindo a quantidade de armazenamento de GAGs, o nosso estudo tem a possibilidade de disponibilizar um diagnóstico diferencial, como gangliosidoses tipo 1, deficiência múltipla de sulfatases e também galactosialidoses (7,8,18,19).

_Conclusão

O projeto FIND permitiu a identificação de 12 doentes com mucopolissacaridoses (MPSs) e a sua referenciação para os respetivos centros de tratamento.

Este estudo revela a eficácia e utilidade da abordagem diferenciada do projeto FIND. Para além da sua vertente educativa, coloca à disposição dos clínicos um ótimo meio para a identificação e caracterização de casos sintomáticos de MPS em idade pediátrica.

Uma intervenção terapêutica precoce, evita o aparecimento de sintomas mais graves.

Referências bibliográficas:

- (1) Neufeld EF, Muenzer J. The mucopolysaccharidoses. IN: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al. (eds). The metabolic and molecular bases of inherited disease, 8th ed. New York: McGrawHill, 2001, pp. 3421-53. <https://doi.org/10.1036/ommbid.165>
- (2) Coutinho MF, Lacerda L, Alves S. Glycosaminoglycan storage disorders: a review. *Biochem Res Int.* 2012;2012:471325. <https://doi.org/10.1155/2012/471325>
- (3) Caciotti A, Garman SC, Rivera-Colón Y, et al. GM1 gangliosidosis and Morquio B disease: an update on genetic alterations and clinical findings. *Biochim Biophys Acta.* 2011 Jul;1812(7):782-90. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.03.018>
- (4) Muenzer J. Overview of the mucopolysaccharidoses. *Rheumatology (Oxford).* 2011 Dec;50(Suppl 5):v4-12. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/ker394>. Review.
- (5) Lei HL, Ye J, Qiu WJ, et al. Beta-galactosidase deficiencies and novel GLB1 mutations in three Chinese patients with Morquio B disease or GM1 gangliosidosis. *World J Pediatr.* 2012 Nov;8(4):359-62. <https://doi.org/10.1007/s12519-012-0382-0>.
- (6) Cimaz R, Vijay S, Haase C, et al. Attenuated type I mucopolysaccharidosis in the differential diagnosis of juvenile idiopathic arthritis: a series of 13 patients with Scheie syndrome. *Clin Exp Rheumatol.* 2006 Mar-Apr;24(2):196-202. <https://www.clinexprheumatol.org/abstract.asp?a=2821>
- (7) Giugliani R, Ramaswami U, Tylki-Szymańska A, et al. The mucopolysaccharidoses. IN: Metha AB, Winchester B (eds). *Lysosomal Storage Disorders – A Practical Guide.* Chichester, West Sussex: Wiley-Blackwell, 2012, pp. 94-100. <https://doi.org/10.1002/9781119697312.ch16>
- (8) Giugliani R, Federhen A, Vairo F, et al. Emerging drugs for the treatment of mucopolysaccharidoses. *Expert Opin Emerg Drugs.* 2016;21(1):9-26. <https://doi.org/10.1517/14728214.2016.1123690>
- (9) de Ru MH, Boelens JJ, Das AM, et al. Enzyme replacement therapy and/or hematopoietic stem cell transplantation at diagnosis in patients with mucopolysaccharidosis type I: results of a European consensus procedure. *Orphanet J Rare Dis.* 2011 Aug 10;6:55. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-6-55>
- (10) Laraway S, Breen C, Mercer J, et al. Does early use of enzyme replacement therapy alter the natural history of mucopolysaccharidosis I? Experience in three siblings. *Mol Genet Metab.* 2013 Jul;109(3):315-6. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2013.04.023>
- (11) Somanadhan S, Larkin PJ. Parents' experiences of living with, and caring for children, adolescents and young adults with Mucopolysaccharidosis (MPS). *Orphanet J Rare Dis.* 2016 Oct 10;11(1):138. <https://doi.org/10.1186/s13023-016-0521-0>
- (12) Chamoles NA, Blanco MB, Gaggioli D, et al. Hurler-like phenotype: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. *Clin Chem.* 2001 Dec;47(12):2098-102. <https://doi.org/10.1093/clinchem/47.12.2098>
- (13) Civaliero G, Michelin K, de Mari J, et al. Twelve different enzyme assays on dried-blood filter paper samples for detection of patients with selected inherited lysosomal storage diseases. *Clin Chim Acta.* 2006 Oct;372(1-2):98-102. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2006.03.029>
- (14) Whiteman P. The quantitative determination of glycosaminoglycans in urine with Alcian Blue 8GX. *Biochem J.* 1973 Feb;131(2):351-7. <https://doi.org/10.1042/bj1310351>
- (15) Colón Mejeras C, Álvarez González JV, Couce Pico ML. Proyecto FIND. Resultados del primer año de trabajo en la detección precoz de las mucopolisacaridoses. *Acta Pediatr Esp.* 2015;73(10): 265-67. <https://www.actapediatrica.com/index.php/secciones/originales/1176-proyecto-find-resultados-del-primer-ano-de-trabajo-en-la-deteccion-precoz-de-las-mucopolisacaridoses>
- (16) Colón C, Alvarez JV, Castaño C, et al. A selective screening program for the early detection of mucopolysaccharidosis: Results of the FIND project - a 2-year follow-up study. *Medicine (Baltimore).* 2017 May;96(19):e6887. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000006887>
- (17) Pinto R, Caseiro C, Lemos M, et al. Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal. *Eur J Hum Genet.* 2004 Feb;12(2):87-92. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201044>
- (18) Caciotti A, Catarzi S, Tonin R, et al. Galactosialidosis: review and analysis of CTSA gene mutations. *Orphanet J Rare Dis.* 2013 Aug 2;8:114. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-8-114>. Review.
- (19) Caciotti A, Garman SC, Rivera-Colón Y, et al. GM1 gangliosidosis and Morquio B disease: an update on genetic alterations and clinical findings. *Biochim Biophys Acta.* 2011 Jul;1812(7):782-90. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.03.018>