

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

**ESTUDO SOBRE AS MANIFESTAÇÕES  
GASTROINTESTINAIS EM PACIENTES COM  
MUCOPOLISSACARIDOSES**

TESE DE DOUTORADO

LUCIANA GIUGLIANI

Porto Alegre, Brasil.

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

**ESTUDO SOBRE AS MANIFESTAÇÕES  
GASTROINTESTINAIS EM PACIENTES COM  
MUCOPOLISSACARIDOSES**

LUCIANA GIUGLIANI

**Orientador: Roberto Giugliani  
Co-orientadora: Carolina F. Moura de Souza**

**A apresentação dessa tese é um requisito do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para a obtenção do título de Doutor.**

Porto Alegre, Brasil.

2013

Giugliani, Luciana

Estudo Sobre as Manifestações Gastrointestinais em Pacientes com Mucopolissacaridoses / Luciana Giugliani ; orient. Roberto Giugliani ; coorient. Carolina F. Moura de Souza – 2013.

169 f.

Orientador: Roberto Giugliani

Coorientadora: Carolina F. Moura de Souza

Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente. Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Mucopolissacaridoses 2. Sintomas Gastrtointestinais 3. Terapia de Reposição Enzimática 4. Avaliação Nutricional 5. Bioimpedância Elétrica  
I. Giugliani, Roberto, orient. II. Moura de Souza, Carolina, coorient. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE**

ESTA TESE FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM:

10/12/2013

E, FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

Dra. Louise Lapagesse de Camargo Pinto

Hospital Infantil Joana de Gusmão de Florianópolis (HIJG)

Dra. Cristina Brinckmann Oliveira Netto

Hospital De Clínicas De Porto Alegre (HCPA)

Profª Dra. Helena Ayako Sueno Goldani

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFGRS)

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus eternos inspiradores  
pais, **Eduardo e Maria Cristina**,  
pelo amor e apoio incondicional  
em todos os momentos da minha vida.  
Ao meu irmão **Bruno**, pelo apoio,  
afeto e o constante incentivo.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus orientadores Dra, Carolina F. Moura de Souza e Prof. Dr. Roberto Giugliani, pela confiança, incentivo, oportunidades proporcionadas, dedicação e amizade.

À equipe do ambulatório de tratamento de mucopolissacaridoses do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pela ajuda e disponibilidade em todos os momentos.

Aos meus pais e irmão, pela compreensão, carinho, incentivo e por sempre terem acreditado nos meus sonhos e em mim.

À minha família, pela torcida e apoio durante essa etapa.

Aos meus amigos pela compreensão da minha ausência, mas a acima de tudo, pelo incentivo e torcida.

Ao Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pela oportunidade e a todos que contribuíram para a realização desse estudo.

Ao Grupo de Pesquisa Clínica em Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre que sempre estiveram disponíveis para me ajudar.

A todos os pacientes e familiares entrevistados, meus sinceros agradecimentos.

Ao Fundo de Incentivo a Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA), pelo suporte financeiro.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES) pela ajuda financeira concedida ao pesquisador.

A UFRGS, pelo conhecimento proporcionado.

## RESUMO

**Introdução:** As Mucopolissacaridoses (MPS) são doenças lisossômicas causadas pela deficiência de enzimas envolvidas na degradação dos glicoaminoglicanos. O acúmulo anormal dessa molécula compromete a função celular e orgânica, levando a um espectro de manifestações clínicas, de caráter multissistêmico e progressivo. Manifestações gastrointestinais, tais como episódios frequentes de fezes amolecidas e diarreia, têm sido frequentemente evidenciadas e relatadas por pacientes com MPS. Ainda que os sintomas gastrointestinais sejam frequentemente ofuscados pelos fenótipos neurológicos graves, eles podem afetar a qualidade de vida dos pacientes e de seus familiares.

**Objetivo:** Avaliar as manifestações gastrointestinais em pacientes com MPS que estavam ou não recebendo Terapia de Reposição Enzimática (TRE). Adicionalmente, para melhor compreender o assunto, avaliamos a histologia da mucosa intestinal em camundongos com MPS I.

**Métodos:** Estudo transversal com amostragem de conveniência. Foram incluídos no estudo pacientes com diagnóstico de qualquer tipo de MPS que estavam ou não em TRE. Os sujeitos foram avaliados através de inquérito alimentar, questionamentos quanto ao aparecimento de sintomas gastrointestinais e realização de uma série de exames bioquímicos. Adicionalmente, foram realizados testes de bioimpedância elétrica (para avaliação da composição corporal) e teste molecular para hipolactasia primária a partir de amostras de DNA dos pacientes, assim como análise da histologia da mucosa intestinal em um modelo de camundongo com MPS I.

**Resultados:** Foram incluídos 27 pacientes com diferentes tipos de MPS, sendo 15 (55,6%) do sexo feminino e 12 (44,4%) do sexo masculino, com mediana de idade de 12 (1-28) anos. Os sintomas gastrointestinais mais prevalentes foram flatulência, distensão abdominal, dor abdominal e fezes amolecidas. Houve diferença significativa na prevalência de flatulência entre os tipos de MPS ( $p=0,004$ ). A prevalência de flatulência e de distensão abdominal foi significativamente maior no grupo dos que não recebiam TRE, em comparação ao grupo dos que recebia TRE ( $p = 0,04$  e  $0,03$ , respectivamente). A maioria dos exames bioquímicos realizados para investigação e/ou exclusão de alguma patologia específica apresentaram resultados normais, sugerindo que o aparecimento de sintomas gastrointestinais nesses pacientes possa ser decorrente da própria MPS através de mecanismo fisiopatológico independente. A análise da histologia do intestino delgado de camundongos MPS I identificou células aumentadas de volume, sugerindo algum tipo de acúmulo intracelular. Em relação ao Teste Molecular para Hipolactasia, 58,8% dos pacientes apresentaram genótipo CC, o qual é compatível com intolerância à lactose. Os exames de Bioimpedância Elétrica sugerem que, os pacientes em TRE apresentam menor proporção de massa gorda (MG) em relação aos pacientes que não estavam em TRE.

**Conclusão:** Este foi o primeiro estudo sobre manifestações gastrointestinais de pacientes brasileiros com MPS realizado em nosso meio. Inúmeros sinais e sintomas foram observados, com maior prevalência relativa nas MPS I, II, III e IV do que na MPS VI. O sintoma mais



frequentemente relatado foi flatulência. Embora não tenha sido estatisticamente significativo a diferença, a proporção de pacientes com sintomas gastrointestinais foi menor nos pacientes que estavam em TRE. A Intolerância à lactose observada em maior proporção nos pacientes com MPS com manifestações gastrointestinais, a avaliação da composição corporal e as alterações observadas na mucosa intestinal do camundongo com MPS I devem ser levadas em consideração na interpretação dos resultados. Acreditamos que mais estudos, dirigidos para as manifestações gastrointestinais, devam ser realizados para comprovar esses achados e melhor compreender os mecanismos fisiopatológicos dos sintomas relacionados nos pacientes afetados.

**Palavras-chave:** Mucopolissacaridoses, Glicosaminoglicanos, Doenças Lisossômicas de Depósito, Manifestações Gastrointestinais, Terapia de Reposição Enzimática, Bioimpedância Elétrica, avaliação nutricional.

## ABSTRACT

**Introduction:** The mucopolysaccharidoses (MPS) are lysosomal storage disorders characterized by a deficiency in enzymes involved in glycosaminoglycan degradation. Abnormal accumulation of this molecule compromises cellular and organic function, leading to a spectrum of progressive, multisystem clinical manifestations. Gastrointestinal manifestations, such as frequent episodes of loose stools and diarrhea, are often reported by patients with MPS. Although these gastrointestinal symptoms are often overshadowed by severe neurological phenotypes, they can have a negative impact on the quality of life of patients and their family members.

**Objective:** To assess gastrointestinal manifestations in patients with MPS who were or not receiving enzyme replacement therapy (ERT). Furthermore, we sought to assess bowel mucosa histology in a mouse model of MPS I.

**Methods:** Cross-sectional study with a convenience sampling strategy. The sample comprised patients with a diagnosis of MPS of any type and regardless of ERT status. Patients were assessed by means of a dietary recordatory and an interview focused on gastrointestinal symptoms, as well as a battery of biochemical tests. Bioelectrical Impedance was performed for body composition assessment. Patient DNA samples were also tested by molecular tests for primary lactase hypolactasia, and bowel mucosa specimens from MPS I mice underwent histological examination.

**Results:** A total of 27 MPS patients were included, 15 (55.6%) female and 12 (44.4%) male, with a median age of 12 (1-28) years. The most prevalent gastrointestinal symptoms were flatulence, abdominal distension, abdominal pain, and loose stools. A significant difference in the prevalence of flatulence was observed among different MPS types ( $p=0.004$ ). The prevalence of flatulence and abdominal distension was significantly higher in the non-ERT group than in the ERT group ( $p = 0.04$  and  $0.03$  respectively). Most biochemical tests performed to work up and/or rule out specific conditions were within normal limits, which suggests that the development of gastrointestinal systems in these patients may be due to MPS itself through an independent pathophysiological mechanism. Histological analysis of small-bowel tissue from MPS I mice found increased cell volume indicative of some form of intracellular accumulation. On molecular testing for lactase deficiency, 58.8% of patients had the CC genotype, which is consistent with lactose intolerance. Bioelectrical Impedance analysis suggest that patients with TRE have lower proportion of fat mass (FM) compared to patients who were not on ERT.

**Conclusion:** This was the first study to assess gastrointestinal manifestations in Brazilian patients with different MPS subtypes. Several signs and symptoms were observed with higher relative prevalence in MPS I, II, III and IV to that in MPS VI. The most frequently reported symptom was flatulence. Although was no statistical difference the proportion of patients with gastrointestinal symptoms was lower in patients on ERT. The lactose intolerance observed in a higher proportion of MPS patients with gastrointestinal manifestations, body

composition assessment and observed changes in the bowel mucosa of MPS I mice should be taken into account when interpreting the results. Further studies focusing on the gastrointestinal manifestations of MPS are warranted to corroborate our findings and provide a better understanding of the pathophysiological mechanisms associated with these symptoms in affected patients.

**Keywords:** Mucopolysaccharidoses, glycosaminoglycans, lysosomal storage disorders, gastrointestinal manifestations, enzyme replacement therapy, bioelectrical impedance, nutritional assessment.

## LISTA DE FIGURAS

### CORPO DA TESE

<b>Figura 1.</b> Fluxograma para o diagnóstico das Mucopolissacaridoses no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.....	27
<b>Figura 2.</b> Algoritmo da seleção da amostra do presente estudo.....	47

### ARTIGO 1 EM PORTUGÊS

<b>Figura 1.</b> Sintomas Gastrointestinais apresentados pelos pacientes com MPS.....	83
<b>Figura 2.</b> Histologia do intestino delgado em coloração HE em camundongo normal e com MPS I.....	90

### ARTIGO 1 EM INGLÊS

<b>Figure 1.</b> Gastrointestinal symptoms reported by patients with MPS.....	107
<b>Figure 2.</b> : Small-bowel histology in (a) a normal mouse and (b) an MPS I mouse.....	112

### ARTIGO 2 EM PORTUGÊS

<b>Figura 1.</b> Algoritmo da seleção da amostra do presente estudo.....	127
<b>Figura 2.</b> Percentual de massa magra e massa gorda em pacientes com MPS com e sem tratamento de reposição enzimática.....	130

### ARTIGO 2 EM INGLÊS

<b>Figure 1</b> Algorithm for sample selection in this study.....	146
<b>Figure 2.</b> Percentage of fat free mass and fat mass in patients with Mucopolysaccharidosis with and without enzyme replacement treatment.....	148

## LISTA DE TABELAS

### CORPO DA TESE

<b>Tabela 1.</b> Classificação das mucopolissacaridoses.....	24
<b>Tabela 2.</b> Prevalência de Hipolactasia primária no adulto em diferentes populações...	41
<b>Tabela 3.</b> Recomendações dietéticas diárias de Cálcio.....	49
<b>Tabela 4.</b> Valores de referência de GAGs urinários pela faixa etária.....	57
<b>Tabela 5.</b> Valores de referência de hemograma.....	57
<b>Tabela 6.</b> Valores de referência de albumina.....	57
<b>Tabela 7.</b> Valores de referência de IGA Anti-transglutaminase .....	58
<b>Tabela 8.</b> Valores de referência de proteína C reativa .....	58
<b>Tabela 9.</b> Valores de referência de velocidade de sedimentação glomerular .....	58

### ARTIGO 1 EM PORTUGÊS

<b>Tabela 1.</b> Caracterização da Amostra estudada.....	82
<b>Tabela 2.</b> Associação entre os sintomas gastrointestinais de pacientes com MPS com as variáveis: tipo de MPS, com ou sem Terapia de Reposição Enzimática, valores de GAGs urinários, genótipo CC e CT/TT e ingestão de Cálcio através do Recordatório Alimentar de 24h.....	87

### ARTIGO 1 EM INGLÊS

<b>Table 1.</b> Characterization of the sample studied.....	106
<b>Table 2.</b> Association between gastrointestinal symptoms in patients with MPS and the following variables: MPS subtype, ERT, urinary GAG levels, CC and CT/TT genotype, and 24-hour dietary recall calcium intake.....	110

### ARTIGO 2 EM PORTUGÊS

<b>Tabela 1.</b> Caracterização da Amostra estudada.....	128
<b>Tabela 2.</b> Caracterização antropométrica e composição corporal dividida por sexo de pacientes com MPS.....	129
<b>Tabela 3.</b> Classificação do Estado Nutricional e Percentual de massa magra e massa gorda nos diferentes tipos de MPS.....	129

### ARTIGO 2 EM INGLÊS

<b>Table 1.</b> Characterization of the sample studied.....	146
<b>Table 2.</b> Anthropometric characterization and body composition, divided by gender, of patients with Mucopolysaccharidoses.....	147
<b>Table 3.</b> Classification of the Nutritional Status and Percentage of fat free mass and fat mass in the different types of Mucopolysaccharidosis.....	147

## LISTA DE ABREVEATURAS

AMPS-SGM/HCPA: Ambulatório de Mucopolissacaridoses do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

ANCA: Anticorpo Anticitoplasma de Neurófilos

ASCA: Anticorpo IgG anti-Saccharomyces Cerevisiae

BIA: Bioimpedância Elétrica

CPAP: Aparelho de pressão positiva do ar

CPC/HCPA: Centro de Pesquisa Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

DLDs: Doenças Lisossômicas de Depósito

E1: Elastase-1-Fecal

EIM: Erros Inatos do Metabolismo

GAGs: Glicosaminoglicanos

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HE: Hemotoxilina-Eosina

IMC/I: Índice de Massa Corporal por Idade

IMC: Índice de Massa Corporal

LEIM: Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo

LPH: Lactase Florizina hidrolase

MG: Massa gorda

MM: Massa magra

MPS I: Mucopolissacaridose do tipo I

MPS II: Mucopolissacaridose do tipo II

MPS III: Mucopolissacaridose do tipo III

MPS IV: Mucopolissacaridose do tipo IV

MPS IX: Mucopolissacaridose do tipo IX

MPS VI: Mucopolissacaridose do tipo VI

MPS VII: Mucopolissacaridose do tipo VII

MPS: Mucopolissacaridoses

PCR: Proteína C Reativa

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

RDA: Recomendações Dietéticas Diárias

SGM-HCPA: Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

SNC: Sistema Nervoso Central

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TCTH: Células Tronco Hematopoiéticas

TMB: Taxa de Metabolismo Basal

TMO: Transplante de Medula Óssea

TRE: Terapia de Reposição Enzimática

VCM: Volume corpuscular médio

VSG: Velocidade de Sedimentação Glomerular

%MG: Porcentagem de massa gorda

%MG: Porcentagem de massa magra

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>19</b>
2.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO .....	19
2.2 CLASSIFICAÇÃO DOS EIM .....	20
2.3 DOENÇAS LISSÔMICAS DE DEPÓSITO .....	21
2.4 MUCOPOLISSACARIDOSES .....	22
2.4.1 Modelo Animal de Mucopolissacaridoses.....	28
2.5 TRATAMENTOS DAS MUCOPOLISSACARIDOSES .....	29
2.5.1 Transplante de Medula Óssea (TMO) e Células Tronco Hematopoiéticas (TCTH).....	29
2.5.2 Terapia de Reposição Enzimática (TRE) .....	31
2.5.3 Terapia de Inibição da Síntese do Substrato.....	32
2.5.4 Terapia Gênica.....	33
2.5.5 Tratamento de Suporte.....	33
2.6 MANIFESTAÇÕES GASTROINTESTINAIS DAS MUCOLOPISACARIDOSES ....	35
2.7 DIGESTÃO E ABSORÇÃO DA LACTOSE: ASPECTOS FISIOLÓGICOS.....	38
2.7.1 Má Absorção da Lactose .....	39
2.7.2 Métodos Diagnósticos para má absorção da lactose .....	41
<b>3. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>44</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>45</b>
4.1 Objetivo geral .....	45
4.2 Objetivos específicos .....	45
<b>5. MÉTODOS .....</b>	<b>46</b>
5.1 Delineamento .....	46
5.2 População .....	46
5.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO .....	46
5.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO .....	46
5.5 TAMANHO DA AMOSTRA .....	47
5.6 VARIÁVEIS.....	47
5.6.1 Sócio-demográficas .....	47
5.6.2 Dados Dietéticos – Consumo de Cálcio .....	48
5.6.3 Estado Nutricional .....	49
5.6.4 Avaliação Bioquímica .....	53
5.6.5 Teste Molecular de Hipolactasia Primária.....	58
5.6.6 Análise Histológica da Mucosa Intestinal de um modelo de camundongo com e sem MPS .....	60
5.7 PLANO DE COLETA.....	60



5.8 ANÁLISE DOS DADOS .....	62
5.9 ASPECTOS ÉTICOS .....	62
<b>6. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>63</b>
<b>7. ARTIGO 1 EM PORTUGUÊS .....</b>	<b>73</b>
Introdução .....	75
Material e métodos .....	77
Resultados .....	81
Discussão .....	91
Referencias .....	97
<b>8. ARTIGO 1 EM INGLÊS .....</b>	<b>100</b>
Introduction .....	102
Materials and Methods .....	103
Results .....	106
Discussion .....	112
References .....	116
<b>9. ARTIGO 2 EM PORTUGUÊS .....</b>	<b>119</b>
Introdução .....	121
Material e métodos .....	123
Resultados .....	127
Discussão .....	130
Referências .....	134
<b>10. ARTIGO 2 EM INGLÊS .....</b>	<b>137</b>
Introduction .....	139
Material and Methods .....	141
Results .....	145
Discussion .....	148
References .....	151
<b>11. CONCLUSÕES .....</b>	<b>155</b>
<b>12. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>160</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>161</b>
<b>APÊNDICE I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....</b>	<b>162</b>
<b>APÊNDICE II – Ficha de registro do paciente.....</b>	<b>165</b>
<b>APÊNDICE III – Recordatório Alimentar de 24h.....</b>	<b>167</b>
<b>APÊNDICE IV – Consumo de cálcio ingerido dos pacientes através do Recordatório de 24h (n=27) .....</b>	<b>168</b>
<b>APÊNDICE V – ANÁLISE MOLECULAR DO TESTE DAS MUTAÇÕES NO GENE DA LACTASE .....</b>	<b>169</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As MPS são doenças metabólicas hereditárias caracterizadas pelo acúmulo intralisossômico de glicosaminoglicanos (GAGs), secundário à deficiência na atividade de uma enzima lisossômica envolvida na degradação dessas moléculas. O acúmulo dos GAGs não degradados ou parcialmente degradados ocorre nas células, tecidos e órgãos. Esse acúmulo anormal compromete a função celular e orgânica, levando a um grande número de manifestações clínicas, as quais são progressivas e afetam múltiplos órgãos. O curso da doença é evolutivo e a expectativa média de vida de pacientes com a forma mais grave é em torno da primeira e/ou segunda década (NEUFELD; MUENZER, 2001).

As MPS são doenças raras, apresentando incidência diversa entre países, a qual pode variar de 1,9 a 4,5:100,000 em recém-nascidos vivos (POORTHUIS et al., 1999; APPLGARTH et al., 2000; NELSON et al., 2003).

Manifestações gastrointestinais, tais como episódios frequentes de fezes amolecidas e diarreia, têm sido frequentemente evidenciado em pacientes com MPS (BHAUMIK et al., 1999; ELSNER, 1970; WEGRZYN et al., 2005; SIBILIO et al., 2006). Entretanto, seus mecanismos fisiopatológicos ainda são obscuros. Até o momento, nenhum estudo sistemático foi realizado, em âmbito nacional ou internacional, sobre a etiologia de sintomas gastrointestinais em pacientes com MPS. Essas manifestações, agregadas às dificuldades físicas e neurológicas, limitam a qualidade de vida do paciente e seus familiares (NEUFELD; MUENZER, 2001, SIBILIO et al, 2009).

Nesse sentido, esta tese apresenta um estudo transversal, inédito no Brasil, com o objetivo de avaliar as manifestações gastrointestinais em pacientes com MPS, que estivessem ou não recebendo Terapia de Reposição Enzimática. Esse estudo foi realizado em pacientes com diferentes tipos de MPS, em acompanhamento no Ambulatório de Mucopolissacaridoses do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (AMPS-

SGM/HCPA). O Serviço de Genética Médica é um centro de referência para diagnóstico e manejo das Doenças Lisossômicas de Depósito e sedia a Rede MPS Brasil, uma iniciativa para promoção do diagnóstico das MPS em nosso país, que presta assistência médica e nutricional aos pacientes com MPS, bem como assistência aos seus familiares.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO**

Em 1908, Archibald Garrod constatou que irmãos, filhos de pais normais e consangüíneos, excretavam altas quantidades de ácido homogentísico e que, com frequência uma ou mais pessoas da mesma irmandade eram afetadas, mesmo sem seus pais ou parentes apresentarem a doença. Através de suas observações, o conceito de que algumas doenças ocorrem pela deficiência de uma enzima responsável por uma rota metabólica foi desenvolvido. Várias descobertas seguiram-se a essa e através delas foi possível estabelecer o conceito de Erro Inato do Metabolismo (EIM) (SCRIVER et al., 2001).

Os EIM têm como característica a síntese alterada de uma proteína, geralmente uma enzima, que tem sua atividade reduzida total ou parcialmente. A deficiência ou ausência da atividade dessa enzima pode resultar no bloqueio de uma via metabólica, tendo como consequência o acúmulo de seus substratos e derivados e/ou falta de seu produto, gerando muitas vezes prejuízo no desenvolvimento mental e físico dos indivíduos afetados (SCRIVER et al., 2001).

Quando os EIM são mencionados, o que pensamos é que são extremamente raros e que ocorrem em pequenos segmentos da população. Contudo, segundo Martins et al. (2006), são descritas mais de 500 doenças classificadas como EIM, sendo essas raras isoladamente, mas com frequência global de 1: 2.500 nascidos vivos. Soliz, Chandler e Vasconcelos (2007) ainda relatam que os mesmos ocorrem em todos os grupos étnicos e existem em todos os continentes.

## 2.2 CLASSIFICAÇÃO DOS EIM

Várias são as maneiras pelas quais os EIM podem ser classificados. Saudubray et al (2012) categorizaram os EIM em três grandes grupos, conforme suas características fisiopatológicas:

- a) Grupo I - EIM que culminam em intoxicação: Esse grupo envolve distúrbios do metabolismo intermediário que levam à intoxicação aguda ou progressiva do acúmulo de compostos tóxicos, secundário ao comprometimento das vias de metabolização de pequenas moléculas. São exemplos desse grupo a fenilcetonúria, doença da urina do xarope de bordo, homocistinúria, tirosinemia, os defeitos dos ácidos orgânicos e do ciclo da uréia e as intolerâncias aos açúcares.
- b) Grupo II – EIM envolvendo metabolismo energético: Esse grupo envolve distúrbios cuja clínica é decorrente de alterações de produção e consumo energéticos. Em sua maioria, são provenientes de distúrbios do fígado, miocárdio, músculo, cérebro entre outros tecidos. São exemplos desse grupo as glicogenoses, hiperlactemias congênitas, doenças mitocondriais da cadeia respiratória e defeitos na oxidação de ácidos graxos
- c) Grupo III – EIM envolvendo moléculas complexas: Esse grupo inclui doenças que alteram a síntese ou o catabolismo de moléculas complexas. Alguns exemplos desse grupo são as doenças lisossomiais, que abrangem as mucopolissacaridoses e as esfingolipidoses, assim como as doenças peroxissomiais.

### 2.3 DOENÇAS LISSÔMICAS DE DEPÓSITO

Entre os EIM existe um subgrupo importante que se relaciona às funções geneticamente determinadas envolvendo os lisossomos. Esses são denominados de doenças lisossômicas de depósito (SAÍNZ et al., 2002).

As doenças lisossômicas de depósito (DLDs) são caracterizadas pela atividade deficiente de uma enzima lisossômica, que pode ser uma hidrolase, ou da deficiência de cofatores envolvidos no processo da degradação de macromoléculas, ou, ainda, de transportadores. A maioria das enzimas lisossômicas são exohidrolases que agem em seqüência, sendo os substratos degradados em etapas sucessivas através da remoção de seus resíduos terminais. A deficiência de uma enzima lisossômica causa bloqueio da via metabólica envolvida, levando à não remoção do substrato, o que o torna inacessível à hidrólise por outras enzimas lisossômicas (PINTO, 2005).

Essas doenças têm incidência estimada em 1:7.000 recém nascidos vivos (MEIKLE et al., 1999a; POORTHIUS et al., 1999) e compreendem mais de cinquenta condições diversas (WALKEY, 2009).

As DLDs são tradicionalmente classificadas de acordo com a deficiência enzimática e com o substrato acumulado em (PLATT & WALKEY, 2004):

1) Mucopolissacaridoses (MPS): Exemplos de doença são MPS I, MPS II, MPS III, MPS IV, MPS IV, MPS VII e MPS IX dentre outras.

2) Oligossacaridoses: Exemplos de doença são fucosidose, alfa-Manosidose, beta-manosidose, doença de Schindler dentre outras.

3) Esfingolipidoses: Exemplos de doença são Gangliosidose GM1 e GM2, Doença de Fabry, Doença de Gaucher, Doença de Nemann-Pick A e B, Leucodistrofia Metacromática dentre outras.

- 4) Mucopolioses: Exemplos de doença são mucopoliosose II, III e IV.
- 5) Doença de depósito de lipídeos: Exemplos de doença são Doença de Nemann-Pick C e D, Doença de Wolman.
- 6) Defeito de transporte lisossomal: Exemplos de doença é a cistinose.

Muitas hidrolases não são específicas para cada substrato e doenças diferentes causadas por deficiências enzimáticas diversas podem apresentar o mesmo tipo de substrato acumulado, como por exemplo, a Mucopolissacaridose tipo I (MPS I) e a MPS II. Ainda nesse sentido podem existir doenças lisossômicas que apresentam a mesma deficiência enzimática e são entidades clinicamente distintas como, por exemplo, a Gangliosidose GM1 e a Mucopolissacaridose tipo IVB (MPS IV B) (PINTO, 2009).

As conseqüências celulares do acúmulo do substrato são determinadas por vários fatores: 1) tipo de material armazenado; 2) quantidade do acúmulo; 3) tipo celular que contém o depósito; 4) processos celulares envolvidos, tais como o tráfego intracelular, a autofagia e a transdução de sinais (BALLABIO; GIESELMANN, 2008).

## **2.4 MUCOPOLISSACARIDOSES**

As Mucopolissacaridoses (MPS) são um grupo de DLDs caracterizadas pelo acúmulo intralisossômico de glicosaminoglicanos (GAGs), secundário à deficiência na atividade de uma enzima lisossômica envolvida na degradação dessas moléculas. O acúmulo dos GAGs não degradados ou parcialmente degradados ocorre nas células, tecidos e órgãos. Esse acúmulo anormal compromete a função celular e orgânica, levando a um grande número de manifestações clínicas, as quais são progressivas e afetam múltiplos órgãos. Esses substratos serão excretados em quantidades aumentadas na urina (VIEIRA, 2007).

As MPS são classificadas de acordo com o(s) tipo(s) de GAGs excretado(s) e com a deficiência enzimática envolvida. Existem onze deficiências enzimáticas para sete subtipos de MPS (Tabela 1) (NEUFELD; MUENZER, 2001).

Os GAGs são componentes dos tecidos conjuntivos conectivos, onde são encontrados ligados à proteínas, formando macromoléculas denominadas proteoglicanos. Os proteoglicanos fazem parte da matriz extracelular e têm a função de controlar o fluxo de água e nutrientes para as células (VIEIRA, 2007). Os GAGs constituem-se de polissacarídeos sulfatados formados de resíduos alternados de ácido urônico L-urônico e/ou D-glicurônico) e de hexosamina (D-galactosamina) (NEUFELD; MUENZER, 2001). Ao todo existem sete tipos de GAGs, classificados de acordo com a sua estrutura bioquímica em: sulfato de heparan e sulfato de dermatan, sulfato de condroitin I e II, ácido hialurônico, heparina e sulfato de queratan.



**Tabela 1. Classificação das Mucopolissacaridoses**

<b>MPS / Epônimo</b>	<b>Deficiência Enzimática</b>	<b>GAGs excretados em maior quantidade na urina</b>
<b>MPS I</b> Síndromes de Hurler, Hurler-Scheie e Scheie	$\alpha$ -L-iduronidase	Sulfato de heparan Sulfato de dermatan
<b>MPS II</b> Síndrome de Hunter	Iduronato-2-sulfatase	Sulfato de heparan Sulfato de dermatan
<b>MPS IIIA</b> Síndrome de Sanfilippo A	Heparan N-sulfatase	Sulfato de heparan
<b>MPS IIIB</b> Síndrome de Sanfilippo B	$\alpha$ -N-acetil- glicosaminidase	Sulfato de heparan
<b>MPS IIIC</b> Síndrome de Sanfilippo C	Acetil-Coa- $\alpha$ - glicosamina-acetiltransferase	Sulfato de heparan
<b>MPS IIID</b> Síndrome de Sanfilippo D	N-acetil-glicosamina-6- sulfatase	Sulfato de heparan
<b>MPS IVA</b> Síndrome de Morquio A	N-acetil-galactosamina-6- sulfatase	Sulfato de condroitin Sulfato de queratan
<b>MPS IVB</b> Síndrome de Morquio B	$\beta$ -galactosidase	Sulfato de condroitin Sulfato de queratan
<b>MPS VI</b> Síndrome de Maroteaux- Lamy	N-acetil-galactosamina- 4-sulfatase	Sulfato de dermatan Sulfato de condroitin
<b>MPS VII</b> Síndrome de Sly	$\beta$ -glicuronidase	Sulfato de dermatan Sulfato de heparan Sulfato de condroitin
<b>MPS IX</b> Síndrome de Natowicz	Hialuronidase	Ácido hialurônico

MPS: Mucopolissacaridoses ; GAGs: glicosaminoglicanos

Fonte: Adaptado de Pinto (2005)

As MPS são doenças raras, apresentando incidência diversa entre países, a qual pode variar de 1,9 a 4,5:100.000 em recém-nascidos vivos (POORTHUIS et al., 1999; APPLGARTH et al., 2000; NELSON et al., 2003).

Em relação aos aspectos genéticos, as MPS são transmitidas de forma autossômica recessiva, exceto na MPS II, onde a transmissão é ligada ao cromossomo X. (NEUFELD; MUENZER, 2001).

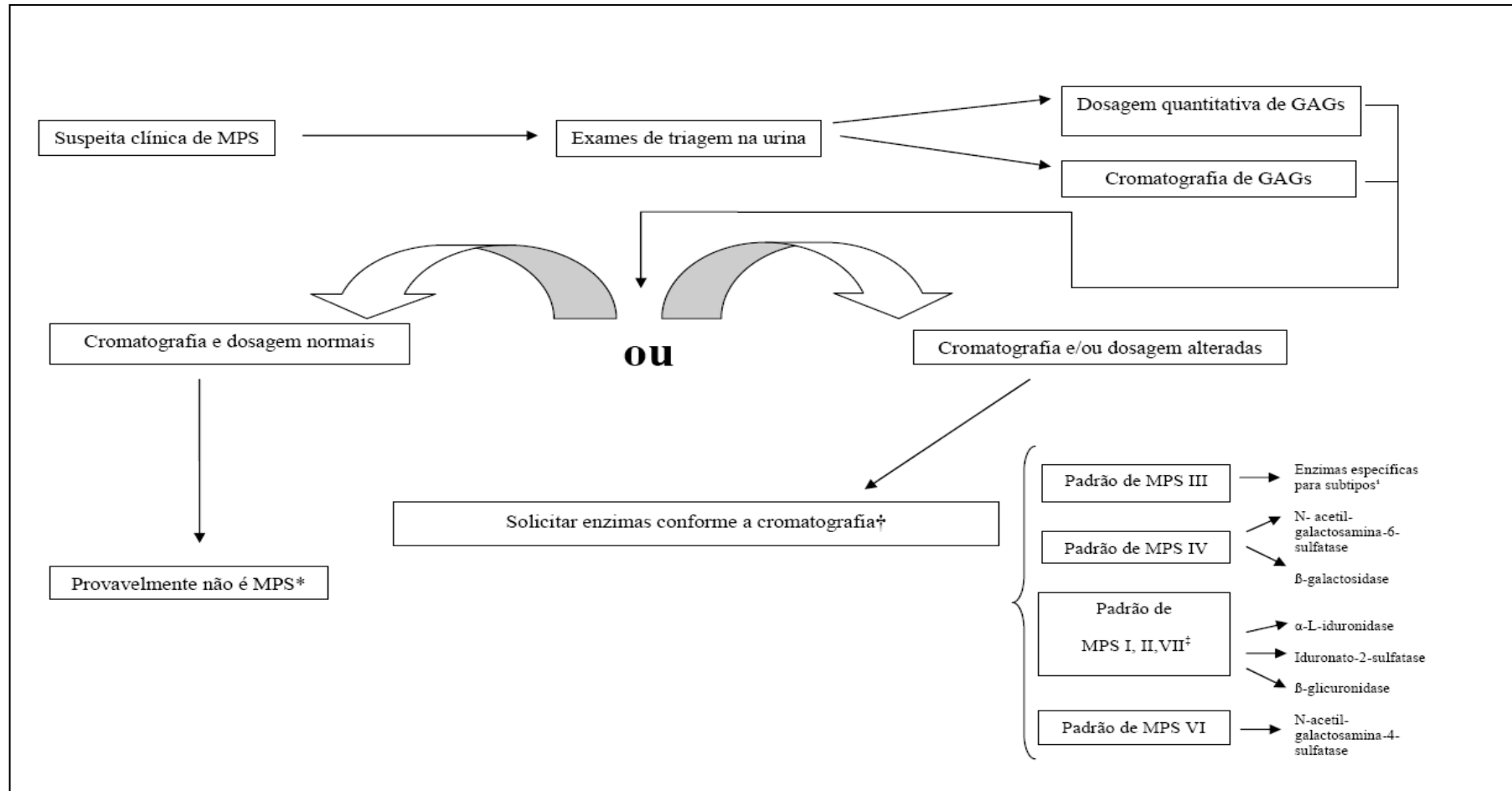
A Rede MPS Brasil, uma iniciativa para promoção do diagnóstico das MPS em nosso país coordenada pelo Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SGM-HCPA) tem um total de 1000 pacientes brasileiros com MPS cadastrados desde 2004 até dezembro de 2012, sendo 198 com MPS I, 300 com MPS II, 132 com MPS III (MPS IIIA: 37; MPS IIIB: 71; MPS IIIC: 24; MPS IIID: 0), 128 com MPS IV (MPS IV-A: 120 e MPS IV-B: 08); 233 com MPS VI; e 13 com MPS VII.

Os quadros clínicos das MPS são crônicos e progressivos. As manifestações clínicas dessa doença são caracterizadas pela presença de: face grosseira, contraturas articulares, hepatoesplenomegalia, disostose múltipla, surdez, opacificação de córnea, diarreia, cardiopatia, doença pulmonar obstrutiva crônica, apnéia do sono e retardo mental, este último nem sempre está presente (NEUFELD; MUENZER, 2001).

Diante de uma suspeita clínica, o diagnóstico das MPS é estabelecido através da realização de exames bioquímicos específicos (Figura 1). O primeiro exame realizado é a análise dos GAGs na urina através de dosagem e de cromatografia (ou eletroforese). Esses exames iniciais permitem orientar a direção dos estudos enzimáticos em plasma, leucócitos ou fibroblastos. A maioria das MPS pode ser triada por esses métodos, mas somente a medida da atividade da enzima específica permitirá o diagnóstico definitivo do tipo de MPS (PINTO et al, 2009). É bom salientar que para as MPS nas quais a enzima deficiente é uma sulfatase,

deve-se medir a atividade de outra sulfatase, para excluir a possibilidade diagnóstica de deficiência múltipla de sulfatases.

O diagnóstico pré-natal das MPS também pode ser realizado através da medida da atividade enzimática em células cultivadas do líquido amniótico e das vilosidades coriônicas (NEUFELD; MUENZER, 2001).



**Figura 1. Fluxograma para o diagnóstico das MPS no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**

\*nas MPS III e MPS IV os exames urinários podem ser normais. Nos demais tipos de MPS, isto ocorre de forma menos freqüente. No entanto, a investigação deve ser continuada caso a suspeita clínica seja muito forte.

†medir sempre mais de uma enzima de referência; se uma sulfatase estiver deficiente medir pelo menos outra sulfatase.

‡ na MPS VII pode excretar sulfato de condroitin em quantidades aumentadas na urina

MPS (mucopolissacaridoses), GAGs (glicosaminoglicanos)

Enzimas específicas para subtipos<sup>1</sup>: Heparan N-sulfatase (MPS IIIA),  $\alpha$ -N-acetil- glicosaminidase (MPS IIIB), Acetil-CoA:  $\alpha$  - glicosaminidase-Nacetiltransferase (MPS IIIC) e N-acetilglicosaminidase-6-sulfatase (MPS IIID).

**Fonte: Adaptado da Rede MPS Brasil**

### 2.4.1 Modelo Animal de Mucopolissacaridoses

Estudos com modelos animais de mucopolissacaridoses, com defeitos enzimáticos específicos, tem demonstrado achados importantes para compreender melhor não apenas estratégias terapêuticas, tais como transplante de medula óssea e/ou terapia gênica, mas também achados clínicos, bioquímicos e mecanismos patogênicos dessa doença (SAKIYAMA, 1995). A maioria dos modelos animais são criados em laboratório através da interrupção do gene de interesse em células-tronco embrionárias. No entanto, alguns modelos animais acontecem de forma espontânea e foram identificados através de observações fenotípicas e subsequentemente por confirmação bioquímica e molecular. (SAKIYAMA, 1995).

Hoje já existem modelos em camundongos para a MPS I (CLARKE et al, 1997; OHMI et al, 2003; WANG et al, 2010); MPS II (JUNG et al, 2010); MPS IIIA (BHAUMIK et al, 1999); MPS IIIB (LI et al, 1996); MPS IVA (TOMATSU et al, 2005); MPS VI (EVERS et al, 1996), MPS VII (SANDS e BIRKENMEYER, 1993) e MPS IX (MARTIN et al, 2008). Outros modelos animais já foram descritos em animais maiores, incluindo ratos (MPS VI), gatos (MPS I, VI), cachorros (MPS I, IIIA, IIIB e VII), entre outros (HASKINS, 2007).

Através de modelos animais de MPS, foram realizados estudos focados na sua caracterização, mecanismos causadores de doença e desenvolvimento de novas terapias. Alterações cardíacas (JORDAM et al., 2005; BRAULIN et al., 2011), deformidades ósseas, alterações na função auditiva (METCALF et al, 2010), alterações gastrointestinais (ROBERTS et al., 2009) dentre outros achados são compatíveis com a doença humana. Estes animais também foram e estão sendo usados para verificar eficácia de terapias, como por exemplo, a terapia gênica (OSBOURNE et al, 2011),

terapia de reposição enzimática (BALDO et al, 2011) e transplante de células-tronco hematopoiéticas (WOLF et al, 2011).

O presente trabalho focou-se na investigação da histologia intestinal de modelos de camundongo com e sem MPS para analisar possíveis alterações gastrointestinais.

## **2.5 TRATAMENTOS DAS MUCOPOLISSACARIDOSES**

O catabolismo dos glicosaminoglicanos pode ser restaurado ou normalizado com o auxílio de tratamentos disponibilizados para algumas formas de MPS. A enzima deficiente pode ser administrada diretamente (Reposição Enzimática), ou indiretamente (Transplante de Medula Óssea ou de Células Tronco Hematopoiéticas), ou ainda, por células autólogas modificadas geneticamente para expressar a enzima (Terapia Gênica). No caso de transplante de medula óssea, acredita-se que células do doador-derivados podem fornecer enzima não só através de produção, mas também pelo contato direto com células receptoras (NEUFELD; MUENZER, 2001).

### **2.5.1 Transplante de Medula Óssea (TMO) e Células Tronco Hematopoiéticas (TCTH)**

O TMO/TCTH têm sido realizado em pacientes com MPS com o objetivo de corrigir a deficiência enzimática (BOELENIS et al, 2006). Esse tratamento baseia-se no fato de que a enzima produzida pelas células do doador/transplante é liberada no plasma do receptor e pode ser absorvida por suas células que têm a enzima deficiente (MATTE, 1998).

Este é um procedimento de alto risco e com elevada taxa de morbidade/mortalidade, mas muitos estudos indicam que este tratamento modifica a

historia natural da doença, aumentando a expectativa de vida e melhorando muitas anormalidades sistêmicas e neurológicas (VELLODI *et al.*, 1997; WRAITH & CLARKE, 2006). No entanto, a TCTH tem pouco impacto tanto nas funções neurológicas, onde as alterações presentes parecem ser irreversíveis (NEUFELD; MUENZER, 2001), quanto nas deformidades ósseas, presumidamente devido a escassa penetração da enzima nos osteócitos (VELLODI *et al.*, 1997).

Sua indicação depende do tipo de MPS, do quadro clínico, idade e comprometimento neurológico (MUENZER *et al.*, 2007).

Para a MPS I, a principal indicação é para os pacientes com a forma grave da doença, devendo ser realizado antes dos dois anos de idade, pois neste período o TCHT parece modificar de forma significativa o comprometimento cognitivo. Além da dificuldade de encontrar um doador compatível, é difícil prever, no início da doença, quais pacientes desenvolverão a forma grave, nos quais vale a pena correr os riscos associados a este procedimento (MUENZER *et al.*, 2007). Este procedimento pode estagnar o déficit neurológico, impedir a morte precoce por doença cardíaca ou hepática, melhorar as alterações oftalmológicas e prolongar a sobrevida destes pacientes. Apesar disso, o TMO/TCHT não corrige as deformidades esqueléticas. Os resultados dos transplantes realizados mais recentemente mostram um significativo progresso neste procedimento, com sobrevida acima de 70% (BOELENIS *et al.*, 2006; GIUGLIANI *et al.*, 2010).

Para a MPS II, o tratamento com TCHT não tem sido indicado principalmente pela falta de resultados que demonstrem benefícios quanto ao déficit neurológico e pela alta taxa de morbi-mortalidade do procedimento, apesar de poder proporcionar benefícios em relação a outras questões clínicas (VELLODI, *et al.*, 1997; ZAREBA, 2007; GIUGLIANI *et al.*, 2010).

Esse procedimento é considerado uma alternativa terapêutica para MPS VI, mas nestes pacientes prefere-se utilizar a Terapia de Reposição Enzimática (TRE), pois os riscos do TCHT parecem não superar os benefícios deste procedimento neste tipo de MPS (GIUGLIANI *et al.*, 2006; GIUGLIANI, 2012).

### **2.5.2 Terapia de Reposição Enzimática (TRE)**

A Terapia de Reposição Enzimática (TRE) é um tratamento que consiste na administração periódica, da enzima específica deficiente no paciente, através de infusões intravenosas regulares de formas recombinantes das mesmas (VIEIRA, 2008).

A primeira TRE para tratamento de uma mucopolissacaridose foi para MPS I, aprovada para uso no Brasil em 2005, sendo subsequentemente aprovadas a TRE para MPS II (2007), MPS VI (2009) e mais recentemente para MPS IVA (ensaios clínicos em andamento) (GIUGLIANI, 2012). No momento não existe TRE para os outros tipos de MPS. No Brasil, a maioria dos pacientes com MPS I, II e VI vem obtendo este tratamento por via judicial. As infusões do medicamento são usualmente realizadas em centros de atendimento especializados nesta doença.

A TRE não é curativa e não pode melhorar todos os órgãos e sistemas no indivíduo quando as alterações irreversíveis já estão estabelecidas, entretanto o tratamento precoce pode prevenir a progressão em alguns aspectos relacionados com a doença, melhorando a qualidade de vida (PESSUTTO, 2007). A principal desvantagem deste tratamento é que a enzima fornecida intravenosamente não atravessa a barreira hemato-encefálica. Além disso, o fato da administração da enzima ter de ser semanalmente também pesa na busca de novas estratégias (NEUFELD; MUENZER, 2001; PESSUTTO, 2007).



Para os pacientes com MPS I, a reposição enzimática é feita com a  $\alpha$ -L-Iduronidase recombinante (laronidase). Estudos Pré-clínicos e clínicos de Fase I, II, III e IV demonstraram que a administração desta terapia pode trazer benefícios aos pacientes como diminuição da hepatoesplenomegalia, aumento de estatura e peso, diminuição de GAGs na urina e aumento da capacidade cardiorrespiratória (WRAITH *et al.*, 2004; COX-BRINKMAN *et al.*, 2007).

A TRE para MPS II é feita pela administração de idursulfase. Os estudos realizados demonstraram redução da excreção de GAGs urinários, redução da hepatoesplenomegalia, aumento da capacidade cardiorrespiratória e melhora na mobilidade articular do cotovelo, mas não houve impacto ou melhora no comprometimento do SNC (MUENZER *et al.*, 2004; MUENZER *et al.*, 2007).

A TRE para o tratamento de MPS VI é realizada pela administração de uma forma recombinante da enzima N-acetilgalactosamina 4-sulfatase, denominada de galsulfase. Estudos realizados observaram redução da excreção de GAGs pela urina, melhora na capacidade funcional para locomoção e subida em escadas, além de uma sensação de melhora na rigidez e dor articular. Um estudo mais recente identificou melhora na função pulmonar após tratamento com TRE. (HARMATZ *et al.*, 2006; HARMATZ *et al.*, 2008).

### **2.5.3 Terapia de Inibição da Síntese do Substrato**

Este tratamento baseia-se na utilização de pequenas moléculas que agem como inibidores da síntese de compostos que não podem ser degradados devido à atividade enzimática deficiente (WRAITH *et al.*, 2007). Isto é, proporciona a restauração do equilíbrio entre a síntese e a degradação destes compostos. Se esta molécula inibitória

ultrapassar a barreira hemato-encefálica pode corrigir também as alterações do SNC, não somente as manifestações clínicas em tecidos somáticos (BANECKA-JAKÓBIWICZ *et al.*, 2007). Em um trabalho de Pietrowska *et al.* (2006), foi demonstrado que a Genesteína inibe consideravelmente a síntese de GAGs em cultura de fibroblastos de pacientes com MPS I, MPS II, MPS IIA e MPS IIIB. Entretanto, mais estudos são necessários para comprovar seu benefício.

#### **2.5.4 Terapia Gênica**

A Terapia Gênica consiste na introdução de uma cópia normal do gene (através de vetores virais ou não virais) dentro do organismo, visando aumentar a síntese da enzima e permitir que esta seja produzida em quantidades suficientes. Estudos com terapia gênica (Pré-clínicos) têm sido realizados para MPS I, MPS II, MPS III-A, MPS III-B, MPS VI e MPS VII (WRAITH *et al.*, 2007).

#### **2.5.5 Tratamento de Suporte**

O tratamento de suporte das manifestações clínicas da MPS inclui uma abordagem multidisciplinar, já que em função das características clínicas da doença serem progressivas, há uma necessidade de acompanhamento regular por diversas áreas da saúde para verificar potenciais alterações nas condições clínicas e prevenir a mortalidade precoce (MUENZER *et al.*, 2007; WRAITH & CLARKE, 2006).

Este tipo de tratamento pode melhorar significativamente a expectativa e a qualidade de vida dos pacientes afetados e seus familiares (MUENZER, 2004).

Várias medidas de suporte podem ser tomadas para as manifestações clínicas da doença, tais como: tratamento medicamentoso para, por exemplo, problemas cardíacos, respiratórios, neurológicos, entre outros; uso de equipamentos de suporte, como aparelho de pressão positiva do ar (CPAP) e aparelho auditivo; tratamento cirúrgico para hidrocefalia, hérnias, algumas alterações esqueléticas, adenoidectomia, amigdalectomia, entre outras; transplante de córnea para os casos de opacificação mais importantes (VIEIRA, 2007).

Uma equipe multidisciplinar, formada por geneticista, anesthesiologia, odontólogo, oftalmologista, otorrinolaringologista, cardiologista, fisiatra, nutricionista, fisioterapeuta, fonoaudiólogo, terapeuta ocupacional e pneumologista, é de extrema importância para o suporte e manejo adequado aos pacientes e seus familiares, oferecendo alívio de sintomas específicos. O contato com outros pacientes com a mesma doença e o apoio dos grupos de suporte, juntamente com o aconselhamento genético, devem fazer parte do manejo dos pacientes com MPS e de suas famílias (FEDERHEN, 2009).

## 2.6 MANIFESTAÇÕES GASTROINTESTINAIS DAS MUCOPOLISSACARIDOSES

Manifestações gastrointestinais, tais como episódios frequentes de fezes amolecidas e diarreia, têm sido frequentemente evidenciado em pacientes com MPS (BHAUMIK et al., 1999; ELSNER, 1970; WEGRZYN et al., 2005; SIBILIO et al., 2009). Entretanto, seus mecanismos fisiopatológicos ainda são obscuros. Embora os sintomas gastrointestinais são frequentemente ofuscados pelos fenótipos neurológicos graves, eles podem afetar a qualidade de vida dos pacientes e seus familiares, sendo uma queixa pouco valorizada pelos médicos (NEUFELD; MUENZER, 2001, SIBILIO et al, 2009).

Wegrzyn et al (2005) investigaram, através de um relato de caso de uma paciente com MPS I, fatores que poderiam contribuir para episódios recorrentes de diarreia. No relato, a paciente apresentava episódios recorrentes de fezes amolecidas e diarreia, frequentemente acompanhados de vômitos. Análises microbiológicas detalhadas foram realizadas e infecções microbianas atípicas do trato digestivo foram encontradas na maioria dos episódios de diarreia, sugerindo que essas infecções poderiam contribuir significativamente para a etiologia desses episódios em pacientes com MPS. No entanto, é importante ressaltar que a maioria dos eventos de diarreia apresentados nesse relato de caso foram causados por infecções microbianas. Quando a bactéria ou fungo patogênico- foram isolados, o tratamento com antibiótico sempre resultou na normalização das fezes. Uma possível explicação para isso, segundo o autor, seria que os GAGs acumulados no trato digestivo dos pacientes com MPS, poderiam fornecer um meio favorável para o crescimento microbiano. Assim sendo,

qualquer alteração no conteúdo da flora intestinal faria um crescimento excessivo de uma cepa patogênica, tornando o indivíduo mais suscetível a esse sintoma.

Além disso, vale ressaltar que o acúmulo de GAGs pode também afetar a produção e/ou ação da IgA, uma classe de anticorpos predominante no intestino, o que tornaria o paciente mais sensível a infecções microbianas. Assim sendo, o autor sugeriu que em pacientes com MPS, a diarreia surge diretamente do acúmulo de GAGs e parcialmente pela disfunção/defeito do sistema nervoso autônomo e motilidade anormal do intestino. Embora não possamos excluir essa possibilidade, os argumentos listados acima indicam que infecções microbianas atípicas do trato digestivo possam contribuir significativamente para que ocorram episódios de diarreia nesses pacientes. No entanto, poucas evidências existem para embasar essa hipótese e mais estudos devem ser realizados para comprovar ou não esses achados (WEGRZYN et al, 2005).

Sibilo et al (2009) descreveram um relato de caso evidenciando os achados intestinais em um paciente com MPS IIIB. O paciente apresentava histórico de diarreia crônica e intratável, que afetava a qualidade de vida e a saúde em geral. Análises endoscópicas e exames histológicos detalhados revelaram dilatação intestinal de linfócitos da submucosa e subserosa. O autor sugere que um depósito localizado de GAGs possa causar uma obstrução mecânica do sistema linfático intestinal, podendo levar, assim, à perda de fluidos e diarreia.

Estudos sobre mecanismos patogênicos e alterações gastrointestinais em pacientes com MPS são escassos. Roberts e colaboradores (2009) descreveram a morfologia gastrointestinal e suas funções em um modelo de camundongo com MPS IIIA. O peso do estômago e do duodeno aumentaram em camundongos com MPS IIIA e o comprimento do duodeno também aumentou. O aumento da espessura da submucosa foi observado no intestino de camundongos com MPS IIIA comparados

com camundongos normais e o acúmulo lisossomal de GAGs foi observado nessa região e em suas vilosidades. O autor sugeriu que as alterações observadas na estrutura do trato gastrointestinal em camundongos com MPS IIIA podem contribuir para o ganho de peso nessa desordem.

Os GAGs acumulados em pacientes com MPS não são apenas importantes componentes da matriz extracelular e de células de superfície, mas também estão associados com funções celulares relevantes (motilidade celular, interação entre regulação da matriz extra e intracelular) e também com regulação de vias de sinalização extracelular (por exemplo modulação de crescimento de fibroblastos, fator de atividade de citocinas) (SIBILOS et al, 2009; BODE et al., 2006). Assim, a incapacidade de degradação dos GAGs em pacientes com MPS interrompe os níveis normais desse composto, podendo gerar patologias associadas. Entretanto, a correlação entre acúmulo de GAGs e desenvolvimento de patologias permanece obscura e mais trabalhos devem ser realizados para seu entendimento (ROBERTS et al., 2009).

Adicionalmente, dados do Ambulatório de MPS do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, indicam que pacientes com MPS têm apresentado frequentemente episódios de fezes amolecidas e/ou sintomas gastrointestinais que melhoram com a introdução de medidas como dieta restrita em lactose, por exemplo, mostrando que mais estudos são necessários para melhor investigar e manejar esses achados em pacientes com MPS.

Assim sendo, fica claro que pacientes com MPS que apresentam episódios de fezes amolecidas e/ou sintomas gastrointestinais devem ser investigados cuidadosamente, buscando o melhor entendimento das manifestações gastrointestinais nas MPS e das possíveis medidas para o seu manejo. (SIBILOS et al, 2009).

## 2.7 DIGESTÃO E ABSORÇÃO DA LACTOSE: ASPECTOS FISIOLÓGICOS

A lactose é um dissacarídeo que consiste em uma molécula de beta-galactosidade aderida à glicose por uma ligação beta-1 → 4. É conhecida como o “açúcar do leite” e é produzida pela glândula mamária da maioria dos mamíferos (CHAMPE & HARLEY, 1997).

Durante o processo de digestão, a enzima lactase hidrolisa a lactose em glicose e galactose que são absorvidas pela mucosa intestinal. A glicose entra para o pool de glicose do intestino, e a galactose é metabolizada no fígado para ser convertida em glicose, e entrar nesse pool. Caso a galactose não seja metabolizada no fígado, o é pelos eritrócitos, ou é eliminada na urina. A lactose, não sendo hidrolisada, não é absorvida no intestino delgado e passa rapidamente para o cólon. No cólon, a lactose é convertida em ácidos graxos de cadeia curta, gás carbônico e gás hidrogênio pelas bactérias da flora, produzindo acetato, butirato e propionato. Os ácidos graxos são absorvidos pela mucosa colônica, desta forma recuperando a lactose mal absorvida para utilização energética. Os gases, após absorção intestinal, são expirados pelo pulmão, servindo como ferramenta diagnóstica. Esta fermentação da lactose pela flora bacteriana leva ao aumento do trânsito intestinal e da pressão intracolônica, podendo ocasionar dor abdominal e sensação de inchaço no abdome (HET et al, 2006). A acidificação do conteúdo colônico e o aumento da carga osmótica no íleo e cólon resultante da lactose não absorvida leva à grande secreção de eletrólitos e fluidos, além do aumento do trânsito intestinal, resultando em fezes amolecidas e diarreia. Apesar da falta de evidências, alguns autores acreditam que a absorção da lactose nos pacientes com hipolactasia poderia ser favorecida pela sua metabolização pela flora intestinal (MATTAR et al, 2010; LOMER et al, 2008).

A hidrólise da lactose, como mencionada acima, é feita por uma beta-galactosidase, conhecida como lactase; sua forma precursora é sintetizada pelo enterócito como uma proteína de alto peso molecular (215kD) e após várias etapas de glicosilação e clivagem, a proteína precursora é transportada para a membrana microvilositária, na sua forma madura: lactase-florizina hidrolase, uma molécula com atividade hidrolítica e peso molecular de 130-160 kD (LEIS *et al.*, 1997; WALKER-SMITH, 1999). A lactase só se encontra na extremidade da vilosidade, sendo, portanto, muito vulnerável a lesões da mucosa (HEITLINGER & LEBENTHAL, 1988).

Nos seres humanos, a atividade da lactase é detectada por volta do terceiro mês de gestação, mas com valores muito baixos, só aumentando a partir da 26ª semana. Na 34ª semana atinge 30% dos valores do recém-nascido, aumenta rapidamente entre a 36ª e 38ª semanas, e ao termo os seus valores equivalem aos de uma criança de um ano de idade (MOBASSALECH *et al.*, 2003).

A lactase está presente em toda a extensão do intestino delgado, porém sua concentração pode variar, apresentando níveis mais altos no jejuno proximal e mais baixos no duodeno e íleo distal. A atividade dessa enzima no duodeno pode ser 40% menos do que no jejuno (ROBAYO-TORRES *et al.*, 2006; AURICCHIO & TRONCONE, 2000).

### **2.7.1 Má Absorção da Lactose**

Má absorção ou má digestão de lactose é a diminuição na capacidade de hidrolisar a lactose, que é resultante da hipolactasia. A hipolactasia significa diminuição da atividade de enzima lactase na mucosa do intestino delgado (SAHI, 1994), também denominada recentemente de “lactase não persistente” (ENNATTAN



et al, 2007). O aparecimento de sintomas abdominais por má absorção de lactose caracteriza a intolerância à lactose (WALKER-SMITH, 1999).

A má absorção de lactose nem sempre provoca sintomas de intolerância à lactose (SAHI, 1994a). Após o desmame, ocorre uma redução geneticamente programada e irreversível da atividade da lactase na maioria das populações do mundo, cujo mecanismo é desconhecido, resultando em má absorção primária de lactose (WANG et al, 1998). Porém, a hipolactasia também pode ser secundária a doenças que causem dano na borda em escova da mucosa do intestino delgado ou que aumentem significativamente o tempo de trânsito intestinal, como nas enterites infecciosas, giardíase, doença celíaca, fibrose cística, doença inflamatória intestinal (especialmente doença de Crohn), gastroenterite, enterites induzidas por drogas ou radiação, doença diverticular do cólon dentre outras (MATTAR et al, 2010, WALKER-SMITH, 1999; AURICCHIO & PITCHUMONI, 1994). Diferentemente da hipolactasia primária do adulto, a hipolactasia secundária é transitória e reversível (LABAYEN et al, 2001).

A prevalência da hipolactasia primária do adulto pode variar nos diversos países e em suas diferentes regiões (Tabela 2), sendo em torno de 5% no nordeste da Europa, com a menor prevalência observada na Grã-Bretanha (5%). A prevalência da hipolactasia vai aumentando na direção do centro-sul da Europa para chegar próximo aos 100% na Ásia e Oriente Médio (SAHI, 1994a). No Brasil, a prevalência encontrada foi de 57% para indivíduos brancos, 57% para indivíduos mulatos e 80% (MATTAR et al, 2010) para os negros, conforme descrito na tabela abaixo.

**Tabela 2. Prevalência de hipolactasia primária do adulto em diferentes populações**

<b>País</b>	<b>Prevalência (%)</b>	<b>Citação</b>
Alemanha	14,8	Flatz et al, 1982
Brasil (brancos)	57	Mattar et al, 2009
Brasil (pardos)	57	Mattar et al, 2009
Brasil (negros)	80	Mattar et al, 2009
China (Norte)	87,3	Xu et al, 2010
França	23,4	Cloarec et al, 1991
Itália (Norte)	51	Burgio et al, 1984
Japão	89	Nose et al, 1979
Rússia (Nordeste)	35,6	Khabarova et al, 2009
Suécia	5	Sahi et al, 1994

**Fonte: Adaptado de Matar et al 2010**

### **2.7.2 Métodos Diagnósticos para má absorção da lactose**

Existem vários métodos para o diagnóstico de má absorção da lactose, cada um com suas particularidades. Podemos citar o Teste de pH fecal, através de pesquisa de substâncias redutoras nas fezes, o teste de tolerância à lactose (curva glicêmica), o teste de tolerância à lactose com etanol, o teste respiratório com <sup>14</sup>C-lactose, o teste respiratório com <sup>13</sup>C-lactose, o teste molecular no gene da lactase e biópsia intestinal para medida da atividade da lactase, que por sua vez é um exame invasivo e que necessita a exposição à radiação (BRUMMER et al, 1993).

Os testes de tolerância à lactose são realizados como desafio, o paciente ingere de 25g a 50g de lactose e se avalia os sintomas por duas a três horas. A técnica mais difundida nos laboratórios de análises clínicas é a por curva glicêmica. Nesta técnica, é coletada a glicemia em jejum e depois é feita uma curva. Se o paciente absorver a lactose, a glicemia deve se elevar de 1,4 mmol/l ou mais (MATTAR et al, 2010).

Atualmente, o teste do hidrogênio expirado é uma das técnicas mais empregadas no diagnóstico da má absorção de lactose (SEVÁ-PEREIRA et al, 1999). O exame se baseia na produção de hidrogênio pela fermentação da lactose não absorvida: o hidrogênio entra na corrente sanguínea e é expirado pelo pulmão. O paciente sopra o basal, ingere a lactose, e depois sopra novamente após 60, 90, 120, 150 e 180 minutos, sendo considerado o exame positivo quando ocorre aumento de hidrogênio expirado em 20 ppm (partes por milhão) em relação ao valor basal, uma vez que não existem outras fontes endógenas para a produção de hidrogênio nos mamíferos. A leitura é feita em cromatógrafo gasoso específico para o hidrogênio (MATTAR, 2009). A dose-padrão utilizada nesse teste é de 2g/kg de lactose em solução aquosa a 20%. Contudo, como o teste do hidrogênio expirado pode detectar até 2 gramas de lactose não absorvida, alguns autores têm proposto o uso de doses menores e mais fisiológicas de lactose, assim como o uso do leite ou de iogurte como veículos (LEIS et al, 1997, ROSADO et al, 1994). É importante ressaltar que a sensibilidade do exame é de 80% a 92,3% e a especificidade 100%, desde que as recomendações sejam seguidas rigorosamente (ROSADO et al, 1994).

Com a validação do polimorfismo *LCT*-13910C>T associada à intolerância e tolerância à lactose confirmada através de estudos no Brasil (BULHÕES et al, 2007; MATTAR et al, 2008) e em outros países (RIDEFELT, HAKANSSON, 2005 ; DI STEFANO et al, 2009), o exame genético passou a incorporar a rotina de exames de laboratório para diagnosticar hipolactasia. A enzima intestinal lactase ou lactase florizina hidrolase (LPH) é codificada pelo gene *LCT* localizado no cromossomo 2 (AROLA & TAMM, 1994). Sua persistência na vida adulta tem herança autossômica dominante, enquanto que a hipolactasia é herdada de forma autossômica recessiva (SAHI, 1974; LISKER,1996). Os indivíduos homo ou heterozigotos para o alelo

dominante são os absorvedores de lactose, e os não-absorvedores são homozigotos para o alelo autossômico recessivo.

Na Europa o exame é feito com kit *MutaReal Lactase Test* que utiliza o PCR em tempo real, e com kit *GenoType LCT* que se baseia na hibridização dos produtos de PCR de PCR multiplex com sondas selvagens e mutantes aderidas às tiras de nitrocelulose (DI STEFANO et al, 2009). No Brasil foi implantada no Hospital das Clínicas de Porto Alegre técnica que emprega PCR convencional e tratamento do produto de PCR com enzima de restrição (RFLPPCR) (BULHÕES et al, 2007).

### 3. JUSTIFICATIVA

As MPS são doenças metabólicas hereditárias caracterizadas pelo acúmulo intralisossômico de glicosaminoglicanos (GAGs), secundário à deficiência na atividade de uma enzima lisossômica envolvida na degradação dessas moléculas. O acúmulo dos GAGs não degradados ou parcialmente degradados ocorre nas células, tecidos e órgãos. Esse acúmulo anormal compromete a função celular e orgânica, levando a um grande número de manifestações clínicas, as quais são progressivas e afetam múltiplos órgãos. O curso da doença é evolutivo e a expectativa média de vida de pacientes com a forma mais grave é em torno da primeira e/ou segunda década (VIEIRA, 2007).

Manifestações gastrointestinais, tais como episódios frequentes de fezes amolecidas e diarreia, têm sido frequentemente evidenciadas em pacientes com MPS (BHAUMIK et al., 1999; ELSNER, 1970; WEGRZYN et al., 2005; SIBILIO et al., 2006). Entretanto, seus mecanismos fisiopatológicos ainda são obscuros. Até o momento, nenhum estudo foi realizado em âmbito nacional ou internacional com uma maior precisão referente à etiologia de sintomas gastrointestinais em pacientes com MPS. Essas manifestações, agregadas às dificuldades físicas e neurológicas, prejudicam a qualidade de vida do paciente e de seus familiares (NEUFELD; MUENZER, 2001, SIBILIO et al, 2009).

No sentido de resolver, ou pelo menos minimizar esses sintomas, algumas medidas empíricas têm sido utilizadas, sem um maior embasamento científico. Assim, acreditamos ser de grande relevância avaliar as manifestações gastrointestinais em pacientes com MPS, que estejam ou não recebendo Terapia de Reposição Enzimática, acompanhados no Ambulatório de Mucopolissacaridoses do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (AMPS-SGM/HCPA), uma vez que o Serviço de Genética Médica é um centro de referência para diagnóstico e manejo de Doenças Lisossômicas de Depósito e sedia a Rede MPS Brasil, uma iniciativa para promoção do diagnóstico das MPS em nosso país, que presta assistência médica e nutricional aos pacientes com MPS, assim como serviços aos seus familiares.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Avaliar as manifestações gastrointestinais em pacientes com MPS, que estejam ou não recebendo Terapia de Reposição Enzimática, acompanhados no Ambulatório de Mucopolissacaridoses do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (AMPS-SGM/HCPA).

### 4.2 Objetivos específicos

1. Identificar os sintomas gastrointestinais mais prevalentes em pacientes com MPS.
2. Identificar se há diferenças nos sintomas gastrointestinais nos diferentes tipos de MPS.
3. Identificar se há diferenças nos sintomas gastrointestinais de pacientes que recebiam Terapia de Reposição Enzimática em relação àqueles que não foram submetidos a esse tratamento.
4. Correlacionar os valores de GAGs urinários com os sintomas gastrointestinais em pacientes com MPS.
5. Avaliar a persistência da enzima lactase por meio do teste molecular para hipolactasia primária, e correlacionar a presença do polimorfismo *LCT*-13910C>T com as manifestações gastrointestinais nesses pacientes.
6. Comparar a histologia da mucosa intestinal em camundongos com e sem MPS.
7. Avaliar o estado nutricional dos pacientes por meio da avaliação de parâmetros antropométricos, composição corporal e de parâmetros bioquímicos.

## **5. MÉTODOS**

### **5.1 Delineamento**

Estudo transversal envolvendo uma série de casos.

### **5.2 População**

A população estudada foi recrutada no Ambulatório de Mucopolissacaridoses do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (AMPS-SGM/HCPA). Foram incluídos pacientes com diversos tipos de MPS.

### **5.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO**

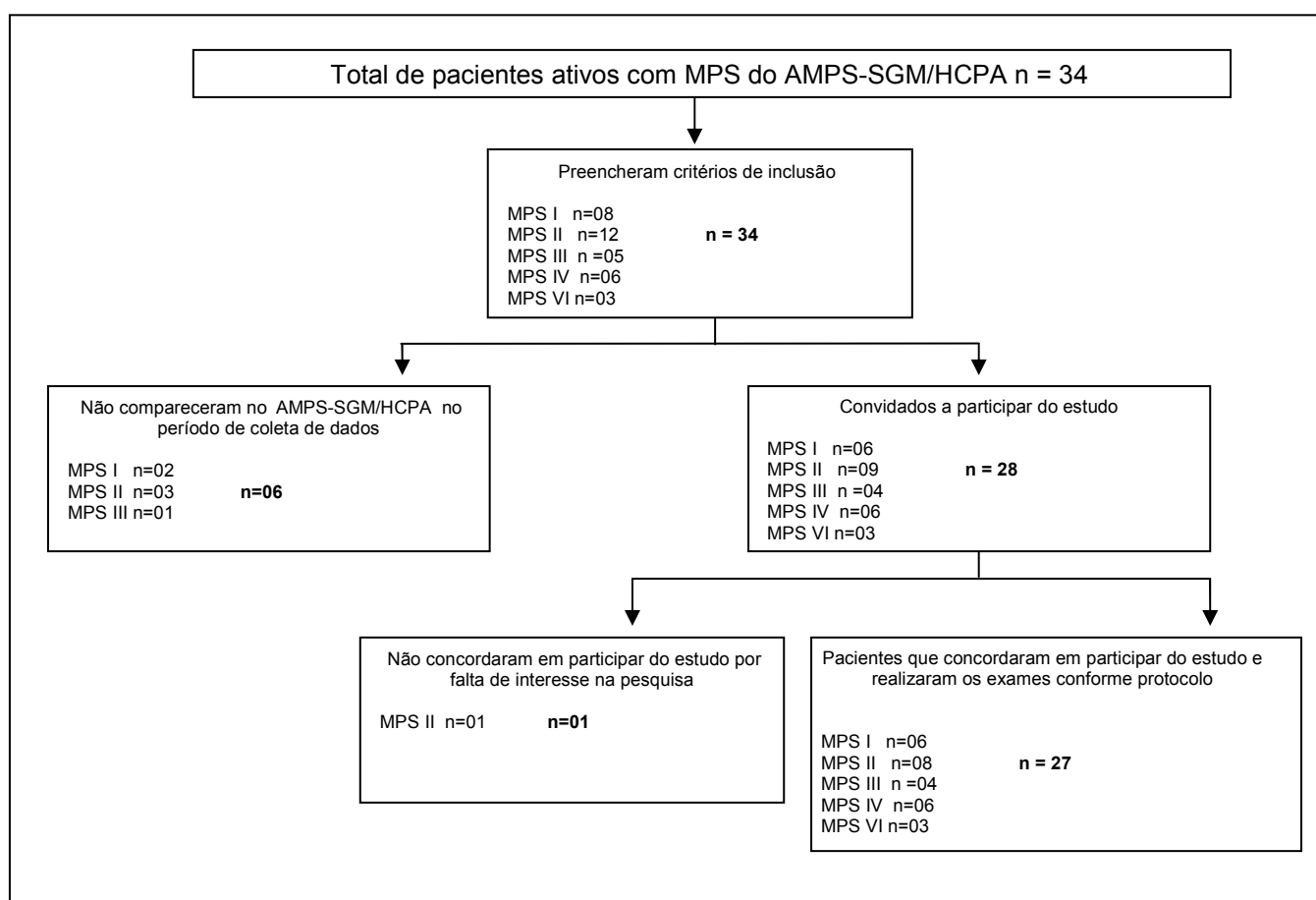
A população do estudo foi constituída de pacientes com diagnóstico bioquímico ou molecular de diversos qualquer tipo de MPS, que estivessem ou não em Tratamento de Reposição Enzimática (TRE), que não se enquadrassem nos critérios de exclusão e que concordassem em participar do protocolo do estudo mediante assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE I).

### **5.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO**

Foram critérios de exclusão do estudo a impossibilidade de realizar os testes previstos no protocolo, assim como a não concordância do paciente, pais e/ou representantes legais em participar do estudo.

## 5.5 TAMANHO DA AMOSTRA

Sendo a MPS uma doença rara, a amostra do presente estudo foi de conveniência, não foi, portanto, calculado o tamanho amostral. A amostra foi selecionada a partir da figura abaixo:



**Figura 2.** Algoritmo da seleção da amostra do presente estudo.

## 5.6 VARIÁVEIS

### 5.6.1 Sócio-demográficas

Dados sobre a caracterização da amostra, tais como data de nascimento, idade, sexo, procedência, consanguinidade dentre outras variáveis foram obtidos por meio de revisão de prontuário e registrados em formulário específico (APÊNDICE II).



### 5.6.2 Dados Dietéticos – Consumo de Cálcio

Foi verificado por meio de inquérito alimentar (recordatório 24 horas) (APÊNDICE III) aplicado ao paciente ou aos acompanhantes em caso de crianças menores de 12 anos, e registrado em formulário específico (APÊNDICE IV, página 168).

O Recordatório 24 horas pode ser considerado o instrumento mais usado para avaliação da ingestão de alimentos, nele são vistos os alimentos e quantidades dos mesmos consumidos no dia anterior à entrevista. A precisão da informação depende da memória e cooperação do entrevistado, como também da capacidade do entrevistador de estabelecer comunicação que obtenha a informação através do diálogo. As crianças a partir de 12 ou 13 anos tem capacidade de responder a entrevista, sem a ajuda de adultos, com precisão (FISBERG et al., 2005).

O inquérito alimentar (recordatório de 24h) foi realizado/aplicado por uma nutricionista treinada e capacitada em uma sala específica do AMPS-SGM/HCPA.

O consumo de Cálcio foi obtido com o auxílio do programa de apoio a nutrição *DietWin* Versão Profissional – 2011. Os valores de referência para ingestão de cálcio estão descritas na tabela abaixo conforme faixa etária.

Tabela 3. Recomendações Dietética Diárias de Cálcio - RDA

Recomendações Dietética Diárias de Cálcio - RDA	
Estágio da Vida	Cálcio (mg/dia)
<b>Bebês</b>	
0a 6 meses	210
7 a 12 meses	270
<b>Crianças</b>	
1 a 3 anos	500
4 a 8 anos	800
<b>Homens</b>	
9 a 13 anos	1.300
14 a 18 anos	1.300
19 a 30 anos	1.000
31 a 50 anos	1.000
51 a 70 anos	1.200
□ 70 anos	1.200
<b>Mulheres</b>	
9 a 13 anos	1.300
14 a 18 anos	1.300
19 a 30 anos	1.000
31 a 50 anos	1.000
51 a 70 anos	1.200
□ 70 anos	1.200

Fonte: Food and Nutrition Board. Institute of Medicine. National Academies, 2000

### 5.6.3 Estado Nutricional

#### 5.6.3.1 Avaliação Antropométrica

Os dados antropométricos foram aferidos em um único momento durante o estudo. O peso foi obtido através da balança eletrônica digital marca Toledo®, com capacidade máxima de 200Kg e sensibilidade de 100g. Os pacientes foram pesados com o mínimo de roupa possível, com os pés descalços e unidos no centro da balança, eretos e com os braços estendidos ao longo do corpo. A altura dos pacientes foi realizada através de estadiômetro fixado na parede com comprimento de 2m e escala de 0,1 cm. Para aferir a altura os pacientes foram posicionados de costas para o estadiômetro, descalços, sem adereços na cabeça, com os pés unidos e braços estendidos ao longo do corpo, eretos e com olhar para o horizonte. As técnicas para aferição de altura e peso são preconizadas por Jelliffe (JELLIFFE, 1968).

Para a avaliação dos dados antropométricos de pacientes menores de 19 anos foi utilizado o *Software WHO Anthro Plus*® versão 1.0.4 de 2009, determinando os percentis para o indicador de IMC por idade (IMC/I); e para os pacientes maiores de 19 anos foi calculado o IMC com massa corporal expressa em quilogramas e a estatura em metros quadrados. Os valores encontrados de tais dados foram classificados de acordo com o preconizado pela WHO (2007) e WHO (1995), respectivamente.

Essas medidas foram aferidas no Centro de Pesquisa Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CPC/HCPA) e realizadas por um único observador, nesse caso, a nutricionista e também autora do trabalho.

#### **5.6.3.2 Avaliação da Composição Corporal – Bioimpedância Elétrica**

Foi avaliada a composição corporal dos pacientes através da Bioimpedância Elétrica (BIA). A BIA é um exame de alta precisão e não invasivo, proporcionando uma medida direta da impedância corporal através da resistência, reactância e ângulo de fase do paciente.

Essa avaliação estima diversos parâmetros da composição corporal como massa gorda, massa magra, massa intra e extracelular, relação entre massa intra e extracelular, água corporal total, água intra e extracelular, índice de massa corporal (IMC) e taxa de metabolismo basal (TMB).

Foram incluídos no estudo pacientes com Mucopolissacaridoses atendidos no AMPS-SGM/HCPA, com idade  $\geq 10$  anos e que possuíam condições adequadas para realização do exame. Os critérios de exclusão foram: pacientes grávidas, portadores de marcapasso, pacientes com idade  $\leq 09$  anos, a impossibilidade de realizar o exame de BIA (paciente inquieto e/ou agitado), paciente não compareceu no AMPS-

SGM/HCPA no período de coleta de dados assim como a não concordância do paciente, pais e/ou representantes legais em participar do estudo.

No presente estudo foi utilizado o aparelho de Bioimpedância Biodynamics Modelo 450, marca registrada da *Biodynamics Corporation*® nos Estados Unidos. A precisão do mesmo é de 0,1% na Resistência, 0,2% na Reactância e 0,2% no ângulo de fase. O aparelho emite uma corrente elétrica subliminar de baixa intensidade (80 mA – 50 kHz), atendendo as exigências da *Association for Advancement of Medical Instrumentation* (ES-1988).

Para se obter uma boa precisão no teste, os pacientes foram orientados quanto:

1. Evitar consumo de álcool, cafeína (café, chá, chocolate) 24 horas antes do teste;
2. Não realizar atividade física intensa 24 horas antes do teste;
3. Estar de jejum de 4 horas;
4. Retirar metais (brinco, colar, anel, pulseira, piercing e adornos em geral) ;
5. Suspender medicação diurética 24 horas antes do teste, exceto no caso de indivíduos hipertensos, que devem estar sob rigoroso controle médico.

As medidas para esse teste foram aferidas uma única vez com o paciente deitado, em decúbito dorsal, posição confortável e relaxado. Os braços foram afastados do tronco em um ângulo de 30°, e as pernas foram afastadas entre si, formando um ângulo de aproximadamente 45°, segundo orientações do fabricante. De acordo com a descrição internacional da técnica, os 04 eletrodos foram posicionados sobre a pele desinfetada e seca, em locais previamente padronizados: **Pé Direito:** O eletrodo distal

na base do dedo médio e o eletrodo proximal um pouco acima da linha da articulação do tornozelo, entre os maléolos medial e lateral; **Mão direita:** O eletrodo distal na base do dedo médio e o eletrodo proximal um pouco acima da linha da articulação do punho, coincidindo com o processo estiloide. Procedeu-se então a realização do exame e o aparelho já fornecia o percentual de gordura diretamente.

Esse método baseia-se na condução de uma corrente elétrica de baixa intensidade através do corpo. A impedância ou resistência ao fluxo da corrente elétrica é medida pela bioimpedância elétrica. Como a impedância varia de acordo com o tecido que está sendo mensurado e, sendo a massa magra um bom condutor de energia (baixa resistência à corrente) por possuir alta concentração de água e eletrólitos e a massa gorda um mal condutor de energia (alta resistência à corrente), pode-se dizer que a impedância é diretamente proporcional ao percentual de gordura corporal.

Tomou-se como parâmetro o percentual de massa gorda fornecido pelo aparelho, através de equações já programadas pelo fabricante no próprio instrumento.

Como não temos valores referencias para o percentual de gordura em pacientes com mucopolissacaridose, esses valores serão descritivos e serão feitas considerações e análises de punho nutricional para interpretação dos resultados. Quando não existem valores de referência para uma população específica, a comparação com padrões alheios impõe limitações que se prendem com diferenças relativas a fatores nutricionais e ambientais (PINTO et al,2005 ; SAFAK et al, 1998).

A realização e avaliação da Bioimpedância Elétrica foi realizada no Centro de Pesquisa Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre por um único observador, nesse caso, a nutricionista e também autora do trabalho.

#### 5.6.4 Avaliação Bioquímica

A avaliação bioquímica tem como objetivo identificar possíveis causas dos sintomas gastrointestinais dos pacientes para melhor compreender sua etiologia.

A avaliação bioquímica dos pacientes foi realizada através da solicitação dos exames abaixo relacionados via AGH - HCPA pela médica colaboradora do estudo e foram registradas em formulário específico (APÊNDICE II). Os seguintes testes compõem a avaliação bioquímica do presente estudo:

- **Dosagem da excreção urinária de GAGs:** Os GAGs foram coletados e analisados a partir de uma amostra ocasional de urina. A análise foi realizada no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do SGM/HCPA (LREIM) de acordo com as técnicas padrão já estabelecidas (de JONG et al., 1992). Os valores normais de referência estabelecidos para os GAGs pelo LREIM estão elucidados na tabela 4.

- **Hemograma:** O hemograma foi obtido através de equipamento de automação XZ - 2100 ou XE - 2100 da Sysmex no Serviço de Patologia Clínica do HCPA. Foram verificados hemoglobina, hematócrito e volume corpuscular médio (VCM). Os valores de referência estão descritos na tabela 5.

- **Albumina:** A Albumina foi obtida através de método colorimétrico utilizando Verde de Bromocresol em equipamento modular P da Roche no Serviço de Patologia Clínica do HCPA. Os valores de referência utilizados estão descritos na tabela 6. Segundo Duarte e Castellani (2002) a albumina é uma proteína de síntese hepática, a sua deficiência pode ter relação com a desnutrição, por isso, a dosagem da mesma faz parte da avaliação do estado nutricional.

- **Ferritina:** A ferritina foi obtida através de método de quimioluminescência em equipamento Centaur XP no Serviço de Patologia Clínica do HCPA. Os valores de

referencia utilizados foram: Homens: 22 – 322 ng/mL e Mulheres: 10 – 291 ng/mL (Fonte: Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre). A ferritina é uma proteína de síntese hepática e seu excesso e/ou deficiência pode ter relação com doenças inflamatórias, hemocromatose dentre outras, e anemia ferropifriva, respectivamente.

- **Imunoglobulina IgA:** A IgA foi obtida através de método de imunoturbidimetria em equipamento Advia 1800 no Serviço de Patologia Clínica do HCPA. Os valores de referência utilizados foram: Intervalo Normal: 40 – 350 mg/dL e deficiência de IgA:  $\leq$  10mg/dL (Fonte: Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre). A IgA é um anticorpo predominante no intestino, e sua deficiência pode acarretar em infecções microbianas e bacterianas.

- **Imunoglobulina IgA Anti-transglutaminase:** A IgA Anti-transglutaminase foi obtida através de método enzima imuno ensaio em laboratório terceirizado vinculado com o Serviço de patologia clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Os valores de referência utilizados estão ilustrados na tabela 7. Esse exame foi realizado como diagnostico diferencial para a diarreia, uma vez que a IgA Anti-transglutaminase é um marcador altamente específico para a Doença Celíaca.

- **Proteína C Reativa (PCR):** A PCR foi obtida através de método de turbidometria em equipamento Advia 1800 no Serviço de Patologia Clínica do HCPA. Os valores de referência utilizados estão ilustrados na tabela 8. Esse exame foi realizado como triagem de doenças inflamatórias intestinais.

- **Velocidade de sedimentação glomerular (VSG):** A VSG foi obtida de acordo com as técnicas padrão já estabelecidas no Serviço de Patologia Clínica do HCPA. Os valores de referência utilizados estão ilustrados na tabela 9. Esse exame foi realizado como triagem de doenças inflamatórias intestinais.

- **Alfa – 1 – antitripsina fecal:** A alfa – 1 – antitripsina fecal foi obtida pelo método de nefelometria em laboratório terceirizado (Laboratório Balague, São Paulo, Brasil) vinculado com o Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Os valores de referência utilizados são: Normal: Inferior a 0,3 mg/g fezes. A alfa-1-anti-tripsina nas fezes é uma proteína resistente à degradação pelas enzimas digestivas, sendo utilizada como marcador endógeno da perda proteica pelo tubo digestivo. Esse exame foi realizado no presente estudo como triagem para a doença de enteropatia perdedora de proteínas.

- **Anticorpos Anticitoplasma de Neurófilos (ANCA):** Esse exame foi obtido pelo método Imunofluorescência Indireta em laboratório de apoio vinculado com o Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Os valores de referência utilizados são: Normal: Não reagente (Referencia: Serviço de patologia clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre). Esse exame foi realizado no presente estudo como triagem para a Retocolite Ulcerativa.

- **Anticorpos IgG anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA):** Os anticorpos IgG anti-ASCA foram detectados pelo método de ELISA, utilizando kit comercial da ORGENTEC (*Kit ASCA ORGENTEC; ALKA SCHEBO*) conforme protocolo do fabricante, com o auxílio do Centro de Pesquisa Experimental (CPE) do SGM/HCPA. Esse teste permite a quantificação de autoanticorpos contra manana de *Saccharomyces cerevisiae* em soro ou plasma humano. Os resultados foram expressos como unidades arbitrárias (U) e os valores de referência utilizados foram de  $< 10$  U/ml para normal e de  $\geq 10$  U/ml para positivo. Os resultados foram calculados através de regressão não-linear de quatro parâmetros utilizando a densidade óptica média a 450 nm e as concentrações dos padrões fornecidos pelo kit, conforme recomendações do fabricante. Esse exame foi realizado no presente estudo como triagem para a Doença de Crohn.



- **Elastase – 1 fecal (E1):** A quantificação da elastase pancreática nas amostras de fezes foi realizada pelo método de ELISA, utilizando o kit comercial ELISA Elastase Pancreática ELISA (*Kit ELASTASE PANCREÁTICA 1 FECAL; BIOSERV DIAGNOSTICS*), segundo recomendações do fabricante, com o auxílio do Centro de Pesquisa Experimental (CPE) do SGM/HCPA. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}$  de elastase por g de fezes e foram calculados por regressão linear de quatro parâmetros utilizando a absorbância média em 450 nm e a concentração dos padrões fornecidos pelo kit, conforme protocolo do fabricante. Os valores de referência utilizados foram:  $> 200 \mu\text{g}$  elastase/g de fezes para função pancreática exócrina normal;  $100 - 200 \mu\text{g}$  elastase/g de fezes para insuficiência pancreática exócrina moderada; e  $< 100 \mu\text{g}$  elastase/g de fezes para insuficiência pancreática exócrina grave.

É importante ressaltar que os exames dosagem de GAGs na urina, albumina, ferritina, hemograma, velocidade de sedimentação glomerular (VSG), Proteína C Reativa (PCR) e imunoglobulina IgA são exames realizados dentro da rotina padrão de atendimento do AMPS-SGM-HCPA, conforme consultas habituais dos pacientes. Os demais exames foram realizados para fins do presente estudo, juntamente com o auxílio do Serviço de Patologia Clínica e o Serviço de Hepatologia e Gastroenterologia do HCPA.

**Tabela 4:** Valores de referência de GAGs urinários pela faixa etária:

<b>Idade</b>	<b>Mg/mmol/Creatina</b>	<b>µg/mg/Creatina</b>
< 6 meses	15 – 52	133 – 460
< 1 ano	15 – 31	133 – 274
< 2 anos	09 – 29	79 – 256
< 3 anos	7,7 – 21,3	68 -188
< 5 anos	7,6 – 14	67 – 124
< 7 anos	06 – 13	53 – 115
< 9 anos	05 – 12	44 – 106
< 14 anos	03 – 11	26 – 97
< 18 a 20 anos	1,5 – 6,7	13 – 59
> 18 a 20 anos	1,5 – 5,1	13 – 45

Fonte: Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do SGM/HCPA

**Tabela 5 -** Valores de referência hemograma

<b>Idade</b>	<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	<b>Hematócrito (%)</b>	<b>VCM (fL)</b>
6 meses a 2 anos	10,5 a 13,5	33 a 39	70 a 86
2 a 6 anos	11,5 a 13,5	34 a 40	75 a 87
6 a 12 anos	11,5 a 15,5	35 a 45	77 a 95
12 a 18 anos homem	13,0 a 15,5	37 a 49	78 a 98
12 a 18 anos mulher	12,0 a 16,0	36 a 46	78 a 102
Adultos Homens	13,5 a 17,5	41 a 53	80 a 100
Adultos Mulheres	12,0 a 16,0	36 a 46	80 a 100

Fonte: Serviço de patologia clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

**Tabela 6 -** Valores de referência albumina

<b>Classificação</b>	<b>Valor (mg/dL)</b>
Normal	> 3,5
Depleção Leve	3,0 – 3,5
Depleção Moderada	2,4 – 2,9
Depleção Grave	< 2,4

Fonte: Bottoni et al. (2001)

**Tabela 7** - Valores de referência Imunoglobulina IgA Anti-transglutaminase

<b>Classificação</b>	<b>Valor (U/mL)</b>
Não reagente	< 20 U/mL
Reagente	> 30 U/mL
Reagente Fraco	20 – 30 U/mL

Fonte: Serviço de patologia clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

**Tabela 8** - Valores de referência Proteína C Reativa (PCR)

<b>Classificação</b>	<b>Valor (mg/L)</b>
Não - Reagente	≤ 5,0
Reagente	≥ 5,0

Fonte: Serviço de patologia clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

**Tabela 9** - Valores de referência Velocidade de sedimentação glomerular (VSG)

<b>Classificação</b>	<b>Idade</b>	<b>Valor (mm)</b>
Crianças/Adolescentes	0 a 16 anos	0 - 10
	17 a 50 anos	0 – 10
Homens	51 a 60 anos	0 – 12
	61 a 70 anos	0 – 14
	> 70 anos	0 – 30
	17 a 50 anos	0 -12
Mulheres	51 a 60 anos	0 – 19
	61 a 70 anos	0 – 20
	> 70 anos	0 – 35
	17 a 50 anos	0 -12

Fonte: Serviço de patologia clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

### 5.6.5 Teste Molecular de Hipolactasia Primária

Os testes de biologia molecular foram realizados no Centro de Terapia Gênica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, por uma equipe capacitada, treinada e qualificada. A presença das mutações C/T – 13910 foi identificada a partir de amostras de DNA existentes e devidamente armazenada no Serviço de Genética

Médica do HCPA, os quais fazem parte de um projeto paralelo, realizado dentro do SGM/HCPA, intitulado “REDE MPS BRASIL: Um estudo clínico, epidemiológico, bioquímico e molecular com impacto no diagnóstico, manejo e prevenção”, aprovado pelo CEP/HCPA sob o número 03-066.

A análise foi realizada através da técnica de PCR – Reação em cadeia da Polimerase. O DNA foi extraído através de Kit comercial de extração (*Easy-DNA*<sup>TM</sup>, Invitrogen). O DNA foi utilizado exclusivamente para este estudo, sendo posteriormente descartado. Medidas adicionais de prevenção do anonimato dos participantes foram tomadas pela codificação das amostras de DNA. As reações de amplificação foram realizadas em aparelho termociclador do tipo *Eppendorf Personal Cycler* e cada reação foi composta de 30 ciclos e 90 segundos e temperatura de anelamento de 56°C.

Após a reação de PCR, o produto da mesma foi verificado em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio. Uma vez que houve a confirmação da amplificação da seqüência pretendida, foi realizada a digestão enzimática.

A digestão foi realizada através das enzimas de restrição BsmFI (New England Biolabs) para a mutação C/T-13910 e HhaI (Invitrogen) para a mutação G/A-22018 nas seguintes condições: 16 µL de água, 3 µL de tampão, 1 µL de enzima de restrição e 10 µL de produto de PCR por 4 horas a 65° C e 37° C, respectivamente.

O resultado foi verificado por eletroforese em gel de agarose a 2% e assim foi possível constatar a presença ou não das mutações C/T-13910 e G/A-22018.

De acordo com os resultados da análise molecular os indivíduos foram classificados em (APÊNDICE V):

Genótipo CC = Lactase não persistente (intolerância a lactose)

Genótipo CT ou TT = lactase persistente (tolerância a lactose)

### **5.6.6 Análise Histológica da Mucosa Intestinal de um modelo de camundongo com e sem MPS I**

O intestino delgado de camundongos de 8 a 10 meses normais ou nocautes para o gene da alfa-L-iduronidase (camundongos MPS I) foram analisados por histologia pelas colorações de Hematoxilina-Eosina (HE), PAS e Alcian Blue. O material biológico foi coletado anteriormente para o projeto N° GPPG 09-420.

As amostras foram processadas no Centro de Terapia Gênica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Após sacrifício do animal, as amostras de intestino delgado e grosso foram fixadas em fomalina 10% para preservação do material. Após essa etapa, os mesmos foram desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico. Posteriormente, os tecidos foram imersos na parafina a uma temperatura de 56 a 60° C (parafina fundida) até o tempo necessário para a completa impregnação. Após, os blocos foram deixados à temperatura ambiente até que a parafina endurecesse. A partir dos blocos de parafina com o tecido, foi realizada a microtomia com espessura média de 4 micrometros para a confecção das laminae em coloração HE, PAS e Alcian Blue, de acordo com processos de rotina do hospital. As análises foram realizadas por meio de um microscópio óptico por uma médica patologista treinada e capacitada, no setor de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

### **5.7 PLANO DE COLETA**

Os pacientes foram convidados a participar do estudo durante uma das consultas rotineiras no AMPS-SGM/HCPA, sendo que a inclusão dos mesmos foi realizada somente após a assinatura dos TCLE. O critério de inclusão foi à existência de diagnóstico bioquímico e/ou molecular de qualquer tipo de MPS, que estavam ou não em Tratamento de Reposição Enzimática (TRE).

Os pacientes vieram ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre para uma consulta habitual no Ambulatório de MPS do Serviço de Genética Médica com o seu médico. Nessa consulta, os pacientes preencheram um inquérito alimentar (Recordatório de 24h) onde tiveram o suporte de uma nutricionista treinada e qualificada para maiores esclarecimentos, e também foram questionados quanto aparecimento de sintomas gastrointestinais ao longo de suas vidas.

No término da consulta, os pacientes foram encaminhados para o Centro de Pesquisa Clínica do HCPA para realizarem a coleta de sangue para os exames bioquímicos, receberam instruções para a coleta das fezes e aqueles pacientes aptos e capazes também realizaram a avaliação da composição corporal via Bioimpedância.

Após esses procedimentos, os pacientes foram liberados e podiam voltar para as suas casas. O tempo necessário para a realização de tais procedimentos variou de 30 minutos à uma hora aproximadamente.

Todos os inquéritos alimentares e a avaliação de Bioimpedância foram realizados pela autora do estudo, previamente capacitada e treinada. As coletas de sangue foram realizadas por um coletador contratado do Centro de Pesquisa Clínica do HCPA, treinado para tal tarefa.

A extração de DNA, técnica da Reação em Cadeia da Polimerase, as análises histológicas da mucosa intestinal de um modelo de camundongo com e sem MPS I foram realizadas no Centro de Terapia Gênica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, juntamente com o Serviço de Patologia do HCPA.

Os desfechos foram avaliar os sintomas gastrointestinais dos pacientes do AMPS-SGM/HCPA quanto aos seguintes parâmetros: teste molecular para análise de mutações no gene da lactose, valores de GAGs, IgA, IgA anti-transglutaminase, PCR, VGS Elastase-1-fecal, alfa-1-anti-tripsina fecal, hemograma, ferritina, albumina,

avaliação da composição corporal via Bioimpedância, recordatório alimentar 24h, questionário de sintomas gastrointestinais e análise histológica intestinal em um modelo de camundongo com e sem MPS.

## **5.8 ANÁLISE DOS DADOS**

Os dados foram armazenados em Software Microsoft® Excel e analisados posteriormente. Para análise estatística foi utilizado o Programa *Statistical Package for Social Sciences*, versão 18.0 (SPSS Inc, Chicago, IL).

As variáveis categóricas foram apresentadas como frequências e percentuais e as variáveis contínuas como média  $\pm$  desvio padrão e mediana com intervalo interquartis. O teste do Qui-quadrado foi empregado para testar a associação entre as variáveis categóricas. Quando necessário foi aplicado outros testes não paramétricos para a associação entre as variáveis. Os resultados do estudo foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

## **5.9 ASPECTOS ÉTICOS**

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HCPA sob o número 12-0259. Os pacientes e/ou seus representante legal do AMPS-SGM/HCPA assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE I) antes de qualquer procedimento do estudo.

## 6. REFERÊNCIAS

1. APPLGARTH, D.A.; TONNE, J.R.; LOWRY, R.B. Incidence of inborn errors of metabolism in British Columbia, 1969-1996. **Pediatrics.**, v. 105, n.1, p.10-14, 2000.
2. AROLA, H., TAMM, A. Metabolism of lactose in the human body. **Scand J Gastroenterol**, v.29, suppl 202, p. 21-25, 1994.
3. AURICCHIO, L.N., PITCHUMONI, C.S. Lactose intolerance. Postgraduate Medicine. . **Postgraduate Medicine**, v. 95, p. 113-120, 1994.
4. AURICCHIO, S., TRONCONE, R. Genetically determined disaccharidase deficiencies. In: WALKER, W.A., DURIE, P., HAMILTON, J.R., WALKER-SMITH, J.Á., WATKINS, J.B., eds. **Pediatric Gastrointestinal Disease**. Ontario: BC Decker Inc, p. 677-700, 2000.
5. BALLABIO, A.; GIESELMANN, V. Lysosomal disorders: from storage to cellular damage. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1793, n. 4, p. 684-96, 2008.
6. BALDO, G., WU, S., HOWE, R.A., RAMAMOOTHY, M., KNUTSEN, R.H., FANG, J., MECHAM, R.P., LIU, Y., WU, X., ATKINSON, J.P., PONDER, K.P. Pathogenesis of aortic dilatation in mucopolysaccharidosis VII mice may involve complement activation. **Mol Genet Metab.**, v.104, s.4, p. 608-19, 2011.
7. BANECKA-JAKÓBKIEWICZ, J., WÉGRZYN, A., WÉGRZYN, G. Substrate deprivation therapy: a new hope for patients suffering from neuronopathic forms of inherited lysosomal storage diseases. **J Appl Genet** , v. 48, n.4, p. 383–388, 2007.  
BECK, M. New therapeutic options for lysosomal storage disorders: enzyme replacement, small molecules and gene therapy. **Hum Genet**, v. 121, n. 1, p, 1-22, 2007.
8. BHAUMIK, M., MULLER, V.J., ROZAKLIS, T., JOHNSON, L., DOBRENIS, K., BHATTACHARYYA, R., WURZELMANN, S., FINAMORE, P., HOPWOOD, J.J., WALKLEY, S.U., STANLEY, P. A mouse model for mucopolysaccharidosis type III A (MPS IIIA). **Glycobiology** , v. 9, p. 1389–1396, 1999.
9. BRAULIN, E.A., HARMATZ, P.R., SCARPA, M., FURLANETTO, B., KAMPMANN, C., LOEHR, J.P., PONDER, K.P., ROBERTS, W.C., ROSENFELD, H.M., GIUGLIANI, R. Cardiac disease in patients with mucopolysaccharidosis:



presentation, diagnosis and management. **J Inherit Metab Dis.**, v. 34, s. 6, p. 1183-97, 2011.

10. BODE L., MURCH, S., FREEZE, H.H. Heparan sulfate plays a central role in a dynamic in vitro model of protein-losing enteropathy. **J Biol Chem**, v. 281, p. 7809–15, 2006.

11. BOELENS, J.J. Trends in haematopoietic cell transplantation for inborn errors of metabolism. **J Inherit Metab Dis.**, v. 29, n. 2-3, p. 413-20, 2006.

12. BOTTONI, A. et al. Avaliação Nutricional: Exames Laboratoriais. In: WAITZBERG, D. L. **Nutrição Oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica**, 3º ed., p. 279-294, 2001.

13. BULHÕES, A.C., GOLDANI, H.A.S., OLIVEIRA, F.S., MATTE, U.S., MAZZUCA, R.B., SILVEIRA, T.R. Correlation between lactose absorption and the C/T-13910 and G/A-22018 mutations of the lactase-phlorizin hydrolase (LCT) gene in adult-type hypolactasia. **Braz J Med Biol Res.** V. 40, p.1441-6, 2007.

14. BURGIO, R.G., FLATZ, G., BARBERA, C., PATANÉ, R., BONNER, A., CAJPZZO, C., et al. Prevalence of primary adult lactose malabsorption and awareness of milk intolerance in Italy. **Am J Clin Nutr** v., 39, p. 100-4, 1984.

15. BRUMMER, R.J.M, KARIBE, M., STOCKBRÜGGER, R.W. Lactose malabsorption. **Scand J Gastroenterol** , v. 28, suppl 200, p. 65-69, 1993.

16. CHAMPE, P., HARLEY, R. Metabolismo das Monossacarídeos e Dissacarídeos. In.:CHAMPE, P., HARVEY, R. **Bioquímica Ilustrada**. Porto Alegre: Artes Médicas, p.139, 1997.

17. CLARKE, L.A., RUSSELL, C.S., POWNALL, S., WARRINGTON, C.L., BOROWSKI, A., DIMMICK, J.E., TOONE, J., JIRIK, F.R. Murine mucopolysaccharidosis type I: targeted disruption of the murine alpha-L-iduronidase gene. **Hum Mol Genet**, v. 6, c. 4, p. 503-11, 1997.

18. CLOAREC, D., GOUILLOUND, S., BORNET, F., BRULEY DES VARANNES, S., BIZAIS, Y., GALMICHE, J.P. Lactase deficiency and lactose intolerance-related symptoms in adult healthy subjects from western France. **Gastroenterol Clin Biol.**, v. 15, p. 588-93, 1991.

19. COX-BRINKMAN, J., SMEULDERS, M. J.C., HOLLAK, C. E. M., WIJBURG, F. A. Restricted upper extremity range of motion in mucopolysaccharidosis type I: no response to one year of enzyme replacement therapy. **J Inherit Metab Dis**, v. 30, p. 47–50, 2007.
20. DI STEFANO, M., TERULLA, V., TANA, P., MAZZOCCHI, S., ROMERO, E., CORAZZA, G.R. Genetic test for lactase non-persistence and hydrogen breath test: is genotype better than phenotype to diagnose lactose malabsorption? **Dig Liver Dis.**, v.41, p. 474-9, 2009.
21. ELSNER, B. Ultrastructure of the rectal wall in Hunter's syndrome. **Gastroenterology**, v. 58, p. 856–862, 1970.
22. ENATTAN, N.S., TRUDEAU, A., PIMENOFF, V., MAIURI, L., AURICCHIO, S., GRECO, L., et al. Evidence of still-ongoing convergence evolution of the lactase persistence T-13910 alleles in humans. **Am J Hum Genet.**, v.81, p. 615-25, 2007.
23. EVERS, M., SAFLIG, P., SCHMIDT, P., HAFNER, A., MCLOGHLIN, D.B., HESS, B., VON FIGURA, K., PETERS, C. Targeted disruption of the arylsulfatase B gene in mice resembling the phenotype of mucopolysaccharidosis VI. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 93, c. 16, p. 8214-9, 1996.
24. FEDERHEN, A. **Mucopolisacaridoses: a repercussão da doença na dinâmica familiar**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal Rio Grande do Sul. Faculdade de Enfermagem. Porto Alegre, 2009.
25. FISBERG, R., M. et al. Recomendações Nutricionais. In FISBERG, R., M. **Inquéritos Alimentares: métodos e bases científicos**, Barueri, SP: Manole, 2005b.
26. FLATZ, G., HOWELL, J.N., DOENCH, J., FLATZ, S.D. Distribution of physiological adult lactase phenotypes, lactose absorber and malabsorber, in Germany. **Hum Genet.** , v. 62, p. 152-7, 1982.
27. GIUGLIANI, R.; SCHWARTZ, I. MPS Brazil Network: an alternative approach to improve diagnosis of metabolic disorders in developing countries. **J Metab Genet**. 2006 (In Press).
28. HARMATZ, P., GIUGLIANI, R., SCHWARTZ, I., GUFFON, N., TELES, E.L., MIRANDA, C.S., WRAITH, E., BECK, M., ARASH, L., SCARPA, M., YU, Z.F., WITTES, J., BERGER, K.I., NEWMAN, M.S., LOWE, A.M., KAKKIS, E.,

SWIEDLER, S.J. and MPS Study Group. Enzyme Replacement Therapy for Mucopolysaccharidosis VI: A Phase 3, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multinacional Study of Recombinant Human N-Acetylgalactosamine4-Sulfatase (Recombinant Human Arylsulfatase B or RhASB) and Follow-on Open-label Extension Study. **The Journal of Pediatrics**, v. April, p.533-539, 2006.

29. HARMATZ, P. Entering a new treatment age for mucopolysaccharidosis VI disease: a search for better markers of disease progression and response to treatment - O início de uma nova era no tratamento da mucopolissacaridose tipo VI: uma busca por melhores marcadores de evolução da doença e resposta ao tratamento. **Jornal de Pediatria**, v.84, n.2, p. 103-106, 2008.

30. HASKINS, M.E., Animal models for mucopolysaccharidosis disorders and their clinical relevance. **Acta Paediatrica Suppl**, v. 96, c., 455, p. 56-62, 2007.

31. HEITLINGER, L.A., LEBENTHAL, E. Distúrbios da digestão e da absorção dos carboidratos. **Clin Ped**, v. 2, p. 249-266, 1988.

32. HGMD® CARDIFF (Internet). Cardiff: The Human Gene Mutation Database at the Institute of Medical Genetics of Cardiff, Inc; Disponível em: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/> Acesso em: 10 Maio 2012.

33. JELLIFFE, D.B. Evolución del estado de nutrición de la comunidad. Genebra: OMS; 1968.

34. JORDAN, M.C., ZHENG, Y., RYAZANTSEV, S., ROZENGURT, N., ROOS, K.P., NEUFELD, E.F. Cardiac manifestations in the mouse model of mucopolysaccharidosis I. **Mol Genet Metab.**, v. 86, p. 233-43, 2005.

35. JUNG, S.C., PARK, E.S., CHOI, E.N., KIM, S.J., JIN, D.K. Characterization of a novel mucopolysaccharidosis type II mouse model and recombinant AAV2/8 vector-mediated gene therapy. **Mol Cells**, v. 30, c. 1, p. 13-8, 2010.

36. KARAM, S. M.; SCHWARTZ, I. V. D.; GIUGLIANI, R. Erros Inatos do Metabolismo: Introdução e Aspectos Clínicos. In: CARAKUSHANSKY, G. **Doenças Genéticas em Pediatria**, Rio de Janeiro, p. 153 – 158, 2001.

37. KHABAROVA, Y., TORNIAINEN, S., NURMI, H., JARVELA, I., ISOKOSKI, M., MATTILA, K. Prevalence of lactase persistent/non-persistent genotypes and milk

consumption in a young population in north-west Russia. **World J Gastroenterol** , v.; 15, p. 1849-53, 2009.

38. LABAYEN, I., GONZALEZ, A., LENOIR-WIJNKOOP, I., NUTR, R., MARTINEZ, J.A. Relationship between lactose digestion, gastrointestinal transit time and symptoms in lactose malabsorbers after dairy consumption. **Aliment Pharmacol Ther.** v. 15, p. 543-9, 2001

39. LEIS, R., TOJO, R., PAVÓN, P., DOUWES, A. Prevalence of lactose malabsorption in Galicia. **J Ped Gastroenterol Nutr**, v. 25, p. 296-300, 1997.

40. 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 modelo f sanfilippo syndrome type B produced by targeted disruption of the gene encoding alpha-N-\cetylglucosaminidase. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 96, c., 25, p. 14505-10, 1996.

41. LISKER, R. Herencia de mala digestión de lactosa. **Rev Invest Clin**, v. 48, p. 23-24, 1996.

42. LOMER, M.C.E., PARKES, G.C., SANDERSON, J.D. Review article: lactose intolerance in clinical practice - myths and realities. **Aliment Pharmacol Ther.**, v.27, p. 93-103, 2008.

43. MARTINS, AM. **Protocolo Brasileiro de Dietas: erros inatos do metabolismo**, 1º ed., São Paulo, p. 13 – 29, 2006.

44. MATTAR, R. Investigação laboratorial em gastroenterologia. In: MARTINS, M.A., CARRILHO, F.J., ALVES, V.A.F., CASTILHO, E.A., CERRI, G.G., WEN, C.L. **Clínica médica. Doenças do aparelho digestivo e doenças nutricionais**. Ed. Manole, v. 4, p.28-39, 2009.

45. MATTAR, R., MAZO, D.F.C. Intolerância à lactose: mudança de paradigmas com a biologia molecular. **Rev Assoc Med Bras**, v. 56, n. 2, p. 230-6, 2010.

46. MATTAR, R., MONTEIRO, M.S., VILLARES, C.A., SANTOS, A.F., CARRILHO, F.J. Single nucleotide polymorphism C/T-13910, located upstream of the lactase gene, associated with adult-type hypolactasia: validation for clinical practice. **Clin Biochem.**, v. 41, p. 628-30, 2008.

47. MATTE, U.S. **Caracterização molecular de pacientes com mucopolissacaridose tipo I: um estudo no Brasil.** Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Porto Alegre, 1998.
48. MEIKLE, P.J.; HOPWOOD, J.J.; CLAGUE, A.E.; CAREY W.F. Prevalence of lysosomal disorders. **JAMA**, v. 281, n.3, p. 244-54, 1999a.
49. METCALF, Ma. X., LINDERS, B., WU, S., SCHAMBACH, A., OHLEMILLER, K.K., KOVACS, A., BIGG, M., HE, L., TOLLESFSEN, D.M., PONDER, K.P. A self-inactivating gamma-retroviral vector reduces manifestations of mucopolysaccharidosis I in mice. **Mol Ther.** , v. 18, p. 334-42, 2010.
50. MOBASSALH, M., MONTGOMERY, R.H., BILLER, J.A., GRAND, J.R. Deselopment of Carbohydrate dosorption in the fetus and neonate. In.: FEBERBAUM, R., FALCÃO, M. **Nutrição do Recém Nascido.** São Paulo. Ed. Atheneu, .p. 42, 2003.
51. MUENZER, J. The Mucopolysaccharidoses: A heterogeneous group of disorders with variable pediatric presentations. **J Pediatric**, v.144, p. S27-S34, 2004.
52. MUENZER, J.; CUCSAVAS-CALIKOGLU, M.; MCCANDLESS, S.E.; SCHUETZ, T.J.; KIMURA, A. A phase I/II clinical trial of enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome). **Mol Genet Metab.**, v.90, n. 3, p. 329-37, 2007.
53. NELSON, J.; CROWHURST, J.; CAREY, B.; GREED, L. Incidence of the mucopolysaccharidosis in Western Australia. **Am J Med Genet.**, v.123A, n. 3, p. 310-3, 2003.
54. NEUFELD, E.F.; MUENZER, J. The Mucopolysaccharidoses. In: SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLE, D., editores. **The metabolic and molecular basis of inherited disease.** New York: MacGraw-Hill, p.3421-52, 2001.
55. NOSE, O., IIDA, Y., HARADA, T., OGAWA, M., YABUUCHI, H. Breath hydrogen test for detecting lactose malabsorption in infants and children. **Arch Dis Child** , v. 54, p. 436-40, 1979.
56. OHMI, K., GREENBERG, D.S., RAJAVEL, K.S., RYAZANTSEV, S., LI, H.H., NEUFELD, E.F. Activated microglia in cortex of mouse models of

mucopolysaccharidoses I and IIIB. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 100, s. 4, p. 1902-7, 2003.

57. **OMIN®** (Internet). United Kingdom: Online Mendelian Inheritance in Man® Baltimore: Johns Hopkins University Inc; Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omin>. Acesso em: 11 de Maio 2012.

58. PESSUTTO, F.D.B. **Detecção de mutações em pacientes com mucopolissacaridose tipo I**. Dissertação (mestrado). Universidade Federal Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Porto Alegre, 2007.

59. PINTO, L.L. **Avaliação de manifestações clínicas e laboratoriais em heterozigotas para mucopolissacaridose tipo II**. Tese (doutorado). Universidade Federal Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente. Porto Alegre, 2009.

60. PINTO, L.L. **Um estudo sobre a história natural das mucopolissacaridoses do tipo II (Síndrome de Hunter) em pacientes brasileiros**. Dissertação (mestrado). Universidade Federal Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. Porto Alegre, 2005.

61. PINTO, L.L.; SCHWARTZ, I.V.S.; PUGA, A.C.; VIEIRA, T.A.; MUNOZ, M.V.; GIUGLIANI, R. et al. Prospective study of 11 Brazilian patients with mucopolysaccharidosis II. **J Pediatr (Rio J)**, v. 82, p. 273-8, 2006.

62. PIOTROWSKA, E.; JAKÓBKIEWICZ-BANECKA, J.; BARANSKA, S.; TYLKISZYMANSKA, A.; CZARTORYSKA, B.; WEGRZYN, A.; WEGRZYN, G. Genistein-mediated inhibition of glycosaminoglycan synthesis as a basis for gene expression-targeted isoflavone therapy for mucopolysaccharidoses. **Eur J Hum Genet.**, v. 14, n. 7, p. 846-852, 2006.

63. PLATT, F.M.; WALKLEY, S.U. **Lysosomal Disorders of the Brain**. Great Britain: Oxford University Press, 2004.

64. POORTHIUS, B.J.; WEVERS, R.A.; KLEIJER, W.J.; GROENER, J.E.; DE JONG, J.G.; VAN WEELY, S. et al. The frequency of lysosomal storage in the Netherlands. **Hum Genet**, v. 105, n.1- 2, p. 151-6, 1999.

65. RIDEFELT, P., HÁKANSSON, L.D. Lactose intolerance:lactose tolerance test versus genotyping. **Scand J Gastroenterol.**, v. 40, p. 822-6, 2005.

66. ROBAYO-TORRES, C.C., QUEZADA-CALVILLO, R., NICHOLS, B.L. Dissaccharide digestion: clinical and molecular aspects. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 4, p. 276-87, 2006.
67. ROBERTS, A.L.K., HOWARD, G.S., LIAM, W.C., MORETTA, S., KRITAS, S., LYMN, K.A., YAZBECK, R., TRAN, C., FLETCHER, J.M., BUTLER, R.N., BYERS, S. Gastrointestinal Pathology in a Mouse Model of Mucopolysaccharidosis Type IIIA. **Journal of Cellular Physiology**, v. 219, p. 259-264, 2009.
68. ROSADO, J.I., GONZALES, C., VALENCIA, M.E., LOPEZ, P., PALMA, M., LÓPEZ B, et al. Lactose maldigestion and milk intolerance: a study in rural and urban Mexico using physiological doses of milk. **J Nutr**, v.124, p. 1052-9, 1994.
69. SAFAK, S.Y., TURGUT, H.B. Weight, Length, Head, and Face Measurements in Turkish Newborns of Central Anatolia. **Gazi Medical Journal**, v.9, p.116-20, 1998.
70. SAHI, T. The inheritance of selective adult-type lactose malabsorption. **Scand J Gastroenterol**, v.9, n. 30, p. 1-73, 1974.
71. SAHI, T., LAUNIALA, K. Hypolactasia and lactase persistence. Historical review and the terminology. **Scand J Gastroenterol**, v.29, suppl 202, p.1-6, 1994a.
72. SAKIYAMA, T. Mini review: animal model of human lysosomal storage disease. **Nihon Rinsho**, v. 53, n. 12, p. 3105-11, 1995.
73. SAÍNZ, C.M.; MUÑOZ, C.Z.; MONTEAGUDO, A.G.Q. Errores innatos del metabolismo: Enfermedades lisosomales. **Rev Cubana Pediatr**, v. 74, n.1, p. 68- 76, 2002.
74. SANDS, M.S., BIRKENMEIER, E.H. A single-base-pair deletion in the beta-glucuronidase gene accounts for the phenotype of murine mucopolysaccharidosis type VII. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v., 90, c., 14, p. 6567-71, 1993.
75. SAUDUBRAY, J.M. Clinical Approach to Inborn Errors of Metabolism in Paediatrics. In: SAUDUBRAY, J.M. BERGHE, G.V., WALTER, J.H. **Inborn Metabolic Diseases: Diagnosis and Treatment**. 5ª edição, Springer, p. 4-5, 2012.

76. SCRIVER, C. R. et al. **The metabolic and molecular bases of inherited disease**, 8° ed., New York, 2001.

77. SEVÁ-PEREIRA, A., SILVA, R.C.M.A., PEREIRA-FILHO, R.A. Medida do H<sub>2</sub> expirado no diagnóstico da má absorção de lactose. **Arq Gastroenterol**, v.36, p.18-26, 1999.

78. SIBILIO, M., MIELE, E., UNGANO, C., ASTARITA, L., TURCO, R., DI NATALE, P., PONTARELLI, G., VECCHIONE, R., ANDRIA, G., STAIANO, A., PARENTI, G. Chronic Diarrhea in Mucopolysaccharidosis IIIB. **J Pediatr Gastroenterol Nutr.**, v. 49, n.4, p. 477-80, 2009.

79. SOLIZ, A.; CHANDLER, B. D.; VASCONCELOS, E. The Enigmatic Baby: A Practical Approach to the Diagnosis of Inborn Errors of Metabolism. **International Pediatrics**, v. 22, n. 4, p. 192 – 196, 2007.

80. STONEKING, M. Single nucleotide polymorphisms from the evolutionary past. In.: ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P., VEIGA, A.B.G., et al. (trad.) **Biologia Molecular da Célula**. Porto Alegre: Artmed, p. 464-508, 2004.

81. TOMATSI, S., MONTANO, A.M., NISHIOKA, T., GUTIERREZ, M.A., PEÑA, O.M., TRANDA FIRESCU, G.G., LOPEZ, P., YAMAGUCHI, S., NOGUCHI, A., ORII, T. Mutation and polymorphism spectrum of the GALNS gene in mucopolysaccharidosis IVA (Morquio A). **Hum Mutat.**, v. 26, c. 6, p. 500-12, 2005.

82. VELLODI, A.; YOUNG, E.P.; COOPER, A.; WRAITH, J.E.; WINCHESTER, B.; MEANEY, C. et al. Bone marrow transplantation for mucopolysaccharidosis type I: experience of two British centers. **Arch Dis Child.**, v. 76, p. 92-99, 1997.

83. VIEIRA, T.; SCHWARTZ, I.V.S.; MUNOZ, V.; PINTO, L.; STEINER, C.; RIBEIRO, M. et al. Mucopolysaccharidoses in Brazil: what happens from birth to biochemical diagnosis? **Am J Med Genet.**, v.146<sup>a</sup>, n. 13, p. 1741-7, 2008.

84. VIEIRA, T.A. **História Natural das Mucopolissacaridoses: Uma Investigação da Trajetória dos Pacientes desde o Nascimento até o Diagnóstico**. Dissertação (mestrado). Universidade Federal Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas. Porto Alegre, 2007.



85. XU, L., SUN, H., ZHANG, X., , WANG, J., SUN, D., CHEN, F., et al. The -22018A allele matches the lactase persistence phenotype in northern Chinese populations. **Scand J Gastroenterol.**, v. 45, p.168-77, 2010.
86. WALKER-SMITH, J., MURCH, S. **Mechanisms of malabsorption and secretion. In: Diseases of the Small Intestine in Childhood.** 3<sup>a</sup> ed. Oxford: Isis Medical Media Ltd, p.63-86, 1999.
87. WALKEY, S.U. Pathogenic cascades in lysosomal disease-Why so complex? **J Inherited Metab Dis.**, v. 32, p. 181-9, 2009.
88. WANG, Y., HARVERY, C.B., PHILLIPS, A.D., POULTER, M., CLAY, P., et al. The geneticall programmed down-regulation of lactase in children. **Gastroenterology.** , v.114, p. 1230-6, 1998.
89. WANG, Y.,SHUKLA, C., LIU, X., SCHEB, TR., CLARKE, L.A..., BEDWELL, D.M., KEELING, K.M.. Characterization of an MPS I-H knock-in mouse that carries a nonsense mutation analogous to the human IDUA-W402X mutation. **Mol Geneti Metab**, v. 99, p. 62 – 71, 2010.
90. WEGRZYN,G., KURLEND, J., LIBEREK, A., et al. Atypical microbial infections of digestive tract may contribute to diarrhea in mucopolysaccharidosis patients: a MPS I case study. **BioMed Central.**, v.5, n.9, p. 1-5, 2005.
91. WRAITH, J.E.; CLARKE, J.T.R. The Mucopolysaccharidoses. In: BLAU, N.; HOFFMANN, G.F.; LEONARD, J.; CLARKE, J.T.R., editors. **Physician's Guide to the Treatment and Follow-up of Metabolic Diseases.** Berlin: Springer, p.195-203, 2006.
92. WRAITH, J.E.; CLARKE, L.A.; BECK, M.; KOLODNY, E.H.; PASTORES, G.M.; UENZER, J. et al. Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis I: a randomized,double-blind, placebocontrolled, multinational study of recombinant alpha-Liduronidase(Laronidase). **J Pediatr.**, v. 144, p. 581-588, 2004.
93. WRAITH, J.E.; SCARPA, M.; BECK, M.; BODAMER, A.O.; DE MEILEIR. L.; GUFFON, N. et al. Mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): a clinical review and recommendations for treatment in the era of enzyme replacement therapy. **Eur J Pediatr.**, v.167, p. 267-277, 2008.
94. WOLF, D.A., LENANDER, A.W., NAN, Z., BELUR, L.R., WHITLEY, C.B., GUPTA, P., LOW, W.C., MCLVOR, R.S. Direct gene transfers to the CNS prevents emergence of neurolocig disease in a murice model of mucopolysaccharidosis type I. **Neurobiol Dis.** , v.43, c. 1, p. 123-33, 2011.
95. ZAREBA, G. Idursulfase in Hunter syndrome treatment. **Drugs today.**, v.43, n.11, p. 759- 767, 2007.

## 7.ARTIGO 1 EM PORTUGUÊS

### **Manifestações Gastrointestinais em Pacientes com Mucopolissacaridoses**

Luciana Giugliani<sup>1</sup>, Carolina F. M. Souza<sup>2</sup>, Sandra M. G. Vieira<sup>3</sup>,

Guilherme Baldo<sup>4</sup>, Ursula Matte<sup>4</sup>, Rafael L. Maurer<sup>4</sup>,

Lúcia Maria Kliemann<sup>5</sup>, Roberto Giugliani<sup>1,2,6</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação na Saúde da Criança e do Adolescente, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

<sup>2</sup> Serviço de Genética Médica, HCPA, Porto Alegre, Brasil

<sup>3</sup> Laboratório Experimental de Gastroenterologia e Hepatologia, HCPA, Porto Alegre, Brasil

<sup>4</sup> Centro de Terapia Gênica, HCPA, Porto Alegre, Brasil

<sup>5</sup> Departamento de Patologia, FAMED, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

<sup>6</sup> Departamento de Genética, IB, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

#### **Autor Correspondente:**

Prof. Roberto Giugliani  
Serviço de Genética Médica  
Hospital de Clínicas de Porto Alegre  
Rua Ramiro Barcelos 2350  
Porto Alegre, RS 90035-903  
Brasil

Tel + 55 51 3359-8011

Fax + 55 51 3359 8010

Email: [rgiugliani@hcpa.ufrgs.br](mailto:rgiugliani@hcpa.ufrgs.br)

## Resumo

**Introdução:** As Mucopolissacaridoses (MPS) são doenças lisossômicas causadas pela deficiência de enzimas envolvidas na degradação dos glicoaminoglicanos (GAGs). O acúmulo anormal de GAGs compromete a função celular e orgânica, levando a um espectro de manifestações clínicas, de caráter multisistêmico e progressivo. Manifestações gastrointestinais têm sido frequentemente evidenciadas e relatadas por pacientes com MPS e ainda que esses sintomas sejam ofuscados pelos fenótipos neurológicos graves, eles podem afetar a qualidade de vida dos pacientes e seus familiares. **Objetivo:** Avaliar as manifestações gastrointestinais em pacientes com MPS e a histologia da mucosa intestinal em modelo de camundongos com MPS I. **Métodos:** Estudo transversal com amostragem de conveniência, incluindo pacientes com diagnóstico de qualquer tipo de MPS em relação ao status de Terapia de Reposição enzimática (TRE). Os sujeitos foram avaliados através de inquérito alimentar, questionamentos quanto ao aparecimento de sintomas gastrointestinais e realização de uma bateria de exames bioquímicos. Adicionalmente, foi realizado o teste molecular para hipolactasia primária a partir de amostras de DNA dos pacientes, assim como análise da histologia da mucosa intestinal em um modelo de camundongo com MPS I. **Resultados:** Foram incluídos 27 pacientes com mediana de idade de 12 (1-28) anos. Os sintomas gastrointestinais mais prevalentes foram flatulência, distensão abdominal, dor abdominal e fezes amolecidas. Houve diferença significativa na prevalência de flatulência entre os tipos de MPS ( $p=0,004$ ). A prevalência de flatulência e de distensão abdominal foi significativamente maior no grupo dos que não recebiam TRE, em comparação ao grupo dos que recebiam TRE ( $p = 0,04$  e  $0,03$ , respectivamente). A maioria dos exames bioquímicos realizados para investigação e/ou exclusão de alguma patologia específica apresentou resultados normais. A análise da histologia do intestino delgado de camundongos MPS I identificou células aumentadas de volume, sugerindo algum tipo de acúmulo intracelular. Em relação ao Teste Molecular para Hipolactasia, 58,8% dos pacientes apresentaram genótipo CC, o qual é compatível com intolerância à lactose. **Conclusão:** Nossos resultados sugerem que as manifestações gastrointestinais são frequentes na maioria dos tipos de MPS e que a TRE desempenha um papel no tratamento deles. Os achados na análise da histologia da mucosa intestinal em um modelo de camundongo com MPS I são consistente com anormalidades celulares contribuindo para essas manifestações. Acreditamos que mais estudos, dirigidos para as manifestações gastrointestinais, devam ser realizados para comprovar esses achados e melhor compreender os mecanismos fisiopatológicos dos sintomas relacionados nos pacientes afetados.

**Palavras-chave:** Mucopolissacaridoses, Glicosaminoglicanos, Doenças Lisossômicas de Depósito, Manifestações Gastrointestinais, Terapia de Reposição Enzimática

## Introdução

As Mucopolissacaridoses (MPS) são um grupo de Doenças Lisossômicas de Depósitos (DLDs) caracterizadas pelo acúmulo intralisossômico de glicosaminoglicanos (GAGs), secundário à deficiência na atividade de uma enzima da rota de degradação dos mucopolissacarídeos. Esse acúmulo anormal de GAGs não degradados ou parcialmente degradados compromete a função celular e orgânica, levando a um grande número de manifestações clínicas, as quais são progressivas e afetam múltiplos órgãos e sistemas<sup>1</sup>.

Os GAGs são componentes do tecido conjuntivo, onde são encontrados ligados à proteoglicanos. Os proteoglicanos fazem parte da matriz extracelular e têm entre suas funções controlar o fluxo de água e nutrientes para as células<sup>2</sup>. Os GAGs constituem-se de polissacarídeos sulfatados formados de resíduos alternados de ácido urônico (L-urônico e/ou D-glicurônico) e de hexosamina (D-galactosamina)<sup>1</sup>. Ao todo existem sete tipos de GAGs, classificados de acordo com a sua estrutura bioquímica em: sulfato de heparan, sulfato de dermatan, sulfato de queratan, sulfato de condroitin I e de condroitin II, ácido hialurônico e heparina.

As MPS são classificadas de acordo com o(s) tipo(s) de deficiência enzimática envolvida. Existem onze deficiências enzimáticas para sete subtipos de MPS. De acordo com a enzima deficiente, as MPS são classificadas em: MPS I (Deficiência de  $\alpha$ -L-iduronidase); MPS II (Deficiência de Iduronato-2-sulfatase); MPS IIIA (Deficiência de Heparan N-sulfatase); MPS IIIB (Deficiência de  $\alpha$ -N-acetil-glicosaminidase); MPS IIIC (Deficiência de Acetil-Coa-  $\alpha$ -glicosamina-acetiltransferase); MPS IIID (Deficiência de N-acetil-glicosamina-6- sulfatase); MPS IVA (Deficiência de N-acetil-galactosamina-6-sulfatase); MPS IVB (Deficiência de  $\beta$ -

galactosidase); MPS VI (Deficiência de N-acetil-galactosamina-4-sulfatase); MPS VII (Deficiência de  $\beta$ -glicuronidase) e MPS IX (deficiência de Hialuronidase) <sup>3</sup>.

A incidência das MPS pode variar de 1,9 a 4,5:100.000 em recém-nascidos vivos, conforme países e suas diferentes regiões <sup>4-6</sup>.

As manifestações clínicas dessas doenças são progressivas e caracterizadas pela presença de: face grosseira, contraturas articulares, hepatoesplenomegalia, disostose múltipla, surdez, opacificação de córnea, diarreia, cardiopatia, doença pulmonar obstrutiva crônica, apnéia do sono, déficit de crescimento e retardo mental em algumas formas <sup>1</sup>.

O tratamento da MPS pode ser específico ou sintomático. O tratamento específico busca repor a enzima deficiente, retardar a progressão da doença, melhorar anormalidades sistemáticas e proporcionar maior qualidade de vida as pacientes. Dentre os tratamentos, podemos citar o transplante de células hematopoiéticas/Transplante de medula óssea, a terapia de reposição enzimática (TRE), a terapia de inibição de síntese de substrato, além de terapia gênica, os quais estudos têm apontado resultados promissores. Atualmente, a TRE está aprovada para as MPS I, II e VI. Essa terapia consiste na administração periódica, por via intravenosa, da enzima específica deficiente no paciente <sup>7,8</sup>.

O tratamento sintomático é dirigido ao manejo das complicações da doença e envolve uma equipe multidisciplinar<sup>9</sup>.

Manifestações gastrointestinais, tais como episódios frequentes de fezes amolecidas e diarreia, têm sido frequentemente evidenciadas e relatadas por pacientes com MPS <sup>10-13</sup>. Linfangiectasia intestinal<sup>13</sup> ou infecção microbiana<sup>12</sup> podem contribuir para o aparecimentos de sintomas gastrointestinais, embora os mecanismos fisiopatológicos envolvidos ainda sejam obscuros. Ainda que os sintomas

gastrointestinais sejam frequentemente ofuscados pelos fenótipos neurológicos graves, eles podem afetar a qualidade de vida dos pacientes e seus familiares, sendo uma queixa em geral pouco valorizada pelos médicos<sup>1,13</sup>. Contudo, alguns estudos sobre a correlação de sintomas gastrointestinais e MPS encontram-se disponíveis na literatura<sup>10,12,13</sup>.

Assim sendo, o objetivo do presente trabalho foi de avaliar as manifestações gastrointestinais em pacientes com MPS que estavam ou não recebendo Terapia de Reposição Enzimática, acompanhados no Serviço de Genética Médica (centro de referência para diagnóstico e manejo das DLDs) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SGM/HCPA). Paralelamente, afim de pesquisar possíveis mecanismos da doença, foi também analisada a histologia da mucosa intestinal de um modelo de camundongo com e sem MPS.

### **Material e métodos**

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA (número 12-0259). Todos os pacientes e/ou seus responsáveis assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) antes da realização de qualquer procedimento do estudo.

Este trabalho é um estudo transversal envolvendo uma série de casos. A coleta de dados ocorreu de agosto de 2012 até maio de 2013.

### **Pacientes**

Foram incluídos no estudo pacientes com diagnóstico bioquímico e/ou molecular de qualquer tipo de MPS atendidos no SGM/HCPA, que estavam ou não em TRE. Os critérios de exclusão foram a impossibilidade de realizar os testes previstos

no protocolo, paciente que não compareceu no AMPS-SGM/HCPA no período de da realização do estudo, assim como a não concordância do paciente, pais e/ou representantes legais em participar do estudo.

### **Sintomas Gastrointestinais**

Ao longo da consulta habitual no SGM/HCPA Os pacientes incluídos no estudo foram questionados quanto ao aparecimento de sintomas gastrointestinais, tais como: diarreia crônica (Definição de Diarreia Crônica segundo OMS: diminuição da consistência fecal por mais de 4 semanas), constipação, flatulência, fezes amolecidas, regurgitação, dor abdominal e distensão abdominal. Esse questionamento foi realizado pela autora do estudo em uma sala ambulatorial específica do SGM/HCPA

### **Avaliação Bioquímica**

Os exames bioquímicos foram realizados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, assim como laboratórios terceirizados vinculados a essa instituição.

No presente trabalho foram avaliados os seguintes parâmetros bioquímicos: Quantificação da excreção urinária de GAGs; Hemograma (hemoglobina, hematócrito e volume corpuscular médio - VCM); Albumina; Ferritina; Imunoglobulina IgA; Imunoglobulina IgA Anti-transglutaminase; Proteína C Reativa (PCR); Velocidade de sedimentação glomerular (VSG); Alfa – 1 – antitripsina fecal (Laboratório Balague®, São Paulo, Brasil); Anticorpos Anticitoplasma de Neurófilos (ANCA); Anticorpos IgG anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA) (Kit ASCA ORGENTEC; ALKA SCHEBO®); Elastase Pancreática– 1 fecal (E1) (Kit ELASTASE PANCREÁTICA 1 FECAL; BIOSERV DIAGNOSTICS®).

### **Teste Molecular de Hipolactasia Primária**

Os testes de biologia molecular foram realizados no Centro de Terapia Gênica do HCPA, por uma equipe capacitada, treinada e qualificada. A presença das mutações C/T – 13910 e G/A – 22018 foi identificada a partir de amostras de DNA existentes e devidamente armazenada no SGM/HCPA, as quais fazem parte do projeto previamente aprovado pelo CEP/HCPA sob o número 03-066.

A análise foi realizada através da técnica de PCR – Reação em cadeia da Polimerase. O DNA foi extraído através de Kit comercial de extração (Easy-DNA<sup>TM</sup>, Invitrogen). As reações de amplificação foram realizadas em aparelho termociclador do tipo *Eppendorf Personal Cycler* e cada reação foi composta de 30 ciclos e 90 segundos e temperatura de anelamento de 56°C.

Após a reação de PCR, o produto da mesma foi verificado em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio. Uma vez que houve a confirmação da amplificação da sequencia pretendida, foi realizada a digestão enzimática.

A digestão foi realizada através das enzimas de restrição BsmFI (*New England Biolabs*) para a mutação C/T-13910 e *HhaI* (*Invitrogen*) para a mutação G/A-22018 nas seguintes condições: 16 µL de água, 3 µL de tampão, 1 µL de enzima de restrição e 10 µL de produto de PCR por 4 horas a 65° C e 37° C, respectivamente.

O resultado foi verificado por eletroforese em gel de agarose a 2% e assim foi possível constatar a presença ou não das mutações C/T-1391. Os indivíduos foram classificados : (a) Genótipo CC = Lactase não persistente (intolerância a lactose); e (b) Genótipo CT ou TT = lactase persistente (tolerância a lactose).



### **Consumo Dietético de Cálcio**

O consumo de Cálcio foi verificado por meio de inquérito alimentar (Recordatório 24 horas) aplicado ao paciente ou aos acompanhantes em caso de crianças menores de 12 anos. O Recordatório 24 horas foi aplicado por uma nutricionista treinada e capacitada em uma sala ambulatorial específica do SGM/HCPA.

O cálculo do consumo de Cálcio foi obtido com o auxílio do programa de apoio a nutrição *DietWin* Versão Profissional – 2011. Os valores analisados foram comparados com as Recomendações Dietética Diárias (RDA) de Cálcio conforme faixa etária, baseadas na *Food and Nutrition Board. Institute of Medicine, National Academies, 2000*.

### **Histologia da Mucosa Intestinal de um modelo de camundongo com e sem MPS**

O intestino delgado de camundongos de 8 a 10 meses normais ou nocautes para o gene da alfa-L-iduronidase (camundongos MPS I) foi analisado por histologia pelas colorações de Hematoxilina-Eosina (HE), PAS e Alcian Blue. O material biológico foi coletado anteriormente para o projeto N° GPPG 09-420.

As amostras foram processadas no Centro de Terapia Gênica do HCPA. Após sacrifício do animal, as amostras de intestino delgado e grosso foram fixadas em fomalina 10% para preservação do material. Após essa etapa, as amostras foram desidratadas com concentrações crescentes de álcool etílico. Posteriormente, os tecidos foram imersos na parafina a uma temperatura de 56 a 60° C (parafina fundida) até o tempo necessário para a completa impregnação. Posteriormente foi realizada a microtomia com espessura média de 4 micrometros para a confecção das lâminas em coloração HE, PAS e Alcian Blue, de acordo com processos de rotina do hospital. As

análises foram realizadas por meio de um microscópico óptico por uma médica patologista treinada e capacitada, no setor de Patologia do HCPA.

### **Análise estatística**

As informações foram digitadas em planilha eletrônica utilizando o programa *Microsoft® Excel*. A análise estatística foi realizada através do Programa *Statistical Package for Social Sciences*, versão 18.0 (SPSS® Inc, Chicago, IL). As variáveis categóricas foram apresentadas como frequências e percentuais e as variáveis contínuas como média  $\pm$  desvio padrão e mediana com intervalo interquartil. O teste do qui-quadrado foi empregado para testar a associação entre as variáveis categóricas. Quando necessário foi aplicado outros testes não paramétricos para a associação entre as variáveis. Os resultados do estudo foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

### **Resultados**

Dos 34 pacientes em seguimento regular no SGM-HCPA e que poderiam participar do projeto, seis pacientes não compareceram ao referido ambulatório ao longo do período da realização do estudo e um paciente não aceitou participar do mesmo. Assim sendo, 27 pacientes foram incluídos no estudo, sendo 15 (55,6%) do sexo masculino e 12 (44,4%) do sexo feminino. Excluindo os 8 pacientes com MPS II (ligada ao cromossomo X), a distribuição por gênero ficou 12 (63,1%) do sexo masculino e 7 (36,9%) do sexo feminino. A mediana (intervalo interquartil) de idade dos pacientes foi de 12 (1 – 28) anos. A caracterização da amostra está descrita na Tabela 1.

Em relação ao tratamento de Terapia de Reposição Enzimática (TRE), 12/27 (44,4%) estavam em tratamento no momento da realização do estudo. Desses pacientes, 4/12 eram portadores de MPS I, 5/12 possuíam MPS II e 3/12 possuíam MPS VI.

**Tabela 1. Caracterização da amostra (n=27)**

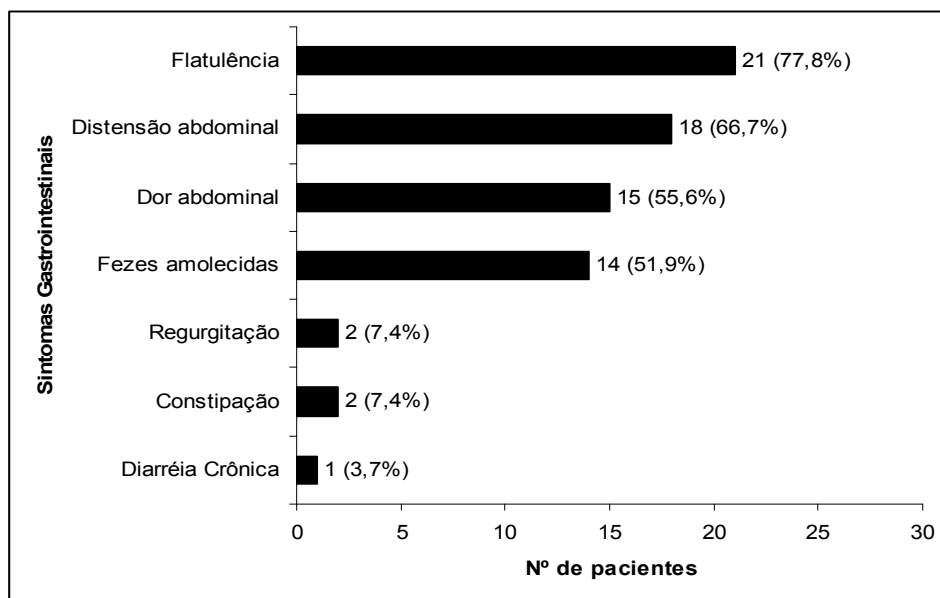
Variáveis	N=27
Idade (anos) – mediana (IQ)	12 (1 – 28)
Sexo – n(%)	
M	15 (55,6)
F	12 (44,4)
Tipo MPS – n(%)	
I	6 (22,2)
II	8 (29,6)
III	4 (14,9)
IV	6 (22,2)
VI	3 (11,1)
TRE – n(%)	
Sim	12 (44,4)
I	4(33,3)
II	5(41,7)
VI	3(25,0)
Não	15 (55,56)
I	2(13,3)
II	3(20,0)
III	4(26,7)
VI	6(40,00)

\*Sexo: F:Feminino; M: Masculino; MPS: Mucopolissacaridose; TRE: Terapia de Reposição Enzimática

### ***Sintomas Gastrointestinais em pacientes com MPS***

Os sintomas gastrointestinais mais prevalentes apresentados pelos pacientes estão descritos no Gráfico 1 e foram flatulência, distensão abdominal, dor abdominal e fezes

amolecidas. A média de quantidade de sintomas gastrointestinais aferidos pelos pacientes foi de  $3,44 \pm 1,47$ .



**Figura 1. Sintomas Gastrointestinais apresentados pelos pacientes com MPS (n=27)**

A associação entre os sintomas gastrointestinais e os tipos de MPS está descritos na Tabela 2. Houve diferença significativa na prevalência de flatulência entre os tipos de MPS ( $p=0,004$ ). Como pode ser observado na Tabela 2, os pacientes com MPS VI apresentaram menor prevalência do que os demais tipos de MPS. Os demais sintomas gastrointestinais não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados aos diferentes tipos de MPS.

Quando agrupamos os quatro sintomas mais frequentes, definidos como flatulência, dor abdominal, distensão abdominal e fezes amolecidas, houve uma diferença estatisticamente significativa em relação a esses sintomas quando foram analisados os pacientes com MPS VI em relação aos demais tipos de MPS ( $p= 0,02$ ). A associação entre os sintomas gastrointestinais e os pacientes com MPS de diferentes tipos que recebiam TRE em relação àqueles que não estavam sendo submetidos a esse

tratamento está descrita na Tabela 2. Agrupando os sintomas gastrointestinais mais prevalentes como flatulência e distensão abdominal, houve diferença estatisticamente significativa com redução nesses sintomas nos pacientes que recebiam TRE em relação aos que não recebiam TRE ( $p = 0,04$  e  $0,03$ , respectivamente).

Ao agruparmos os quatro sintomas mais prevalentes, definidos como flatulência, dor abdominal, distensão abdominal e fezes amolecidas, não houve diferença estatisticamente significativa entre os pacientes que recebiam a TRE em relação àqueles que não foram submetidos a esse tratamento. Embora não havendo uma diferença significativa, observa-se que os pacientes que possuíam os quatro sintomas mais frequentes simultaneamente estavam mais presentes no grupo sem TRE. Enquanto que no grupo com TRE a prevalência é de 16,7%, no grupo sem TRE essa proporção sobe para 53% de aparecimentos de sintomas gastrointestinais.

Os valores de GAGs urinários dos pacientes do estudo foram analisados com base na faixa da normalidade conforme faixa etária dos mesmos, segundo padrões previamente estabelecidos pelo Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do SGM/HCPA. Conforme observado na Tabela 2, pacientes com valores de GAGs urinários normais conforme suas faixas etárias apresentaram significativamente menor proporção de fezes amolecidas quando comparados com o grupo de pacientes com valores de GAGs alterados ( $p=0,016$ ).

Quando avaliados os quatro sintomas mais frequentes simultaneamente, observa-se que nenhum paciente com valores de GAGs urinários dentro da faixa da normalidade possuía esses sintomas, ao passo que 45,5% do grupo com valores de GAGs alterados apresentaram a combinação desses quatro sintomas ( $p=0,04$ ). Isso é condizente com o número de sintomas, visto que o grupo com valores de GAG normal

apresenta um número bem inferior de sintomas (mediana = 1) do que o grupo com valores de GAG alterado (mediana = 4).

Embora não tendo sido estatisticamente significativa a diferença na pequena amostra estudada, é importante ressaltar que o grupo com alteração de GAGs apresentou uma prevalência de dor abdominal três vezes maior do que a do grupo com valores de GAGs normal.

### *Avaliação Bioquímica*

Com o objetivo de excluir outras causas orgânicas que poderiam estar associadas com sintomas gastrointestinais, os pacientes com MPS foram submetidos a um série de exames bioquímicos. Em relação aos parâmetros bioquímicos de imunoglobulina IgA, anti-transglutaminase IgA, proteína C reativa (PCR), velocidade de sedimentação Glomerular (VSG), albumina, ferritina e ANCA, todos os pacientes apresentaram valores dentro da faixa da normalidade. Quanto aos valores do exame de Alfa 1 Antitripsina Fecal, 24/27 tiveram esse parâmetro avaliado e todos apresentaram valores dentro da normalidade.

O exame de ASCA foi realizado em 22/27 pacientes. Entre esses, apenas dois pacientes apresentaram resultados alterados. Os demais pacientes apresentaram valores dentro da faixa da normalidade.

Em relação ao exame de Elastase Pancreática 1 Fecal, obtivemos dados relativos a essa variável em 24/27 pacientes. Entre esses, um paciente apresentou insuficiência pancreática moderada (paciente N° 03) e os demais pacientes apresentaram função pancreática normal.

Valores de hematócrito, hemoglobina e VCM estavam disponíveis e normais para todos os pacientes. Um único paciente apresentou nível de hemoglobina, hematócrito e

VCM abaixo da referencia de normalidade. Os demais pacientes apresentaram valores dentro da faixa da normalidade para esses exames.

**Tabela 2.** Associação entre os sintomas gastrointestinais de pacientes com MPS com as variáveis: Tipo de MPS, com ou sem Terapia de Reposição Enzimática, valores de GAGs urinários, genótipos CC e CT/TT e ingestão de Cálcio através do Recordatório Alimentar 24 horas

<i>Sintomas</i>	<i>MPS I</i> (n=6) n (%)	<i>MPS II</i> (n=8) n (%)	<i>MPS III</i> (n=4) n (%)	<i>MPS IV</i> (n=6) n (%)	<i>MPS VI</i> (n=3) n (%)	<i>p</i>	<i>Com</i> <i>TRE</i> (n=12) n (%)	<i>Sem</i> <i>TRE</i> (n=15) n (%)	<i>p</i>	<i>GAG</i> <i>Urinário</i> <i>normal</i> (n=5) n (%)	<i>GAG</i> <i>Urinário</i> <i>Alterado</i> (n=22) n (%)	<i>p</i>	<i>Genótipo</i> <i>CC</i> (n=10) n (%)	<i>Genótipo</i> <i>CT/TT</i> (n=07) n (%)	<i>p</i>	<i>Ingestão</i> <i>Ca</i> <i>Inferior</i> (n=03) n (%)	<i>Ingestão</i> <i>Ca</i> <i>Adequada</i> (n=08) n (%)	<i>Ingestão</i> <i>Ca</i> <i>Superior</i> (n=16) n (%)	<i>p</i>
Flatulência	4 (66,7)	8 (100)	3 (75,0)	6 (100)	0 (0,0)	0,004	7 (58,3)	14(93,3)	0,040	3 (60,0)	18 (81,8)	0,303	8 (80,0)	6 (85,7)	1,000	2 (66,7)	5 (62,5)	14( 87,5)	0,294
Distensão abdominal	4 (66,7)	5 (62,5)	4 (100)	4 (66,7)	1 (33,3)	0,523	5 (41,7)	13(86,7)	0,037	2 (40,0)	16 (72,7)	0,295	09 (90,0)	2 (28,5)	0,030	3 (100,0)	5 (62,5)	10 (62,5)	0,690
Dor abdominal	4 (66,7)	6 (75,0)	2 (50,0)	2 (33,3)	1 (33,3)	0,569	6 (50,0)	9 (60,0)	0,707	1 (20,0)	14 (63,6)	0,139	10 (100,0)	2 (28,5)	0,003	3 (100,0)	5 (62,5)	7 (43,8)	0,233
Fezes amolecidas	4 (66,7)	4 (50,0)	2 (50,0)	3 (50,0)	1 (33,3)	0,953	5 (41,7)	9 (60,0)	0,449	0 (0,0)	14 (63,6)	0,016	8 (80,0)	1 (28,5)	0,010	1 (33,3)	8 (100,0)	1 (33,3)	0,738
Regurgitação	1 (16,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (16,7)	0 (0,0)	0,724	1 (8,3)	1 (6,7)	1,000	0 (0,0)	2 (9,1)	1,000	0 (0,0)	1 (14,2)	0,410	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (12,5)	0,625
Constipação	0 (0,0)	1 (12,5)	1 (25,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,620	0 (0,0)	2 (13,3)	0,487	0 (0,0)	2 (9,1)	1,000	0 (0,0)	0 (0,0)	0,430	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (12,5)	0,625
Diarreia Crônica	0 (0,0)	1 (12,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1,000	1 (8,3)	0 (0,0)	0,444	0 (0,0)	1 (4,5)	1,000	0 (0,0)	1 (14,2)	0,413	1 (33,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,105
Flatulência ou Fezes Amolecidas ou Distensão Abdominal ou Dor abdominal	5 (83,3)	8 (100)	4 (100)	6 (100)	1 (33,3)	0,021	9 (75,0)	15 (100)	0,075	4 (80,0)	20 (90,9)	0,474	10 (100,0)	06 (85,7)	0,412	3 (100)	6 (75)	15 (93,8)	0,481
Flatulência + Fezes Amolecidas + Distensão Abdominal + Dor abdominal	3 (50,0)	5 (62,5)	2(50,0)	2 (33,3)	0 (0,0)	0,539	2 (16,7)	8 (53,0)	0,236	0 (0,0)	10 (45,5)	0,042	6 (60,0)	0 (0,0)	0,035	1 (33,3)	4 (50,0)	3 (18,8)	0,274
Nº de sintomas – md (min – max)	4 (1 -5)	4,5(1-5)	4 (2-4)	3,5 (1-4)	1 (1-5)	0,441	4 (1 –4)	4 (3 –5)	0,271	1 (1 – 3)	4 (4 – 5)	0,013	4(4 – 5)	2 (1 – 4)	0,055	4 (4 – 5)	4 (1 – 5)	4 (1 – 5)	0,232



### ***Genotipagem do Polimorfismo LCT-13910 C>T***

Dos 27 pacientes incluídos no estudo, 17 realizaram genotipagem do polimorfismo LCT-13910 C>T, para avaliar a persistência da enzima lactase. Desses pacientes, 10/17 (58,8%), apresentaram genótipo CC (compatível com intolerância a lactose); 02/17 (11,8%) apresentaram genótipo TT e 05/17 (29,4%) apresentaram genótipo CT (estes dois últimos compatíveis com tolerância à lactose). A análise dos pacientes com genótipo CC e CT/TT em relação ao aparecimento dos sintomas gastrointestinais está descrita na Tabela 2.

Houve uma diferença estatisticamente significativa da prevalência dos sintomas gastrointestinais distensão abdominal, dor abdominal e fezes amolecidas entre o grupo de pacientes com genótipo CC (compatível com intolerância a lactose) em relação aqueles com genótipo CT ou TT ( $p = 0,03$ ;  $0,003$  e  $0,010$ , respectivamente).

Ao agruparmos os quatro sintomas mais prevalentes do estudo simultaneamente (flatulência, dor abdominal, distensão abdominal e fezes amolecidas), houve uma diferença significativamente maior desses sintomas nos pacientes com genótipo CC em comparação aos pacientes com genótipo CT/TT ( $p = 0,03$ ). Nenhum paciente com genótipo CT/TT possuía esses sintomas ao passo que 60% dos pacientes com genótipo CC apresentaram a combinação desses quatro sintomas. Isso está de acordo com o número de sintomas, visto que os pacientes com genótipos CT/TT apresentam um número inferior de sintomas (mediana = 2) do que os pacientes com genótipo CC (mediana = 4), o qual é compatível com intolerância a lactose.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os pacientes com genótipos CC em comparação aos diferentes tipos de MPS.

### ***Consumo Dietético de Cálcio***

O consumo de cálcio total analisado no Recordatório de 24 horas aplicado nos 27 pacientes apresentou média 1.048 mg/dia  $\pm$  407,02 e mediana de 1.000 mg/dia (1.000 – 1.400). Comparando a ingestão de cálcio dos pacientes do presente estudo nesse inquérito com as recomendações da RDA, 16/27 apresentam consumo superior ao de referência; 08/27 apresentaram consumo adequado de cálcio e 3/27 apresentaram valores abaixo da referência.

A associação da ingestão de cálcio pelos pacientes em relação ao aparecimento dos sintomas gastrointestinais está descrita na Tabela 2. Não houve diferença significativa entre as variáveis estudadas, uma vez que esses sintomas foram prevalentes em toda a amostra.

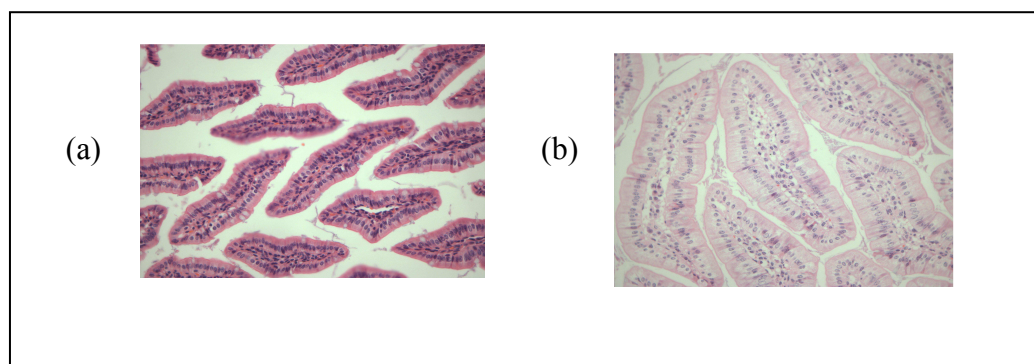
### ***Histologia da Mucosa Intestinal de um modelo de camundongo com e sem MPS***

No presente estudo, foi analisada a estrutura do intestino delgado de um modelo de camundongo nocaute para o gene da alfa-L-iduronidase (MPS I) de 09 meses de idade em comparação com camundongo normal (controle) de 08 meses de idade, através da histologia pelas colorações HE, PAS e Alcian Blue.

Nenhuma anormalidade adicional foi observada na estrutura do intestino delgado em camundongo com MPS I através do Microscópio Óptico (*Olympus BX51*) além daquelas já conhecidas e associadas com a patologia do MPS I. Essa foi caracterizada por um acúmulo intracelular na lamina própria das vilosidades das regiões do intestino delgado, o qual não foi evidenciado em amostras normais (Figura). Além disso, foi verificada uma redução no número de células caliciformes nos vilos no camundongo com MPS em comparação ao normal.

As alturas das células epiteliais do intestino delgado foram medidas nos camundongos MPS I e nos camundongos normais. As alturas das células epiteliais em camundongos MPS I foram significativamente maiores que as dos camundongos normais ( $p \leq 0,001$  – Teste *T de Student*). A média $\pm$ DP dessas alturas foram de 442,51 pixels  $\pm$  51,82 e 258,59 pixels  $\pm$  43,47 (equivalente a 117,08 mm  $\pm$  13,71 e 64,42 mm  $\pm$  11,50), para o camundongo com MPS e o normal, respectivamente.

Embora não havendo uma diferença estatisticamente significativa, observou-se que o diâmetro da lâmina própria dos vilos do intestino delgado do camundongo com MPS I foi maior do que o dos vilos do camundongo normal, com média $\pm$ DP de 270,41 pixels  $\pm$  87,13 e 217,52 pixels  $\pm$  71,59 (equivalente a 71,54 mm  $\pm$  23,05 e 57,55 mm  $\pm$  18,94), respectivamente.



**Figura 2:** Histologia do intestino delgado em coloração HE em camundongo normal (a) e com MPS I (b) em aumento de 400 vezes no Microscopia Óptica (*Olympus BX51*)

## Discussão

Este foi o primeiro estudo realizado para avaliar as manifestações gastrointestinais em pacientes brasileiros com diferentes tipos de MPS.

No presente estudo a correlação dos sintomas gastrointestinais e os tipos de MPS, observou-se uma diferença significativa na prevalência de flatulência entre os tipos de MPS, com os pacientes com MPS VI apresentando menor prevalência do que os demais tipos de MPS. Além disso, quando agrupamos os sintomas mais frequentes, definidos como flatulência, dor abdominal, distensão abdominal e fezes amolecidas, houve uma diferença estatisticamente significativa em relação a esses sintomas quando comparados os diferentes tipos de MPS, com prevalência menor na MPS VI. Como apenas três pacientes com esse tipo de MPS foram incluídos no estudo, é uma limitação do estudo e deve ser levada em consideração.

A prevalência de flatulência e distensão abdominal foi significativamente maior no grupo dos que não recebiam tratamento de reposição enzimática (TRE), em comparação ao grupo dos que recebiam TRE. Embora não havendo uma diferença significativa, observa-se que os pacientes que possuíam os quatro sintomas mais frequentes simultaneamente estavam em maior proporção no grupo sem TRE. Isso sugere que a TRE pode ter um possível benefício em alguns sintomas gastrointestinais.

O desenvolvimento de estratégias terapêuticas, como por exemplo, a TRE, tem mudado a história natural de muitos tipos de MPS. Embora esta terapia tenha limitações quanto a modificação de algumas manifestações clínicas, a administração semanal intravenosa da enzima deficiente tem demonstrado benefícios mensuráveis e sustentáveis para os doentes<sup>14,15</sup>. Esse tratamento pode prevenir complicações e/ou reduzir a progressão da doença e melhorar a qualidade de vida. Diante do observado

nesse estudo, podemos levantar a hipótese que esse tratamento pode também auxiliar na redução de sintomas gastrointestinais em pacientes afetados. Contudo, mais estudos, com uma amostra maior de pacientes, deve ser realizados para confirmar esses achados.

Em relação à excreção de GAGs, observou-se que aqueles pacientes que possuíam valores de GAGs urinários aumentados e que não estavam em TRE apresentaram uma proporção maior de sintomas gastrointestinais em comparação àqueles que estavam recebendo TRE e tinham valores de GAGs urinários baixos. Isso está em conformidade com estudos anteriores, uma vez que um dos benefícios da TRE intravenosa é a redução de GAGs nos pacientes<sup>16</sup>. Assim sendo, essa redução de GAGs conseqüentemente poderia minimizar o aparecimento de sintomas gastrointestinais em pacientes com MPS.

No estudo de Hoffmann et al<sup>17</sup>, o autor descreveu a evolução clínica de três pacientes com MPS II e potencial efeito terapêutico da terapia de reposição enzimática. Em todos os pacientes, melhorias em tamanho órgão visceral, na capacidade física e sintomas gastrointestinais foram relatados. Todos os pacientes relataram que a evacuação de fezes tornou-se menos perturbadora após a introdução da TRE.

A avaliação bioquímica tem como objetivo identificar possíveis causas dos sintomas gastrointestinais dos pacientes para melhor compreender sua etiologia. Com o intuito de excluir alguma patologia específica a qual poderia estar associada a alguma manifestação gastrointestinal, todos os pacientes do estudo realizaram uma extensa e completa investigação para outras patologias que poderiam manifestar sintomas gastrointestinais, como infecções microbianas e bacterianas, doença celíaca, retocolite ulcerativa, doença de enteropatia perdedora de proteína, insuficiência

pancreática, doença inflamatória intestinal dentre outras, o que poderiam mascarar e/ou serem confundidores do aparecimento de sintomas gastrointestinais.

No presente estudo observou-se que, apesar da sintomatologia frequente de manifestações gastrointestinais, os pacientes não apresentaram alterações significativas em relação ao estado nutricional. Isso demonstra que os pacientes apresentaram alterações funcionais que não comprometem seu estado nutricional. A maioria dos exames bioquímicos realizados nos nossos pacientes para investigação e/ou exclusão de alguma patologia específica apresentaram resultados normais, sugerindo que o aparecimento de sintomas gastrointestinais nesses pacientes possa ser decorrente da própria MPS através de outro mecanismo fisiopatológico.

Através da nossa análise da histologia do intestino delgado do camundongo com MPS I identificamos células aumentadas de volume, sugerindo algum tipo de acúmulo intracelular. A hipótese levantada é que esse acúmulo pode ser de GAGs propriamente dito, mas isso foi difícil de identificar através das colorações HE + AB, ou decorrente de uma degeneração hidrópica nas células. Esse acúmulo nas células poderia prejudicar a absorção de nutrientes e substâncias, levando a uma síndrome de má absorção e conseqüentemente ao aparecimento de sintomas gastrointestinais nos pacientes portadores de MPS. Contudo, é importante ressaltar que na nossa amostra, os pacientes mostravam-se bem nutridos (bom estado nutricional e bioquímico).

Estudos sobre mecanismos patogênicos e alterações gastrointestinais em pacientes com MPS são escassos. Roberts e colaboradores<sup>18</sup> descreveram a morfologia gastrointestinal e suas funções em um modelo de camundongo com MPS IIIA. O peso do estômago e do duodeno aumentam em camundongos com MPS IIIA e o comprimento do duodeno também aumentou. O aumento da espessura da submucosa foi observado no intestino de camundongos com MPS IIIA comparados

com camundongos normais e o acúmulo lisossomal de GAGs foi observado nessa região e em suas vilosidades. O autor sugeriu que as alterações observadas na estrutura do trato gastrointestinal em camundongos com MPS IIIA podem contribuir para o ganho de peso nessa condição.

Os GAGs acumulados em pacientes com MPS não são apenas importantes componentes da matriz extracelular e de células de superfície, mas também estão associados com funções celulares relevantes (motilidade celular, interação entre regulação da matriz extra e intracelular) e também com regulação de vias de sinalização extracelular<sup>13,19</sup>. Assim, a incapacidade de degradação dos GAGs em pacientes com MPS leva à presença de níveis elevados dessa constituinte celular, levando a alterações estruturais na histologia das células, podendo gerar o aparecimento de sintomas gastrointestinais<sup>18</sup>. Essa hipótese poderia justificar o fato de que a maioria dos exames bioquímicos realizados nos nossos pacientes apresentaram resultados normais, sugerindo que as queixas gastrointestinais aferidas pelos pacientes possam estar relacionadas ao aumento do volume das células, conforme evidenciado no intestino delgado em um modelo de camundongo com MPS. Entretanto, a correlação entre acúmulo de GAGs e o aparecimento de sintomas gastrointestinais permanece obscura, de modo que trabalhos adicionais devem ser realizados para comprovar ou não esses achados.

Em relação à genotipagem do polimorfismo LCT-13910 C/T, 58,8% dos pacientes apresentaram genótipo CC, o qual é compatível com intolerância à lactose. É importante ressaltar que todos os pacientes do nosso estudo eram de origem caucasiana. No estudo de Mattar et al<sup>20</sup>, foi realizado um levantamento da prevalência da hipolactasia primária no Brasil através do exame genético do polimorfismo associada com a persistência da lactase. A prevalência encontrada foi de 57% para

indivíduos brancos, 57% para os pardos e 80% para os negros, estando em conformidade com os dados encontrados no nosso estudo.

Não foi encontrada diferença significativa entre os pacientes com genótipos CC em comparação aos diferentes tipos de MPS. Isso já era o esperado e está em conformidade com a literatura, pois na população em geral a frequência da intolerância a lactose apresenta uma distribuição aleatória entre as populações<sup>21</sup>.

Os pacientes do presente estudo apresentaram uma grande variabilidade de sintomas gastrointestinais. Possíveis fatores responsáveis por esta variabilidade incluem a osmolalidade e conteúdo de gordura do alimento no qual o açúcar é ingerido, o esvaziamento gástrico, a sensibilidade à distensão abdominal produzida pela carga osmótica da lactose não hidrolizada no intestino delgado superior, o trânsito intestinal e a resposta do cólon à carga de carboidrato. De uma maneira geral, os alimentos com alta osmolalidade e conteúdo de gordura diminuem o esvaziamento gástrico e reduzem a gravidade dos sintomas induzidos pela lactose<sup>21,22</sup>.

Os dados dietéticos da ingestão de cálcio do nosso estudo foram obtidos através de recordatório 24h, que define quais tipos e a quantidade de alimentos e bebidas foram consumidos, no dia anterior a entrevista. Esse método possui como vantagens o curto tempo de aplicação, a não alteração da ingestão do paciente, o baixo custo e, além disso, pode ser aplicado para qualquer faixa etária e analfabetos<sup>23</sup>. Contudo, Witschi<sup>24</sup> cita possíveis fontes de erros que podem distorcer as informações sobre ingestão alimentar: a percepção do que se come; a memória do entrevistado; efeitos decorrentes da idade, sexo e ambiente da entrevista; a habilidade do entrevistador em obter informações e a disposição do paciente em colaborar.

No presente estudo, foi expressivo o número de pacientes com MPS que apresentaram ingestão superior de cálcio. Levando em consideração que pacientes com



MPS possuem células aumentadas de volume no intestino delgado devido ao acúmulo de GAG, é fundamental o monitoramento e manejo adequado dessas queixas por parte da equipe médica para minimizar esses achados. Nos pacientes com intolerância à lactose e redução do consumo de leite e derivados, é importante avaliar se a ingestão diária de cálcio está adequada. O cálcio deve ser suplementado caso esteja insuficiente na dieta, com monitorização e suplementação se necessário também de vitamina D<sup>25</sup>.

Manifestações gastrointestinais já foram evidenciadas em outras doenças de depósito lisossômico, como por exemplo doença de Gaucher e Doença de Fabry<sup>26, 27</sup>, entretanto elas são frequentemente ofuscadas pelos fenótipos neurológicos graves. Acreditamos que mais estudos, dirigidos para as manifestações gastrointestinais, devam ser realizados para comprovar esses achados e melhor compreender os mecanismos fisiopatológicos dos sintomas relacionados nos pacientes afetados. Acreditamos na necessidade de padronizar uma avaliação específica para o monitoramento de sintomas gastrointestinais em pacientes com MPS, o que, certamente, contribuirá para uma melhora significativa da qualidade de vida desses pacientes e seus familiares.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem toda equipe do Serviço de Genética Médica do HCPA, assim como Centro de Pesquisa Clínica do HCPA e Centro de Terapia Gênica do HCPA pelo apoio e colaboração com esse estudo. Os autores também agradecem a Professora Elizabeth Neufeld (UCLA/USA) por disponibilizar os camundongos MPS I. Este trabalho foi apoiado pelo FIPE / HCPA (projeto nº 12-0259).

## Referencias

1. Neufeld EF, Muenzer J. The Mucopolysaccharidoses. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, ed. *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. New York: MacGraw-Hill; 2005. p. 3421-52.
2. Vieira T, Schwartz IVS, Munoz V, Pinto L, Steiner C, Ribeiro M, et al. Mucopolysaccharidoses in Brazil: what happens from birth to biochemical diagnosis? *Am J Med Genet*. 2008; 146A:1741-7.
3. Pinto LL, Schwartz IVS, Puga AC, Vieira TA, Munoz MV, Giugliani R, et al. Prospective study of 11 Brazilian patients with mucopolysaccharidosis II. *J Pediatr (Rio J)*. 2006;82:273-8.
4. Poorthuis BJ, Wevers RA, Kleijer WJ, Groener JE, Jong JG, Van Weely S, et al. The frequency of lysosomal storage in the Netherlands. *Hum Genet*. 1999;105(1-2):151-6.
5. Applegarth DA, Tonne JR, Lowry RB. Incidence of inborn errors of metabolism in British Columbia. *Pediatrics*. 2000; 105:10-14.
6. Nelson J, Crowhurst J, Carey B, Greed L. Incidence of the mucopolysaccharidosis in Western Australia. *Am J Med Genet*. 2003;123A: 310-3.
7. Giugliani R, Federhen A, Moñoz Rojas V, Vieira T, Artigálas O, Pinto L, et al. Mucopolysaccharidosis I, II, and VI: Brief review and guidelines for treatment. *Genetics and Molecular Biology*. 2010; 33(4):589–604.
8. Giugliani R. Mucopolysaccharidoses: From understanding to treatment, a century of discoveries. *Genetics and Molecular Biology*. 2012;35(4): 924-31.
9. Muenzer, J. The Mucopolysaccharidoses: A heterogeneous group of disorders with variable pediatric presentations. *J Pediatric*. 2004;144: S27-S34.
10. Bhaumik M, Muller VJ, Rozaklis T, Johnson L, Dobrenis K, Bhattacharyya R, et al. P. A mouse model for mucopolysaccharidosis type III A (MPS IIIA). *Glycobiology*. 1999; 9:1389–1396.
11. Elsner B. Ultrastructure of the rectal wall in Hunter's syndrome. *Gastroenterology*. 1970; 58:856–862.
12. Wegrzyn G, Kurlenda J, Liberek A. Atypical microbial infections of digestive tract may contribute to diarrhea in mucopolysaccharidosis patients: a MPS I case study. *BioMed Central*. 2005; 5(9): 1-5.

13. Sibilio M, Miele E, Ungano C, Astarita L, Turco R, DI Natale P, et al. Chronic Diarrhea in Mucopolysaccharidosis IIIB. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2009;49(4):477-80.
14. Harmtz P, Giugliani R, Schwartz IV, Guffon N, Teles E, Sá Miranda M, et al. Long-term follow-up of endurance and safety outcomes during enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis VI: Final results of three clinical studies of recombinant human N-acetylgalactosamine 4-sulfatase. *Mol Genet Metab.* 2008; 94:469-475.
15. Clarke LA, Wraith JE, Beck M, Kolodny EH, Pastores GM, Muenzer J, et al. Long-term efficacy and safety of laronidase in the treatment of mucopolysaccharidosis I. *Pediatrics.* 2009;123:229-240.
16. Muenzer J, Bodamer O, Burton B, Clarke L, Frenking GS, Giugliani R, et al. The role of enzyme replacement therapy in severe Hunter syndrome-an expert panel consensus. *J Pediatr.* 2011;171(1):181-8.
17. Hoffmann B, Schulze-frenking G, Al-Sawaf S, Beck, Mayatepek E. Hunter Disease before and during enzyme replacement therapy. *Pediatric Neurology.* 2011; 45: 181-184.
18. Roberts ALK, Howard GS, Liam WC, Moretta S, Kritas S, Lymn KA, et al. Gastrointestinal Pathology in a Mouse Model of Mucopolysaccharidosis Type IIIA. *Journal of Cellular Physiology.* 2009; 219: 259-264.
19. Bode L, Murch S, Freeze HH. Heparan sulfate plays a central role in a dynamic in vitro model of protein-losing enteropathy. *J Biol Chem.* 2006;281:7809-15.
20. Mattar R, Monteiro MS, Villares CA, Santos AF, Silva JMK, Carrilho FJ. Frequency of LCT -13910C>T single nucleotide polymorphism associated with adult-type hypolactasia/lactase persistence among Brazilians of different ethnic groups. *Nutr J.* 2009;8:46. doi: 10.1186/1475-2891-8-46.
21. Mattar R, Mazo DFC. Intolerância a lactose: mudanças de paradigma com a biologia molecular. *Rev Assoc Med Bras.* 2010;56(2): 230-6.
22. Sahi, T. Genetics and epidemiology of adult-type hypolactasia. *Scand J Gastroenterol.* 1994;29:7-20.
23. Fisberg RM, et al. Recomendações Nutricionais. In Fisberg, RM. *Inquéritos Alimentares: métodos e bases científicas*, Barueri, SP: Manole, 2005b.
24. Witschi JC. Short-term dietary recall and recording methods. In: Willett W. *Nutritional Epidemiology*. New York: Oxford University Press;1998. p.52-68.

25. Montalto M, Curugliano V, Santoro L, Vastola M, Cammarota G, Manna R. et al. Management and treatment of lactose malabsorption. *World J Gastroenterol.* 2006;12:187-91.
26. Hoffmann B, Schwartz M, Mehta A, Keshav S. Gastrointestinal symptoms in 342 patients with Fabry disease: Prevalence and response to enzyme replacement therapy. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2007; 5:1447-53.

## 8. ARTIGO 1 EM INGLÊS

Artigo enviado para publicação no periódico *Jornal de Pediatria* (Versão Inglês).

### **Gastrointestinal Manifestations in Patients with Mucopolysaccharidoses**

Luciana Giugliani<sup>1</sup>, Carolina F. M. Souza<sup>2</sup>, Sandra M. G. Vieira<sup>3</sup>,  
Guiherme Baldo<sup>4</sup>, Ursula Matte<sup>4</sup>, Rafael L. Maurer<sup>4</sup>,  
Lúcia Maria Kliemann<sup>5</sup>, Roberto Giugliani<sup>1,2,6</sup>

<sup>1</sup> Postgraduate Program in Child and Adolescent Health, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

<sup>2</sup> Medical Genetics Service, HCPA, Porto Alegre, Brazil

<sup>3</sup> Experimental Laboratory of Gastroenterology and Hepatology, HCPA, Porto Alegre,  
Brazil

<sup>4</sup> Gene Therapy Center, HCPA, Porto Alegre, Brazil

<sup>5</sup> Department of Anatomic Pathology, FAMED, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

<sup>6</sup> Department of Genetics, IB, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

#### **Correspondence:**

Prof. Roberto Giugliani  
Serviço de Genética Médica  
Hospital de Clínicas de Porto Alegre  
Rua Ramiro Barcelos 2350  
Porto Alegre, RS 90035-903  
Brazil

Tel + 55 51 3359-8011

Fax + 55 51 3359 8010

Email: [rgiugliani@hepa.ufrgs.br](mailto:rgiugliani@hepa.ufrgs.br)

## Abstract

**Introduction:** The mucopolysaccharidoses (MPS) are lysosomal storage disorders characterized by a deficiency in enzymes involved in the glycosaminoglycan degradation. Abnormal accumulation of GAGs compromises cellular and organic function, leading to progressive, multisystem manifestations. Gastrointestinal manifestations are often reported by patients with MPS and although these symptoms are overshadowed by severe neurological phenotypes, they can have a negative impact on the quality of life of patients and family. **Objective:** To assess gastrointestinal manifestations in patients with MPS and bowel mucosa histology in a MPS I mouse model. **Methods:** Cross-sectional study with a convenience sampling strategy, including patients with a diagnosis of MPS of any type and regardless enzyme replacement therapy (ERT) status. Patients were assessed by means of a dietary record and an interview focused on gastrointestinal symptoms, and also by a set laboratory tests. Patient's DNA samples were also tested for primary lactase hypolactasia, and bowel mucosa specimens from MPS I mice underwent histological examination. **Results:** A total of 27 patients were included, with a median age of 12 (1-28) years. The most prevalent gastrointestinal symptoms were flatulence, abdominal distension, abdominal pain, and loose stools. A significant difference in the prevalence of flatulence was observed among different MPS types ( $p=0.004$ ). The prevalence of flatulence and abdominal distension was significantly higher in the non-ERT group than in the ERT group ( $p = 0.04$  and  $0.03$  respectively). Most biochemical tests performed to work up and/or rule out specific conditions were within normal limits. Histological analysis of small-bowel tissue from MPS I mice found increased cell volume indicative of some form of intracellular accumulation. On molecular testing for lactase deficiency, 58.8% of the patients had the CC genotype, which is consistent with lactose intolerance. **Conclusion:** Our results suggest that gastrointestinal manifestation, are frequent across most MPS type, and ERT plays a role in treating them. The findings in the bowel histology in analysis in the in the MPS mouse model are consistent with cellular abnormalities contributing to these manifestations. Further studies focusing on the gastrointestinal manifestations of MPS are warranted to corroborate our findings and provide a better understanding of the pathophysiological mechanisms associated with these symptoms in affected patients.

**Keywords:** Mucopolysaccharidoses, glycosaminoglycans, lysosomal storage disorders, gastrointestinal manifestations, enzyme replacement therapy

## Introduction

The mucopolysaccharidoses (MPS) are lysosomal storage disorders (LSDs) characterized by intralysosomal accumulation of glycosaminoglycans (GAGs), secondary to deficient activity of an enzyme in the GAG degradation pathway. This abnormal accumulation of non-degraded or partially degraded GAGs compromises cell function and leads to a wide range of progressive clinical manifestations that affect several organs and body systems<sup>1</sup>.

GAGs are components of the connective tissues, where they are found in proteoglycans. Proteoglycans are part of the extracellular matrix and play several roles, such as controlling the flow of water and nutrients into the cell<sup>2</sup>. GAGs are sulfated polysaccharides composed of alternating uronic acid (L-iduronic and/or D-glucuronic acid) and hexosamine (D-galactosamine) residues<sup>1</sup>. There are 7 types of GAGs, each with a distinct molecular structure: heparan sulfate, dermatan sulfate, keratan sulfate, chondroitin I sulfate, chondroitin II sulfate, hyaluronic acid, and heparin.

The MPS are classified by the type of enzyme deficiency (or deficiencies) involved. Altogether, there are 11 recognized enzyme deficiencies and 7 MPS subtypes. Depending on the affected enzyme, MPS is classified as: MPS I ( $\alpha$ -L-iduronidase deficiency); MPS II (iduronate-2-sulfatase deficiency); MPS IIIA (heparan N-sulfatase deficiency); MPS IIIB ( $\alpha$ -N-acetylglucosaminidase deficiency); MPS IIIC (acetyl-CoA: $\alpha$ -glucosamine acetyltransferase deficiency); MPS IIID (N-acetylglucosamine-6-sulfatase deficiency); MPS IVA (N-acetylgalactosamine-6-sulfatase deficiency); MPS IVB ( $\beta$ -galactosidase deficiency); MPS VI (N-acetylgalactosamine-4-sulfatase deficiency); MPS VII ( $\beta$ -glucuronidase deficiency); or MPS IX (hyaluronidase deficiency)<sup>3</sup>.

The incidence of MPS ranges from 1.9 to 4.5 per 100,000 live births, depending on country and region<sup>4-6</sup>.

The clinical manifestations of these conditions are progressive and predominantly characterized by the presence of coarse facial features, joint contractures, hepatosplenomegaly, dysostosis multiplex, hearing loss, corneal opacity, diarrhea, heart disease, chronic obstructive pulmonary disease, sleep apnea, growth deficits, and, in some forms, mental retardation<sup>1</sup>.

Treatment of MPS may be specific or symptomatic. Specific treatment seeks to replace the deficient enzyme, delay disease progression, relieve systemic

manifestations, and improve patient quality of life. Specific treatment options include hematopoietic stem cell or bone marrow transplantation, enzyme replacement therapy (ERT), substrate inhibition therapy, and gene therapy, studies of which have suggested promising results. Currently, approved ERT options exist for MPS I, II, and VI e now for MPS IVA (clinical trials in progress). ERT consists of periodic intravenous administration of the deficient enzyme to the patient<sup>7,8</sup>.

Symptomatic treatment is meant to manage disease complications and should involve a multidisciplinary team<sup>9</sup>.

Gastrointestinal manifestations, such as frequent episodes of loose stools and diarrhea, have been widely observed and reported by patients with MPS<sup>10-13</sup>. Intestinal lymphangiectasia<sup>13</sup> or microbial infections<sup>12</sup> may contribute to the development of gastrointestinal symptoms, but potential pathophysiological mechanisms are still unclear. Although gastrointestinal symptoms are often overshadowed by severe neurological phenotypes, they can have a negative impact on the quality of life of patients and their family members, and are usually underrated as a complaint by physicians<sup>1,13</sup>. Nevertheless, some studies on the correlation between gastrointestinal symptoms and MPS have been published in the literature<sup>10,12,13</sup>.

Within this context, the present study sought to assess gastrointestinal manifestations in patients with MPS, on or off ERT, who were followed at the Medical Genetics Service (a reference center for the diagnosis and management of LSDs) in Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SGM/HCPA), Brazil. In parallel, in order to look for possible mechanism of disease, we assessed bowel mucosa histology in a mouse model of MPS and in control normal mice.

## **Materials and Methods**

The study was approved by the HCPA Research Ethics Committee ( study number 12-0259). All patients and/or their legal guardians provided written informed consent before any study procedures.

This was a cross-sectional case-series study. Data collection occurred from August 2012 to May 2013.



## **Patients**

The study sample included patients with a biochemical and/or molecular diagnosis of any type of MPS who were seen at SGM/HCPA, regardless of ERT status. The exclusion criteria were: inability to undergo testing as per the study protocol; failure to attend MPS clinic visits at SGM/HCPA during the study period; and refusal by the patient or his/her parents and/or legal guardians to take part in the study.

## **Gastrointestinal Symptoms**

During their routine SGM/HCPA appointments, patients included in the study were interviewed for the presence of any gastrointestinal complaints, such as chronic diarrhea (a decrease in stool consistency for more than 4 weeks, as defined by the World Health Organization), constipation, flatulence, loose stools, regurgitation, abdominal pain, and abdominal distension. This interview was conducted by the lead author of the study at a dedicated office in the SGM/HCPA outpatient MPS clinic.

## **Biochemical Tests**

Biochemical tests were performed at HCPA or outsourced to independent partner facilities as necessary.

The following biochemical parameters were assessed for the purposes of this study: quantitative urinary GAG excretion; complete blood count (including hemoglobin, hematocrit, and mean corpuscular volume [MCV]); albumin; ferritin; IgA immunoglobulin; anti-transglutaminase IgA immunoglobulin; C-reactive protein (CRP); erythrocyte sedimentation rate (ESR); fecal alpha-1-antitrypsin (Laboratório Balague®, São Paulo, Brazil); antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA); anti-*Saccharomyces cerevisiae* IgG antibodies (ASCA) (Kit ASCA Orgentec, Schebo®, Alka); and fecal pancreatic elastase-1 (E1) (Kit Elastase Pancreática 1 Fecal; Bioserv Diagnostics®).

## **Molecular Testing for Primary Lactase Deficiency**

All molecular tests were carried out at the HCPA Gene Therapy Center by a team of trained and qualified professionals. Presence of the C/T – 13910 and G/A – 22018 mutations was identified by means of existing DNA samples stored at

SGM/HCPA as part of a previous research project approved by the HCPA Research Ethics Committee with project number 03-066.

Molecular analysis was carried out by the polymerase chain reaction (PCR) technique. DNA was extracted with a commercially available kit (Easy-DNATM, Invitrogen). Amplification reactions (30 cycles, 90 seconds, annealing temperature 56°C) were performed in an Eppendorf personal thermal cycler.

PCR products were examined on 1.5% agarose gel with ethidium bromide staining. Once amplification of the desired sequence had been confirmed, enzymatic digestion was performed, using the restriction enzymes *BsmFI* (New England Biolabs) for the C/T-13910 mutation and *HhaI* (Invitrogen) for the G/A-22018 mutation under the following conditions: 16 µL water, 3 µL buffer, 1 µL restriction enzyme, and 10 µL PCR product for 4 hours at 65° C and 37° C respectively.

The result was checked by electrophoresis on a 2% agarose gel to confirm the presence or absence of the C/T-13910 mutation. Patients were classified as follows: (a) CC genotype = no lactase persistence (lactose intolerance); or (b) CT or TT genotype = lactase persistence (lactose tolerance).

### **Dietary Calcium Intake**

Calcium intake was assessed by means of a 24-hour dietary recordatory, which was administered by a duly trained dietitian, at a dedicated office in the SGM/HCPA outpatient MPS clinic, and completed by the patient (if aged 12 years or older) or the patient's guardian (in patients under the age of 12).

Calculation of dietary calcium intake was performed with the *DietWin Pro* 2011 software. The recorded values were compared to the Recommended Daily Allowance (RDA) for calcium at the corresponding age range, as defined by the Food and Nutrition Board of the Institute of Medicine (National Academies, 2000).

### **Bowel Mucosa Histology in a Mouse Model of MPS I**

Small-bowel specimens obtained from wild type mice and from alpha-L-iduronidase knockout mice (MPS I mice), aged 8–10 months, were stained with hematoxylin and eosin (H&E), periodic acid–Schiff (PAS), and Alcian blue and sent for histological examination. These specimens had been collected for a prior project (GPPG no. 09-420).

Specimens were processed at the HCPA Gene Therapy Center. After euthanasia, small and large intestine samples were collected and fixed in 10% formalin. The specimens were then dehydrated in a graded ethanol series and embedded in melted paraffin (temperature, 56–60° C) as long as necessary for complete impregnation. The resulting paraffin blocks were then cut into slices (mean thickness, 4 µm) for H&E, PAS, and Alcian blue staining as per routine hospital protocols. All histological analyses were performed under light microscopy (Olympus BX51 optical microscope) by a duly trained HCPA staff pathologist.

### **Statistical Analysis**

Data were entered into a Microsoft® Excel electronic spreadsheet. Statistical analyses were conducted in the PASW Statistics 18.0 software environment (SPSS Inc, Chicago, IL). Categorical variables were expressed as absolute and relative frequencies and continuous variables as mean ± standard deviation or median (interquartile range). The chi-square test was used to test for association between categorical variables. Other nonparametric tests were employed as needed to evaluate potential associations among study variables. Results were considered significant when  $p < 0.05$ .

### **Results**

Of the 34 patients undergoing regular follow-up at SGM-HCPA who could take part in the project, 6 failed to attend their appointed visits during the study period and one declined to participate. Therefore, 27 patients were included in the study, 15 males (55.6%) and 12 females (44.4%). Not counting the 8 patients with MPS II, which is an X-linked recessive condition, the gender distribution was 12 males (63.1%) and 7 females (36.9%). The median age was 12 years (IQR, 1–28 years). The sample profile is described in Table 1.

**Table 1.** Characterization of the sample studied (n=27).

<b>Variable</b>	<b>N=27</b>
Age, years – median (IQR)	12 (1 – 28)
Sex – n (%)	
Male	15 (55,6)
Female	12 (44,4)
MPS type – n (%)	
I	6 (22,2)
II	8 (29,6)
III	4 (14,9)
IV	6 (22,2)
VI	3 (11,1)
ERT – n (%)	
Yes	12 (44,4)
I	4(33,3)
II	5(41,7)
VI	3(25,0)
No	15 (55,56)
I	2(13,3)
II	3(20,0)
III	4(26,7)
VI	6(40,00)

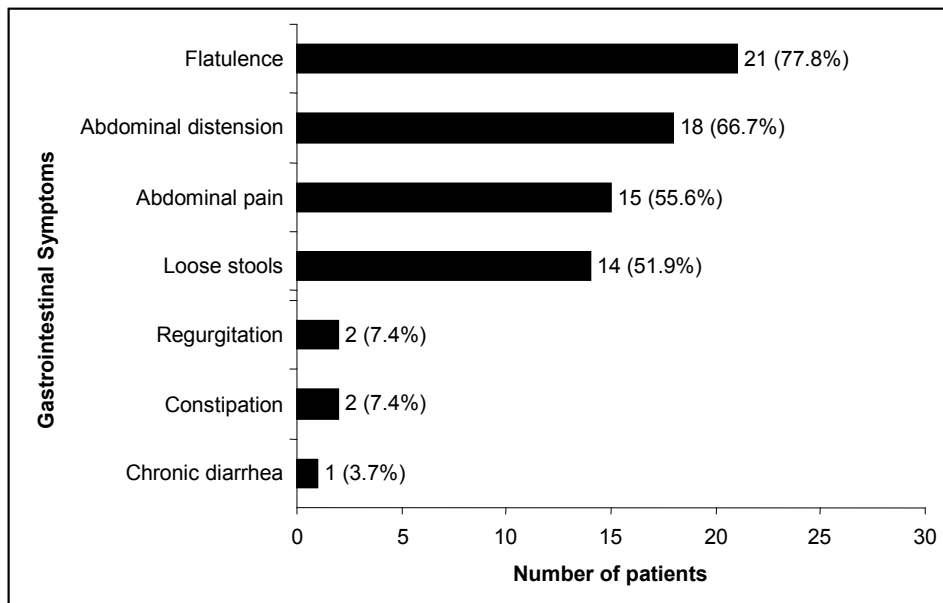
MPS, mucopolysaccharidosis; ERT, enzyme replacement therapy.

Font: Matar et al, 2010

Overall, 12 of the 27 patients (44.4%) were on ERT at the time of the study. Of these 12 patients, 4 had MPS I, 5 had MPS II, and 3 had MPS VI.

### ***Gastrointestinal Symptoms in Patients with MPS***

The most prevalent gastrointestinal symptoms reported by the patients were flatulence, abdominal distension, abdominal pain, and loose stools (Figure 1). The mean number of gastrointestinal symptoms reported by each patient was  $3.44 \pm 1.47$ .



**Figure 1.** Gastrointestinal symptoms reported by patients with MPS (n=27).

The association between gastrointestinal symptoms and MPS subtypes is described in Table 2. There were significant differences in the prevalence of flatulence across MPS subtypes ( $p=0.004$ ). As shown in Table 2, the prevalence of this complaint was lower in patients with MPS VI as compared with the other MPS subtypes. The remaining gastrointestinal symptoms had no statistically significant differences in distribution across the different MPS subtypes.

After pooling the 4 most commonly reported symptoms (flatulence, abdominal pain, abdominal distension, and loose stools), we found a significant difference in the occurrence of these symptoms between patients with MPS VI and patients with the other subtypes ( $p=0.02$ ). The association between gastrointestinal symptoms and presence or absence of ERT in patients with different MPS subtypes is described in Table 2. After pooling the 2 most prevalent gastrointestinal complaints (i.e., flatulence and abdominal distension), a significant reduction in the occurrence of these symptoms was found among patients who were on ERT as compared with patients who were not on ERT ( $p = 0.04$  and  $0.03$  respectively).

After pooling the 4 most commonly reported symptoms (flatulence, abdominal pain, abdominal distension, and loose stools), there was no significant difference in the occurrence of these symptoms between patients who were on ERT and those who were not on ERT. Nevertheless, despite the absence of statistical significance, patients who had all 4 of these symptoms were more likely to be in the non-ERT group. Whereas

the prevalence of gastrointestinal symptoms was 16.7% in the ERT group, the prevalence in the non-ERT group was 53%.

Urinary GAG values from all study patients were analyzed and compared against the reference range for their age group as previously established by the SGM/HCPA Laboratory for Inborn Errors of Metabolism. As shown in Table 2, patients with urinary GAG levels within normal limits for age had significantly lower rates of loose stools as compared with patients whose urinary GAG levels were abnormal ( $p=0.016$ ).

None of the patients with GAG levels within normal limits had all 4 of the most commonly reported gastrointestinal symptoms, whereas 45.5% of those with abnormal GAG levels had all 4 symptoms simultaneously ( $p=0.04$ ). This is consistent with the number of symptoms reported, as patients with normal GAG levels reported a much smaller number of symptoms (median = 1) than patients with abnormal GAG levels (median = 4).

Again, despite the absence of a statistically significant difference in this small sample, it bears stressing that patients with abnormal GAG levels had a threefold prevalence of abdominal pain as compared to patients with normal GAG levels.

## **Biochemical Tests**

To rule out any non-MPS organic causes that might be implicated in their gastrointestinal symptoms, all patients in the sample underwent a battery of clinical chemistry tests. All patients had IgA immunoglobulin, anti-transglutaminase IgA, CRP, ESR, albumin, ferritin, and ANCA levels within normal limits. Fecal alpha-1-antitrypsin levels were also normal in all 24 patients in whom they were measured.

ASCA testing was performed in 22 of the 27 patients in the sample. Of these 22, only 2 patients had abnormal results.

Fecal pancreatic elastase-1 levels were measured in 24 of the 27 patients. Of these 24, one patient (ID Patient #03) had levels consistent with moderate pancreatic insufficiency; all others had levels consistent with normal pancreatic function.

Hematocrit, hemoglobin, and MCV values were available and normal for all patients, other than one patient that had all 3 of these parameters below the reference range.

**Table 2.** Association between gastrointestinal symptoms in patients with MPS and the following variables: MPS subtype, ERT, urinary GAG levels, CC and CT/TT genotype, and 24-hour dietary recordatory calcium intake.

Symptoms	MPS I (n=6) n (%)	MPS II (n=8) n (%)	MPS III (n=4) n (%)	MPS IV (n=6) n (%)	MPS VI (n=3) n (%)	p	On ERT (n=12) n (%)	Off ERT (n=15) n (%)	p	Normal urinary GAGs (n=5) n (%)	Abnormal urinary GAGs (n=22) n (%)	p	CC genotype (n=10) n (%)	CT/TT genotype (n=07) n (%)	p	Ca intake below RDA (n=03) n (%)	Adequate Ca intake (n=08) n (%)	Ca intake above RDA (n=16) n (%)	p- value
Flatulence	4 (66.7)	8 (100)	3 (75.0)	6 (100)	0 (0.0)	0.004	7 (58.3)	14(93.3)	0.040	3 (60.0)	18 (81.8)	0.303	8 (80.0)	6 (85,7)	1.000	2 (66.7)	5 (62.5)	14( 87.5)	0.294
Abdominal Distension	4 (66.7)	5 (62.5)	4 (100)	4 (66.7)	1 (33.3)	0.523	5 (41.7)	13(86.7)	0.037	2 (40.0)	16 (72.7)	0.295	09 (90.0)	2 (28,5)	0.030	3 (100.0)	5 (62.5)	10 (62.5)	0.690
Abdominal Pain	4 (66.7)	6 (75.0)	2 (50.0)	2 (33.3)	1 (33.3)	0.569	6 (50.0)	9 (60.0)	0.707	1 (20.0)	14 (63.6)	0.139	10 (100.0)	2 (28,5)	0.003	3 (100.0)	5 (62.5)	7 (43.8)	0.233
Loose Stools	4 (66.7)	4 (50.0)	2 (50.0)	3 (50.0)	1 (33.3)	0.953	5 (41.7)	9 (60.0)	0.449	0 (0.0)	14 (63.6)	0.016	8 (80.0)	1 (28,5)	0.010	1 (33.3)	8 (100.0)	1 (33.3)	0.738
Regurgitation	1 (16.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (16.7)	0 (0.0)	0.724	1 (8.3)	1 (6.7)	1.000	0 (0.0)	2 (9.1)	1.000	0 (0.0)	1 (14,2)	0.410	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (12.5)	0.625
Constipation	0 (0.0)	1 (12.5)	1 (25.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0.620	0 (0.0)	2 (13.3)	0.487	0 (0.0)	2 (9.1)	1.000	0 (0.0)	0 (0,0)	0.430	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (12.5)	0.625
Chronic Diarrhea	0 (0.0)	1 (12.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1.000	1 (8.3)	0 (0.0)	0.444	0 (0.0)	1 (4.5)	1.000	0 (0.0)	1 (14,2)	0.413	1 (33.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0.105
Flatulence or Loose Stools or Abdominal Distension or Abdominal Pain	5 (83.3)	8 (100)	4 (100)	6 (100)	1 (33.3)	0.021	9 (75.0)	15 (100)	0.075	4 (80.0)	20 (90.9)	0.474	10 (100.0)	06 (85,7)	0.412	3 (100)	6 (75)	15 (93.8)	0.481
Flatulence + Loose Stools + Abdominal Distension + Abdominal Pain	3 (50.0)	5 (62.5)	2(50.0)	2 (33.3)	0 (0.0)	0.539	2 (16.7)	8 (53.0)	0.236	0 (0.0)	10 (45.5)	0.042	6 (60.0)	0 (0.0)	0.035	1 (33.3)	4 (50.0)	3 (18.8)	0.274
Number of symptoms – median (range)	4 (1–5)	4.5(1–5)	4 (2–4)	3.5 (1– 4)	1 (1–5)	0.441	4 (1–4)	4 (3–5)	0.271	1 (1–3)	4 (4–5)	0.013	4(4–5)	2 (1–4)	0.055	4 (4–5)	4 (1–5)	4 (1–5)	0.232



### ***Genotyping for LCT-13910 C>T Polymorphism***

Of the 27 patients included in the study, 17 underwent genotyping for the LCT-13910 C>T polymorphism to assess lactase persistence. Of these patients, 10 (58.8%) had the CC genotype (consistent with lactose intolerance); 2 (11.8%) had the TT genotype; and 5 (29.4%) had the CT genotype (the latter 2 are compatible with lactose tolerance). Analysis of gastrointestinal symptoms in patients with the CC and CT/TT genotypes is shown in Table 2.

There were significant differences in the prevalence of abdominal distension, abdominal pain, and loose stools among patients with the CC genotype (consistence with lactose intolerance) versus patients with the CT or TT genotypes ( $p = 0.03$ ,  $0.003$ , and  $0.010$  respectively).

Analysis of the simultaneous occurrence of the 4 most prevalent gastrointestinal complaints reported by the sample (flatulence, abdominal pain, abdominal distension, and loose stools) showed a significantly higher occurrence of these symptoms in patients with the CC genotype as compared with CT/TT patients ( $p=0.03$ ). No patients with the CT/TT genotype had all 4 symptoms, whereas 60% of patients with the CC genotype did. This is consistent with the number of symptoms reported, as patients with the CT/TT genotypes reported a smaller number of symptoms (median = 2) than patients with the CC genotype (median = 4), which is indicative of lactose intolerance.

No statistically significant differences were found among patients with the CC genotype in terms of distribution of the different MPS subtypes.

### ***Dietary Calcium Intake***

Mean and median total calcium intake values as determined by the 24-hour dietary recall administered to all 27 patients were  $1,048.00 \pm 407.02$  mg/day and 1,000 (1,000–1,400) mg/day respectively. Comparison of patient calcium intakes against RDAs for calcium showed that 16 patients had a calcium intake exceeding the RDA, 8 had an adequate calcium intake, and only 3 had a calcium intake below the RDA.

The association between calcium intake and occurrence of gastrointestinal symptoms is shown in Table 2. There were no significant differences among the study variables, as the aforementioned symptoms were prevalent across the entire sample.

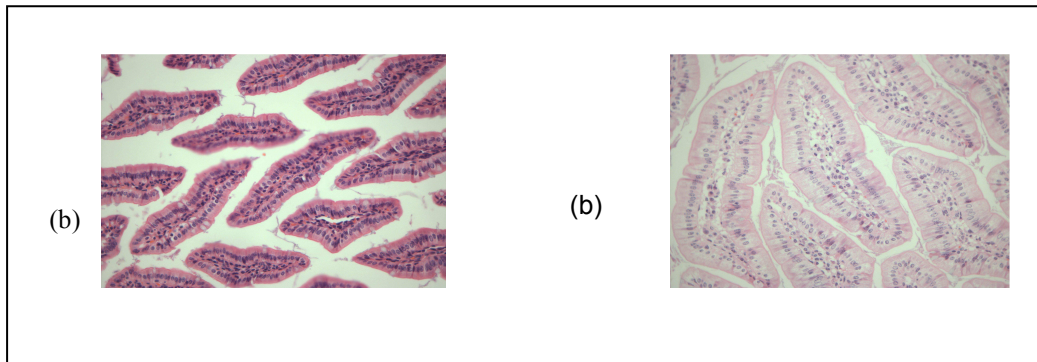
### ***Bowel Mucosa Histology in a Mouse Model of MPS I***

In the present study, we also assessed the structure of the small-bowel mucosa in a mouse model of MPS I – a 9-month-old alpha-L-iduronidase knockout mouse – and compared it to that of a healthy, 8-month-old control mouse.

No abnormalities in small-bowel structure were found on microscopic examination of the MPS I mouse specimen in addition to those already known to be associated with MPS I. These known abnormalities were characterized by intracellular accumulation of material in the epithelium of the villi of the small intestine, whereas no such changes were observed in the control mouse (Figure 2). Furthermore, there were fewer goblet cells in the villi of the MPS mouse specimen than in the healthy mouse specimen.

The small-bowel wall epithelial cell height was measured in the MPS I and control mice. Mean cell height was significantly higher in the MPS I mice ( $117.08 \pm 13.71$  mm) than in the control mice ( $64.42 \pm 11.50$  mm) ( $p < 0.001$ , Student's *t*-test).

Although the difference was not significant, the mean diameter of the lamina propria in the villi of the small intestine was greater in the MPS I mice ( $71.54 \pm 23.05$  mm) than in the healthy control mice ( $57.55 \pm 18.94$  mm).



**Figure 2:** Small-bowel histology in (a) a normal mouse and (b) an MPS I mouse. H&E stain, original magnification 400x (Olympus BX51 optical microscope)

### **Discussion**

This was the first study to assess gastrointestinal manifestations in Brazilian patients with different MPS subtypes.

In the present study, comparative analysis of gastrointestinal symptoms by MPS subtype showed a significant difference in the prevalence of flatulence across these subtypes. Patients with MPS VI had a lower prevalence of this symptom than patients with other MPS types. Furthermore, pooled analysis of the most common symptoms (flatulence, abdominal pain, abdominal distension, and loose stools) showed a statistically significant difference in the occurrence of these symptoms among MPS subtypes, with a lower prevalence in MPS VI. This may be explained by the inclusion of only 3 patients with MPS VI in the sample, and may thus constitute a limitation that should be taken into account.

Flatulence and abdominal distension were significantly more prevalent among patients who were not on ERT. Although the difference was not significant, patients who reported all 4 of the most common symptoms simultaneously were overrepresented in the non-ERT group. Whereas the prevalence of these symptoms was 16.7% among patients on ERT, those not on ERT reported a prevalence of 53%. This suggests that ERT may have a beneficial effect on some gastrointestinal symptoms.

The development of treatment strategies such as ERT has changed the natural history of many MPS types. Although this therapy has limited value in modifying some disease manifestations, weekly intravenous replacement of the deficient enzyme is associated with sustained, quantifiable benefits for patients<sup>14,15</sup>. ERT can prevent complications and/or delay disease progression and improve quality of life. In view of the findings of the present study, we hypothesize that ERT may also help reduce gastrointestinal symptoms in affected patients. Nevertheless, further studies with larger sample sizes are required to confirm these findings.

Regarding GAG excretion, patients who had increased urinary GAG levels and were not on ERT were found to have a higher proportion of gastrointestinal symptoms as compared with patients who were receiving ERT and had lower urinary GAGs levels. This is consistent with the previous studies, as one of the benefits of intravenous ERT is a reduction in GAG levels<sup>16</sup>. Therefore, this reduction in GAGs might minimize the occurrence of gastrointestinal symptoms in MPS patients.

In 2011, Hoffmann et al.<sup>17</sup> described the clinical course of 3 patients with MPS II and the potential therapeutic effects of ERT. All patients experienced improvements in visceromegaly, physical capacity, and gastrointestinal symptoms. All patients reported that bowel movements had become less bothersome after ERT.

The objective of biochemical assessment was to identify potential causes for the patients' gastrointestinal symptoms and gain a better understanding of their etiology. To rule

out any specific conditions potentially associated with gastrointestinal manifestation, all patients underwent a thorough workup for other conditions that might present with gastrointestinal symptoms, such as infections, celiac disease, ulcerative colitis, protein-losing enteropathy, pancreatic insufficiency, and inflammatory bowel disease, which might mask symptoms and/or act as confounders.

In the present study, despite frequent occurrence of gastrointestinal manifestations, the patients did not exhibit any relevant changes in nutritional status. This shows that patients' complaints were of a functional nature and did not jeopardize their nutritional status. Most laboratory tests performed to diagnose or rule out specific conditions in our patients were within normal limits, which suggests that the onset of gastrointestinal symptoms in these patients may be a result of MPS itself, through other pathophysiological mechanisms.

Histological analysis of small-bowel wall specimens from MPS I mice showed enlarged cells suggestive of intracellular accumulation of some material. We hypothesize that this finding corresponds to an accumulation of GAGs – which was difficult to identify on H&E + AB staining – or is attributable to hydropic degeneration of the cells. This intracellular buildup could jeopardize absorption of nutrients and other substances, leading to malabsorption and, consequently, to the development of gastrointestinal symptoms in MPS patients. Nevertheless, it bears stressing that all patients in our sample were well nourished, with good nutritional status and normal blood chemistry.

Studies on pathogenic mechanisms and gastrointestinal manifestations in patients with MPS are scarce. Roberts et al.<sup>18</sup> described gastrointestinal morphology and function in a mouse model of MPS IIIA. The weight of the stomach and duodenum were increased in MPS IIIA mice, as was duodenal length. Increased submucosal thickness was observed in the bowel of MPS IIIA mice as compared with control animals, and intralysosomal accumulation of GAGs was seen in the bowel wall and its villi. The authors suggested that the structural gastrointestinal changes observed in MPS IIIA mice might contribute to the weight gain seen in this condition.

The GAGs that accumulate abnormally in patients with MPS are not only major components of the extracellular matrix and surface cells, but are also associated with relevant cell functions (motility, interaction between extra- and intracellular matrix regulation) and play a role in the regulation of extracellular signaling pathways<sup>13,19</sup>. Hence, the loss of GAG degradation ability in patients with MPS leads to elevated levels of these cell constituents, which, in turn, produce structural changes in the cells and may trigger development of

gastrointestinal symptoms<sup>18</sup>. This hypothesis would justify the fact that most biochemical tests performed in our patients were within normal limits, suggesting that their gastrointestinal complaints might be associated with increased cell volume, as observed in small-bowel samples from a mouse model of MPS. Nevertheless, the potential correlation between increased GAG levels and development of gastrointestinal symptoms remains unclear, and further studies are required to elucidate these findings.

On molecular testing for the LCT-13910 C□T polymorphism, 58.8% of patients were found to have the CC genotype, which is consistent with lactose intolerance. It bears stressing that all patients included in the study were of European descent. Mattar et al.<sup>20</sup> conducted a survey of the prevalence of primary lactase deficiency in Brazil by genetic testing for the lactase persistence polymorphism. The prevalence was 57% in white subjects, 57% in brown subjects, and 80% in black subjects – figures consistent with the findings of the present study.

There were no significant differences among patients with the CC genotype in terms of different MPS subtypes. This was expected and is consistent with the literature, as the frequency of lactose intolerance usually follows a random distribution among populations<sup>21</sup>.

The patients included in the present study reported a wide range of gastrointestinal symptoms. Factors that may account for this variability include the osmolality and fat content of sugar-containing foods, gastric emptying, sensitivity to abdominal distension triggered by the osmotic burden of undigested lactose in the upper small bowel, bowel transit time, and the colonic response to carbohydrate intake. In general, high-osmolar, high-fat foods slow gastric emptying and reduce the severity of lactose-associated symptoms<sup>21,22</sup>.

Data on dietary calcium intake for this study were obtained by means of a 24-hour dietary recordatory, which defines the type and quantity of foods and beverages consumed in the day preceding the interview. Advantages of this method include its rapid administration, absence of effect on patient dietary habits, low cost, and possibility of administration to individuals of all age ranges as well as to illiterate subjects<sup>23</sup>. Nevertheless, Witschi<sup>24</sup> notes possible sources of error that may bias self-reported dietary intake: the respondent's perceptions of what he or she eats; the respondent's memory; effects related to age, sex, and interview setting; interviewer skill in obtaining information; and willingness of the respondent to cooperate.

In the present study, a large number of MPS patients had high calcium intake levels. Taking into account that patients with MPS have enlarged cells in the small bowel due to a accumulation of GAG, it is essential that health care providers monitor gastrointestinal

complaints in an attempt to minimize these symptoms. Patients with lactose intolerance and restricted milk and dairy intake should be assessed for adequacy of dietary calcium intake. If it is insufficient, supplemental calcium (and vitamin D, if necessary) should be provided<sup>25</sup>.

Gastrointestinal manifestations have been reported in other LSDs<sup>26</sup>, but are often overshadowed by severe neurological phenotypes. We believe that further studies focusing on the gastrointestinal manifestations of MPS are warranted, both to corroborate our findings and to provide a better understanding of the pathophysiological mechanisms involved in the symptoms reported by these patients. We also believe that a specific protocol or algorithm for assessment and monitoring of gastrointestinal symptoms in patients with MPS should be developed. Such a standardized instrument would certainly contribute to a significant improvement in the quality of life of these patients and their family members.

### **Acknowledgments**

The authors thank all the team at the Medical Genetics Service of HCPA, as well as the Clinical Research Center of HCPA for the support and collaboration in this study. The authors also thank the Prof<sup>ª</sup> Elizabeth Neufeld for the kind gift of MPS I mice. This project was supported by FIPE / HCPA (No. 12-0259).

### **References**

1. Neufeld EF, Muenzer J. The mucopolysaccharidoses. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, ed. *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. New York: MacGraw-Hill; 2005. p. 3421-52.
2. Vieira T, Schwartz IVS, Munoz V, Pinto L, Steiner C, Ribeiro M, et al. Mucopolysaccharidoses in Brazil: what happens from birth to biochemical diagnosis? *Am J Med Genet*. 2008; 146A:1741-7.
3. Pinto LL, Schwartz IVS, Puga AC, Vieira TA, Munoz MV, Giugliani R, et al. Prospective study of 11 Brazilian patients with mucopolysaccharidosis II. *J Pediatr (Rio J)*. 2006;82:273-8.

4. Poorthuis BJ, Wevers RA, Kleijer WJ, Groener JE, Jong JG, Van Weely S, et al. The frequency of lysosomal storage in the Netherlands. *Hum Genet.* 1999;105(1- 2):151-6.
5. Applegarth DA, Tonne JR, Lowry RB. Incidence of inborn errors of metabolism in British Columbia. *Pediatrics.* 2000; 105:10-14.
6. Nelson J, Crowhurst J, Carey B, Greed L. Incidence of the mucopolysaccharidosis in Western Australia. *Am J Med Genet.* 2003;123A: 310-3.
7. Giugliani R, Federhen A, Muñoz Rojas MV, Vieira T, Artigalás O, Pinto L, et al. Mucopolysaccharidosis I, II, and VI: Brief review and guidelines for treatment. *Genetics and Molecular Biology.* 2010; 33(4):589–604.
8. Giugliani R. Mucopolysaccharidoses: From understanding to treatment, a century of discoveries. *Genetics and Molecular Biology.* 2012;35(4): 924-31.
9. Muenzer, J. The mucopolysaccharidoses: A heterogeneous group of disorders with variable pediatric presentations. *J Pediatric.* 2004;144: S27-S34.
10. Bhaumik M, Muller VJ, Rozaklis T, Johnson L, Dobrenis K, Bhattacharyya R, et al. P. A mouse model for mucopolysaccharidosis type III A (MPS IIIA). *Glycobiology.* 1999; 9:1389–1396.
11. Elsner B. Ultrastructure of the rectal wall in Hunter’s syndrome. *Gastroenterology.* 1970; 58:856–862.
12. Wegrzyn G, Kurlenda J, Liberek A. Atypical microbial infections of digestive tract may contribute to diarrhea in mucopolysaccharidosis patients: a MPS I case study. *BioMed Central.* 2005; 5(9): 1-5.
13. Sibilio M, Miele E, Ungano C, Astarita L, Turco R, DI Natale P, et al. Chronic Diarrhea in Mucopolysaccharidosis IIIB. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2009;49(4):477-80.
14. Harmtz P, Giugliani R, Schwartz IV, Guffon N, Teles E, Sá Miranda M, et al. Long-term follow-up of endurance and safety outcomes during enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis VI: Final results of three clinical studies of recombinant human N-acetylgalactosamine 4-sulfatase. *Mol Genet Metab.* 2008; 94:469-475.
15. Clarke LA, Wraith JE, Beck M, Kolodny EH, Pastores GM, Muenzer J, et al. Long-term efficacy and safety of laronidase in the treatment of mucopolysaccharidosis I. *Pediatrics.* 2009;123:229-240.
16. Muenzer J, Bodamer O, Burton B, Clarke L, Frenking GS, Giugliani R, et al. The role of enzyme replacement therapy in severe Hunter syndrome-an expert panel consensus. *J Pediatr.* 2011;171(1):181-8.

17. Hoffmann B, Schulze-Frenking G, Al-Sawaf S, Beck, Mayatepek E. Hunter Disease before and during enzyme replacement therapy. *Pediatric Neurology*. 2011; 45: 181-184.
18. Roberts ALK, Howard GS, Liam WC, Moretta S, Kritas S, Lymn KA, et al. Gastrointestinal Pathology in a Mouse Model of Mucopolysaccharidosis Type IIIA. *Journal of Cellular Physiology*. 2009; 219: 259-264.
19. Bode L, Murch S, Freeze HH. Heparan sulfate plays a central role in a dynamic in vitro model of protein-losing enteropathy. *J Biol Chem*. 2006;281:7809–15.
20. Mattar R, Monteiro MS, Villares CA, Santos AF, Silva JMK, Carrilho FJ. Frequency of LCT -13910C>T single nucleotide polymorphism associated with adult-type hypolactasia/lactase persistence among Brazilians of different ethnic groups. *Nutr J*. 2009;8:46. doi: 10.1186/1475-2891-8-46.
21. Mattar R, Mazo DFC. Intolerância a lactose: mudanças de paradigma com a biologia molecular. *Rev Assoc Med Bras*. 2010;56(2): 230-6.
22. Sahi, T. Genetics and epidemiology of adult-type hypolactasia. *Scand J Gastroenterol*. 1994;29:7-20.
23. Fisberg RM, et al. Recomendações Nutricionais. In Fisberg, RM. *Inquéritos Alimentares: métodos e bases científicos*, Barueri, SP: Manole, 2005b.
24. Witschi JC. Short-term dietary recall and recording methods. In: Willett W. *Nutritional Epidemiology*. New York: Oxford University Press;1998. p.52-68.
25. Montalto M, Curugliano V, Santoro L, Vastola M, Cammarota G, Manna R. et al. Management and treatment of lactose malabsorption. *World J Gastroenterol*. 2006;12:187-91.
26. Hoffmann B, Schwartz M, Mehta A, Keshav S. Gastrointestinal symptoms in 342 patients with Fabry disease: Prevalence and response to enzyme replacement therapy. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007; 5:1447-53.



## 9. ARTIGO 2 EM PORTUGUÊS

### **Avaliação da Gordura Corporal através da Bioimpedância Elétrica em Pacientes com Mucopolissacaridoses**

Luciana Giugliani<sup>1</sup>, Carolina F. M. Souza<sup>2</sup>, Roberto Giugliani<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação na Saúde da Criança e do Adolescente, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

<sup>2</sup> Serviço de Genética Médica, HCPA, Porto Alegre, Brasil

<sup>3</sup> Departamento de Genética, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

#### **Autor Correspondente:**

Roberto Giugliani  
Serviço de Genética Médica  
Hospital de Clinicas de Porto Alegre  
Rua Ramiro Barcelos 2350  
Porto Alegre, RS 90035-903  
Brasil

Tel + 55 51 3359-6338

Fax + 55 51 3359 8010

Email: [rgiugliani@hcpa.ufrgs.br](mailto:rgiugliani@hcpa.ufrgs.br)

## Resumo

**Introdução:** As Mucopolissacaridoses (MPS) são doenças lisossômicas caracterizadas pela deficiência de enzimas lisossômicas na degradação dos glicoaminoglicanos. O acúmulo anormal dessa molécula compromete a função celular e orgânica, levando a um espectro de manifestações clínicas, de caráter multisistêmico e progressivo. Apesar de não ser uma doença para a qual um tratamento dietético modifica o desfecho, é uma condição na qual os pacientes se beneficiam de acompanhamento nutricional. **Objetivo:** Avaliar o estado nutricional dos pacientes com MPS atendidos num serviço especializado, por meio da avaliação da composição corporal através da Bioimpedância Elétrica (BIA). **Métodos:** Estudo transversal com amostragem de conveniência. Os critérios de inclusão foram: diagnóstico confirmado de MPS, idade igual ou superior a 10 anos e presença de condições adequadas para a realização dos exames. Os sujeitos foram avaliados por meio de antropometria e parâmetros de composição corporal fornecidos pela BIA. **Resultados:** Foram incluídos 13 pacientes, sendo 7 (53,8%) do sexo feminino e 6 (46,2%) do sexo masculino, com mediana de idade de 22 (12-28) e 15 (10-19) anos, respectivamente. Em relação ao estado nutricional, 5 (38,4%) eram eutróficos, 4 (30,8%) apresentaram sobrepeso e 4 (30,8%) obesidade. Não houve diferença estatística no percentual de massa magra (MM) e massa gorda (MG) quando comparados aos diferentes tipos de MPS. Entretanto, observou-se que os pacientes com MPS IVA apresentaram uma tendência maior no %MG em relação aos demais tipos de MPS estudadas. **Conclusão:** Pacientes que estavam em Terapia de Reposição Enzimática (TRE) apresentaram um percentual de MG estatisticamente menor em comparação ao grupo sem TRE, sugerindo um possível efeito do tratamento no acúmulo de gordura corporal. Acreditamos ser de grande relevância o acompanhamento nutricional no manejo dos pacientes com MPS, visando a adequação dos parâmetros nutricionais. Estudos adicionais com amostras maiores são necessários para confirmar as tendências observadas neste estudo.

**Palavras-chave:** Doenças Lisossômica, Mucopolissacaridoses, Bioimpedância, Gordura Corporal, Terapia Reposição Enzimática

## Introdução

As Mucopolissacaridoses (MPS) são um grupo de Doenças Lisossômicas de Depósitos (DLDs) caracterizadas pelo acúmulo intralisossômico de glicosaminoglicanos (GAGs), secundário à deficiência na atividade de uma enzima lisossômica envolvida na degradação dessas moléculas. O acúmulo dos GAGs não degradados ou parcialmente degradados compromete a função celular e orgânica, levando a um grande número de manifestações clínicas, as quais são progressivas e afetam múltiplos órgãos e sistemas. Esses substratos são excretados em quantidades aumentadas na urina (1,2).

As MPS são classificadas em onze condições de acordo com a deficiência enzimática envolvida. De acordo com a enzima deficiente, as MPS são classificadas em: MPS I (Deficiência de  $\alpha$ -L-iduronidase); MPS II (Deficiência de Iduronato-2-sulfatase); MPS IIIA (Deficiência de Heparan N-sulfatase); MPS IIIB (Deficiência de  $\alpha$ -N-acetil-glicosaminidase); MPS IIIC (Deficiência de Acetil-Coa-  $\alpha$ -glicosamina-acetiltransferase); MPS IIID (Deficiência de N-acetil-glicosamina-6- sulfatase); MPS IVA (Deficiência de N-acetil-galactosamina-6-sulfatase); MPS IVB (Deficiência de  $\beta$ -galactosidase); MPS VI (Deficiência de N-acetil-galactosamina-4-sulfatase); MPS VII (Deficiência de  $\beta$ -glicuronidase) e MPS IX (deficiência de Hialuronidase) (3).

As MPS são doenças raras, apresentando incidência estimada de 1,9 a 4,5:100,000 em recém-nascidos vivos (4-6), de acordo com estudos realizados em diferentes países.

Os quadros clínicos das MPS são crônicos e progressivos. As manifestações clínicas dessa doença são caracterizadas pela presença de: face grosseira, contraturas articulares, hepatoesplenomegalia, disostose múltipla, surdez, opacificação de córnea, diarreia, cardiopatia, doença pulmonar obstrutiva crônica, apnéia do sono, déficit de crescimento e retardo mental (1).

O tratamento da MPS pode ser específico ou sintomático. O tratamento específico busca substituir a enzima deficiente, retardar a progressão da doença, melhorar anormalidades sistemáticas e proporcionar maior qualidade de vida aos pacientes. Dentre os tratamentos atuais e potenciais, podemos citar o transplante de células hematopoiéticas/transplante de medula óssea, a terapia de reposição enzimática (TRE), terapia de inibição de síntese de substrato, além de terapia gênica, os quais estudos têm apontado resultados promissores. Atualmente, já há TRE aprovada para as MPS I, II e VI. Essa terapia consiste na administração periódica, por via venosa, da enzima específica deficiente no paciente. Esse tratamento vem proporcionando bons resultados em relação aos aspectos clínicos e à qualidade de vida. (7,8). O tratamento sintomático é dirigido ao manejo das complicações da doença e envolve uma equipe multidisciplinar, composta por médicos pediatras, neurologistas, cardiologistas, fisiatras, pneumologistas entre outros, assim como por profissionais da área de reabilitação como fisioterapeuta, fonoaudiólogos, psicólogos, nutricionistas e dentistas. Esses tratamentos visam à melhora dos sintomas clínicos, à manutenção das funções existentes e à orientação dos pacientes e de seus familiares. (9).

A nutrição tem um papel importante dentro do plano de tratamento das MPS. Apesar de não ser uma doença para a qual um tratamento dietético modifica o desfecho, é necessário um acompanhamento nutricional desses pacientes, uma vez que observações isoladas e não sistemáticas indicam uma maior propensão de ganho de peso em proporção à estatura (usualmente diminuída), sendo sugerido que a introdução de TRE pode ter relação com alteração no peso nos pacientes. Um estado nutricional adequado é importante para o indivíduo, não só para a qualidade de vida como também para as suas relações inter e intrapessoais. Apesar disso, não existem na literatura estudos relativos à avaliação nutricional da composição corporal em pacientes com Mucopolissacaridoses.

A composição corporal pode ser avaliada por métodos simples como a antropometria (peso e altura), ou por medições mais sofisticadas como a Bioimpedância Elétrica (BIA) (10).

A análise por Bioimpedância Elétrica é uma ferramenta que têm sido cada vez mais utilizada para avaliar o estado nutricional. Esta técnica incorpora tanto a avaliação funcional quanto morfológica, tendo um medidor portátil sido desenvolvido durante as últimas décadas (11).

O uso da BIA tem demonstrado eficiência na aferição de compartimentos corporais em diversas situações clínicas como desnutrição, trauma, pré e pós operatório, doenças hepáticas, insuficiência renal, gestação, crianças, atletas, dentre outros. Porém, a composição corporal sempre deve ser analisada e interpretada conforme grupo específico (12).

A BIA tem provado ser um método barato, seguro e não-invasivo para avaliação da composição corporal na prática clínica, e tem atraído atenção nos últimos 20 anos. A BIA é um exame de alta precisão, proporcionando uma medida direta da impedância corporal através da resistência, reactância e ângulo de fase do paciente. Essa avaliação estima diversos parâmetros da composição corporal como massa gorda, massa magra, massa intra e extracelular, relação entre massa intra e extracelular, água corporal total, água intra e extracelular, índice de massa corporal (IMC) e taxa de metabolismo basal (TMB) (13).

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi de analisar o estado nutricional dos pacientes com mucopolissacaridoses atendidos no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (AM-SGM/HCPA) por meio da avaliação da composição corporal através da Bioimpedância Elétrica.

## **Material e métodos**

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA (número 12-0259). Todos os pacientes e/ou seus responsáveis assinaram o termo de consentimento

livre e esclarecido (TCLE). Este trabalho é um estudo transversal envolvendo uma série de casos. A coleta de dados ocorreu de agosto de 2012 a maio de 2013.

### **Pacientes**

Foram incluídos no estudo pacientes com Mucopolissacaridoses com idade  $\geq 10$  anos e que possuíam condições adequadas para realização do exame. Os critérios de exclusão foram: pacientes grávidas, portadores de marcapasso, pacientes com idade  $\leq 09$  anos, pacientes com impossibilidade de realizar o exame de Bioimpedância (paciente inquieto e/ou agitado), paciente que não compareceu ao ambulatório no período de coleta de dados assim como a não concordância do paciente, pais e/ou representantes legais em participar do estudo.

### **Antropometria**

Os dados antropométricos foram aferidos em um único momento durante o estudo. O peso foi obtido através da balança eletrônica digital marca Toledo®, com capacidade máxima de 200Kg e sensibilidade de 100g. Os pacientes foram pesados com o mínimo de roupa possível, com os pés descalços e unidos no centro da balança, eretos e com os braços estendidos ao longo do corpo. A altura dos pacientes foi realizada através de estadiômetro fixado na parede com comprimento de 2m e escala de 0,1 cm. Para aferir a altura os pacientes foram posicionados de costas para o estadiômetro, descalços, sem adereços na cabeça, com os pés unidos e braços estendidos ao longo do corpo, eretos e com olhar para o horizonte. As técnicas para aferição de altura e peso são preconizadas por Jelliffe (14).

Para a avaliação dos dados antropométricos de pacientes menores de 19 anos foi utilizado o *Software WHO Anthro Plus®* versão 1.0.4 de 2009, determinando os percentis para o indicador de IMC por idade (IMC/I); e para os pacientes maiores de 19 anos foi calculado o IMC com massa corporal expressa em quilogramas e a estatura em metros quadrados. Os

valores encontrados de tais dados foram classificados de acordo com o preconizado pela WHO (2007) (15) e WHO (1995) (16), respectivamente.

Essas medidas foram aferidas no Centro de Pesquisa Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CPC/HCPA) por um único observador, nesse caso, a nutricionista e também autora do trabalho.

### **Bioimpedância Elétrica (BIA)**

Para avaliar a composição corporal dos pacientes, foi utilizado o aparelho de Bioimpedância *Biodynamics* Modelo 450, marca registrada da *Biodynamics Corporation*® nos Estados Unidos. A precisão do mesmo é de 0,1% na Resistência, 0,2% na Reactância e 0,2% no ângulo de fase. O aparelho emite uma corrente elétrica subliminar de baixa intensidade (80 mA – 50 kHz), atendendo às exigências da *Association for Advancement of Medical Instrumentation* (ES-1988).

Para se obter uma boa precisão no teste, os pacientes foram instruídos da seguinte forma: 1. Evitar consumo de álcool, cafeína (café, chá, chocolate) 24h antes do teste; 2. Não realizar atividade física intensa 24 horas antes do teste; 3. Estar de jejum de 4 horas; 4. Retirar metais (brinco, colar, anel, pulseira, piercing e adornos em geral); 5. Suspende medicação diurética 24 horas antes do teste, exceto no caso de indivíduos hipertensos, que devem estar sob rigoroso controle médico; 6. Urinar pelo menos 30 minutos antes da realização do teste.

A BIA foi realizada no Centro de Pesquisa Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pela autora do trabalho. As medidas para esse teste foram aferidas uma única vez com o paciente deitado, em decúbito dorsal, posição confortável e relaxado. Os braços foram afastados do tronco em um ângulo de 30°, e as pernas foram afastadas entre si, formando um ângulo de aproximadamente 45°, segundo orientações do fabricante. De acordo com a descrição internacional da técnica, os 04 eletrodos foram posicionados sobre a pele

desinfetada e seca, em locais previamente padronizados: **Pé Direito:** O eletrodo distal na base do dedo médio e o eletrodo proximal um pouco acima da linha da articulação do tornozelo, entre os maléolos medial e lateral; **Mão direita:** O eletrodo distal na base do dedo médio e o eletrodo proximal um pouco acima da linha da articulação do punho, coincidindo com o processo estiloide. Procedeu-se então a realização do exame e o aparelho já fornecia o percentual de gordura diretamente.

Esse método baseia-se na condução de uma corrente elétrica de baixa intensidade através do corpo. A impedância ou resistência ao fluxo da corrente elétrica é medida pela bioimpedância elétrica. Como a impedância varia de acordo com o tecido que está sendo mensurado e, sendo a massa magra um bom condutor de energia (baixa resistência à corrente) por possuir alta concentração de água e eletrólitos e a massa gorda um mal condutor de energia (alta resistência à corrente), pode-se dizer que a impedância é diretamente proporcional ao percentual de gordura corporal.

Tomou-se como parâmetro o percentual de MG fornecido pelo aparelho, através de equações já programadas pelo fabricante no próprio instrumento.

Como não há valores referenciais para o percentual de gordura em pacientes com mucopolissacaridoses, esses valores serão descritivos e serão feitas considerações e análises de cunho nutricional para interpretação dos resultados. Quando não existem valores de referência para uma população específica, a comparação com padrões alheios impõe limitações que se prendem com diferenças relativas a fatores nutricionais e ambientais (17,18).

### **Análise estatística**

A análise estatística foi realizada através do Programa *Statistical Package for Social Sciences*, versão 18.0 (SPSS® Inc, Chicago, IL). As variáveis categóricas foram apresentadas

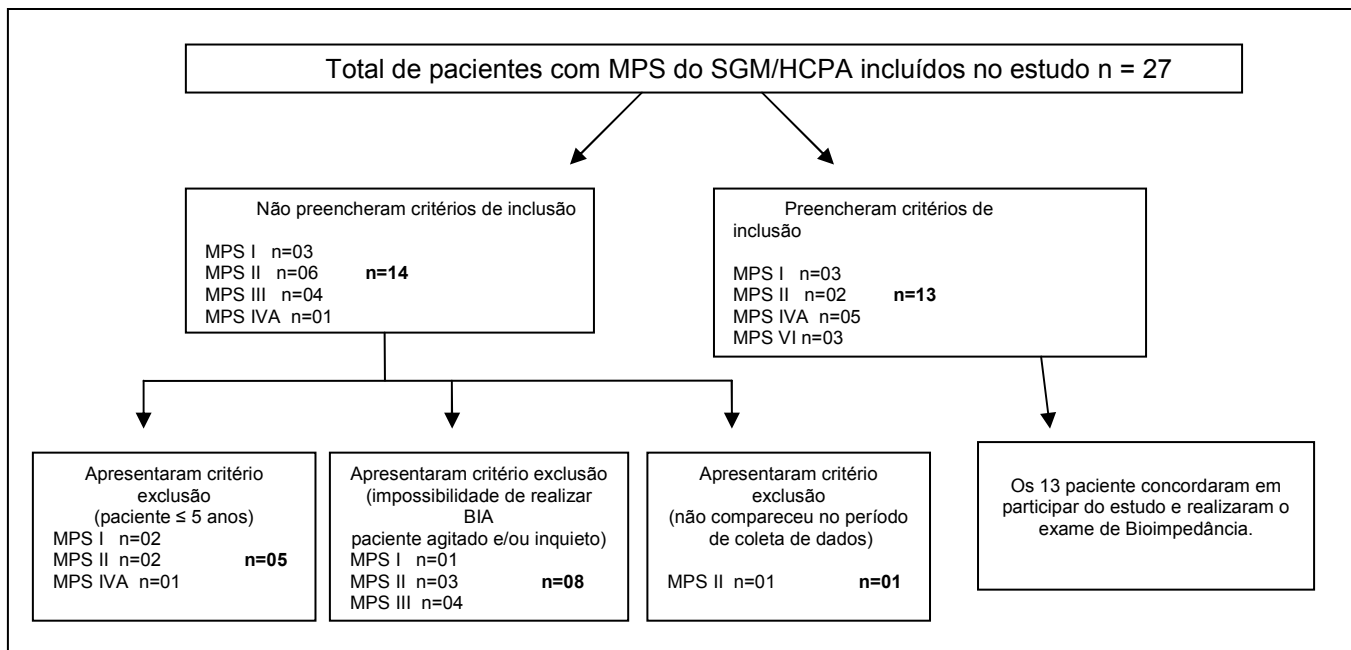


como frequências e percentuais e as variáveis contínuas como média  $\pm$  desvio padrão e mediana com intervalos interquartis. Testes não paramétricos foram aplicados para a comparação entre as variáveis (medianas). O Teste de *Mann-Whitney* foi utilizado para comprar os percentuais de massa magra e massa gorda em relação aos grupos com e sem Terapia de Reposição Enzimática.; e o Teste *Kruskal-Wallis* foi utilizado para comparar os percentuais de massa magra e massa gorda em relação ao estado nutricional dos pacientes. O nível de significância utilizado foi de 5%.

## Resultados

Dos vinte e sete pacientes com MPS em seguimento no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 13 foram incluídos durante o período de realização do estudo (**Figura 1**), sendo 7 (53, 8%) do sexo feminino e 6 (46,2%) do sexo masculino. A mediana (intervalo interquartil) de idade dos pacientes do sexo feminino e masculino foi de 22 (12 – 28) e 15 (10 -19) anos, respectivamente. A caracterização da amostra está descrita na

**Tabela 1.**



**Figura 1.** Algoritmo da seleção da amostra do presente estudo

**Tabela 1. Caracterização da amostra estudada (n=13)**

Variáveis	N=13
Idade (anos) – mediana (IQ)	18 (10 – 28)
M	15 (10 – 19)
F	22(12 – 28)
Sexo – n(%)	
M	6 (46,2)
F	7 (53,8)
Tipo MPS – n(%)	
I (Scheie)	3 (23,1)
II (não neuronopata)	2 (15,3)
IV (Tipo A)	5 (38,5)
VI	3 (23,1)
TRE – n(%)	
Sim	8 (61,5)
Não	5 (38,5)

\*Sexo: F:Feminino; M: Masculino; MPS: Mucopolissacaridose; TRE: Terapia de Reposição Enzimática

Os dados das variáveis coletados no presente estudo estão ilustrados na **Tabela 2**, em termos de média±DP, mediana e valor máximo e valor mínimo. As variáveis estudadas não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparadas entre o sexo masculino e feminino. Na amostra estudada, as meninas apresentaram %MG médio de 26,7 (14,9-34,7) e os meninos de 21,5 (12,6-28,5).

Em relação ao estado nutricional da amostra estudada, 38,4% (5/13) foram classificados como eutróficos, 30,8% (4/13) apresentaram sobrepeso e 30,8% (4/13) apresentaram obesidade. A classificação do estado nutricional e os valores de percentual de MM e MG nos diferentes tipos de MPS estão descritos na **Tabela 3**. Os percentuais de MM e MG segundo classificação do tipo de MPS foram analisados, no entanto, não houve diferença estatística entre os grupos. Observa-se que os pacientes com MPS I (Scheie) e MPS VI apresentaram a menor porcentagem de MG, com valores médios de 15,4 e 17,8, respectivamente. Os pacientes com MPS IVA apresentaram o maior percentual de MG (28,5%) em comparação com os demais tipos de MPS.

**Tabela 2.** Caracterização antropométrica e composição corporal, dividida por sexo, de pacientes com Mucopolissacaridoses

Variáveis	Media±DP		Mediana (Min-Max)		p
	Masc. n=6	Fem. n=7	Masc. n=6	Fem. n=7	
Idade (anos)	15±3,3	21±5,9	15 (10 – 19)	22 (12–28)	0,092
Peso (Kg)	36±12,7	35,5±19,6	33,8 (25 - 58)	31 (2–78)	0,775
Estatuta (cm)	119±18,4	123,9±23,6	113 (105 – 154)	116 (100 -157)	0,830
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	25,6±5,6	23,4±4,7	25,6 (17,8-31,8)	22,6 (18,1– 31,6)	0,475
%MM	78,2±6,3	72,2±11,7	78,4 (71,5-87,4)	68,1 (55,3-85,1)	0,313
%MG	21,7±6,3	25,2±8,7	21,5 (12,6-28,5)	26,7 (14,9-34,7)	0,474
%Água PCT	54,9±4,5	54,9±8,0	56,5 (49,4-60)	55,8 (47,1-70,5)	0,391
%Água MM	70,9±3,2	72,2±2,5	70,9 (66,3-74,2)	73,7 (68-74,1)	0,830

Masc.:Masculino; Fem.:Feminino; IMC:Índice de massa corporal; %MM: Percentual de massa magra; %MG: percentual de massa gorda; PCT: Peso corporal total; MM: Massa magra.

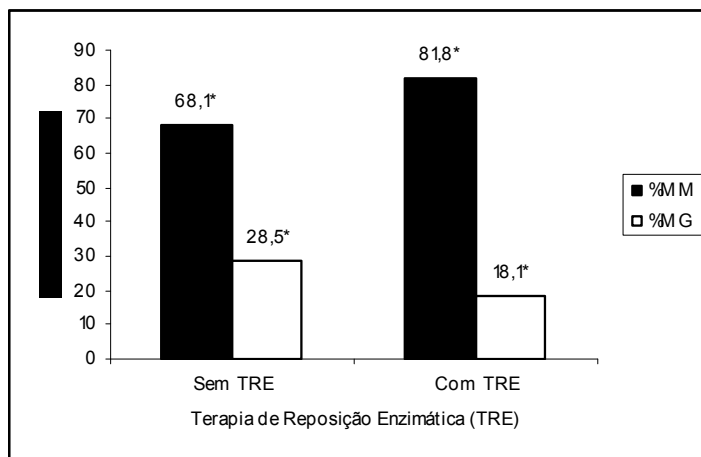
**Tabela 3.** Classificação do Estado Nutricional e Percentual de massa magra e massa gorda nos diferentes tipos de Mucopolissacaridoses

	MPS I (Scheie) (n=3)	MPS II (NN) (n=2)	MPS IV (Tipo A) (n=5)	MPS VI (n=3)	p
%MM	84,6 (66,3 – 85,1)	78,4 (76,4 – 80,5)	68,1 (55,3 – 71,5)	82,2 (81,5 – 87,4)	0,877
%MG	15,4 (14,9 – 33,7)	21,5 (19,5 – 23,6)	28,5 (26,7 – 34,7)	17,8 (12,6 – 18,5)	0,765
Eutrófico n (%)	2 (67)	1 (50)	1 (20)	1 (33,3)	-
Sobrepeso n (%)	-	1 (50)	2 (40)	1 (33,3)	-
Obesidade n (%)	1 (33)	-	2 (40)	1 (33,3)	-

Percentual de MM e MG expresso em Mediana (min-max); %MM: Percentual de massa magra; %MG: Percentual de massa gorda; MPS: Mucopolissacaridose; \*NN: não-neuronopata;

Ao analisarmos o percentual de MM e MG daqueles pacientes que recebiam TRE em relação àqueles pacientes que não foram submetidos a esse tratamento, observamos que os pacientes que estavam em TRE possuíam um percentual de MG estatisticamente menor em comparação ao grupo sem TRE ( $p=0,01$ ) (**Figura 2**). As medianas do %MG dos pacientes com e sem TRE foram 18,1 (12,6 – 33,7) e 28,5 (26,7 – 34,7), respectivamente.

Não houve diferença estatística entre os pacientes com e sem TRE em comparação a classificação do estado nutricional dos mesmos.



**Figura 2.** Percentual de massa magra e massa gorda em pacientes com Mucopolissacaridose com e sem tratamento de reposição enzimática (TRE); %MM: Percentual de massa magra; %MG: Percentual de massa gorda; \*Teste de Mann-Whitney,  $p < 0,05$ .

## Discussão

Este é o primeiro estudo realizado em pacientes brasileiros com Mucopolissacaridoses, para analisar e avaliar a composição corporal/estado nutricional. Os critérios de inclusão utilizados visaram a selecionar os pacientes mais colaborativos (por isso a adoção do ponto de corte de 10 anos para idade), uma vez que o uso da Bioimpedância Elétrica tem sido questionado na infância devido a fatores que se relacionam com a metodologia e exatidão dos resultados obtidos (17,19). Existem várias definições de infância. Neste trabalho considera-se que a infância é o período de vida compreendido entre o nascimento até a adolescência, período que se inicia aos 10 anos, segundo a Organização Mundial de Saúde.

A avaliação antropométrica é comumente usada para indicar adiposidade em estudos epidemiológicos, entretanto a BIA proporciona uma medida simples, precisa e rápida da composição corporal (20). Contudo, não existem na literatura, estudos relativos à avaliação nutricional da composição corporal em pacientes com Mucopolissacaridoses.

No presente estudo foi observado que 61,6% dos pacientes apresentavam excesso de peso (sobrepeso e obesidade). Como já era esperado, pacientes com excesso de peso possuíam maior percentual de MG e menor de MG do que pacientes eutróficos.

A literatura demonstra que devido às manifestações clínicas dos pacientes com MPS, é comum o aumento de alguns órgãos, como coração, fígado e baço em portadores de MPS (21-23). Assim sendo, uma hipótese levantada é que tal aspecto possa contribuir com o excesso de peso na população estudada. Além disso, o grave déficit de crescimento apresentado por esses indivíduos provavelmente colaborou para esse achado, sugerindo uma possível explicação para a elevada frequência de sobrepeso e obesidade desses indivíduos. É importante ressaltar que esse achado vai de encontro ao que hoje é visto no Brasil e em todo o mundo, o processo de transição nutricional, com aumento na incidência de sobrepeso e obesidade, o que reforça a hipótese da influência da doença de base sobre a depleção do estado nutricional (24).

Roberts e colaboradores (25) descreveram a morfologia gastrointestinal e suas funções em um modelo de camundongo com MPS IIIA. O peso do estômago e do duodeno aumentam em camundongos com MPS IIIA e o comprimento do duodeno também aumentou. O aumento da espessura da submucosa foi observado no intestino de camundongos com MPS IIIA comparados com camundongos normais e o acúmulo lissossomal de GAGs foi observado nessa região e em suas vilosidades. O autor sugeriu que as alterações observadas na estrutura do trato gastrointestinal em camundongos com MPS IIIA poderiam contribuir para o ganho de peso nessa condição.

Estudos apontam que pacientes com MPS apresentam alta prevalência de excesso de peso (26). Pinto e colaboradores (3) avaliaram prospectivamente, durante um período de 12 meses, sete pacientes brasileiros, portadores de MPS II provenientes do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, e encontraram resultados semelhantes ao

nosso. Após um ano de investigação, 100% dos pacientes foram classificados com excesso de peso ou obesidade.

Não houve diferença estatística no percentual de massa magra e massa gorda quando comparados aos diferentes tipos de MPS. Entretanto, observa-se que pacientes com MPS IVA apresentaram uma tendência maior no %MG em relação aos demais tipos de MPS estudadas. Uma possível explicação para esse achado seria que esses pacientes possuem deformidades ósseas graves que podem levar a maiores dificuldades em sua mobilidade articular e capacidade física, sugerindo uma maior tendência de acúmulo de gordura corporal nesses indivíduos.

Um achado importante do nosso estudo foi que pacientes que estavam em TRE apresentaram um percentual de MG estatisticamente menor em comparação ao grupo sem TRE, sugerindo um possível benefício do tratamento no acúmulo de gordura corporal.

O desenvolvimento de estratégias terapêuticas, como por exemplo, a TRE, tem mudado a história natural de muitos tipos de MPS. Embora esta terapia não forneça uma cura completa, a administração semanal intravenosa da enzima tem demonstrado benefícios mensuráveis e sustentáveis para os pacientes afetados (27,28). Esse tratamento pode prevenir complicações e/ou reduzir a progressão da doença e melhorar a qualidade de vida (8). Diante do observado nesse estudo, podemos levantar a hipótese que esse tratamento pode também auxiliar na redução do percentual de massa gorda em pacientes afetados. Essa possível relação pode estar associada a melhora da mobilidade articular e capacidade física e respiratória, já observada em estudos que incluíram o teste de caminhada de 6 minutos (8,29,30). Conduto, mais estudos devem ser realizados para comprovar esses achados.

Na amostra estudada, as meninas apresentaram %MG mediano de 26,7 (14,9 - 34,7) e os meninos de 21,5 (12,6 - 28,5). Segundo Lohman (31), a média de percentual de gordura em indivíduos saudáveis varia de 16 a 24 para meninos e 24 a 31 para meninas, indicando que

a nossa amostra estaria dentro da faixa da normalidade para essa variável. Levando em consideração que esses pacientes possuem manifestações clínicas graves, com decorrentes alterações morfométricas em seus órgãos vitais, se enquadrando assim em uma população específica, é duvidoso compará-los com uma população saudável.

Quando não existem valores de referência para uma população específica, a comparação com padrões universais impõe limitações, com diferenças relativas a fatores nutricionais e ambientais (17). Assim sendo, acreditamos ser de grande relevância um acompanhamento nutricional em pacientes com Mucopolissacaridoses visando adequação de parâmetros nutricionais, com produção de indicadores adequados e curvas de crescimento específicas para essa população, o que pode gerar uma repercussão positiva nos aspectos clínicos gerais desses indivíduos, como melhora da mobilidade articular, capacidade física, sintomas gastrointestinais dentre outros. Entretanto, mais estudos devem ser realizados para melhor compreender e avaliar o estado nutricional desses indivíduos. A ampliação do tamanho da amostra poderia gerar mais dados com significância estatística, reforçando a importância da Nutrição nos pacientes aferidos.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem toda equipe do Serviço de Genética Médica do HCPA, assim como Centro de Pesquisa Clínica do HCPA pelo apoio e colaboração sobre esse estudo. Este trabalho foi apoiado pelo FIPE / HCPA (projeto nº 12-0259).

## Referências

1. Neufeld EF, Muenzer J. The Mucopolysaccharidoses. In: Scriver, C.R.; Beaudet, A.L.; Sly, W.S.; Valle, D., ed. *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. New York: MacGraw-Hill, 2001; 3421-52.
2. Vieira TA, Schwartz IV, Munoz MV, Pinto LL, Steiner C, Ribeiro M, Boy R, Ferraz V, Kim C, Acosta A, Giugliani R. Mucopolysaccharidosis in Brazil: what happens from birth to biochemical diagnosis?. *American Journal of Medical Genetics* 2008; 146A:1741-1747.
3. Pinto, LL, Schwartz IVS, Puga AC, Vieira TA, Munoz MV, Giugliani R, et al. Prospective study of 11 Brazilian patients with mucopolysaccharidosis II. *J Pediatr (Rio J)* 2006; 82(4): 273-8.
4. Poorthuis BJ, Wevers RA, Kleijer WJ, Groener JE, Jong JG, Van Weely S, et al. The frequency of lysosomal storage in the Netherlands. *Hum Genet* 1999; 105 (1-2) 151-6.
5. Applegarth DA, Tonne JR, Lowry RB. Incidence of inborn errors of metabolism in British Columbia, 1969-1996. *Pediatrics* 2000; 105: 10-14.
6. Nelson J, Crowhurst J, Carey B, Greed L. Incidence of the mucopolysaccharidosis in Western Australia. *Am J Med Genet* 2003; 123A (3):310-3.
7. Giugliani R, Federhen A, Moñoz rojas V, Vieira T, Artigálas O, Pinto L, et al. Mucopolysaccharidosis I, II, and VI: Brief review and guidelines for treatment. *Genetics and Molecular Biology* 2010; 33(4):589-604.
8. Giugliani, R. Mucopolysaccharidoses: From understanding to treatment, a century of discoveries. *Genetics and Molecular Biology* 2012;35(4):924-31.
9. Muenzer J. The Mucopolysaccharidoses: A heterogeneous group of disorders with variable pediatric presentations. *J Pediatric* 2004; 144:S27-S34.
10. Bauer J, Capra S, Ferguson M. Use of the scored Patient-Generated Subjective Global Assessment (PG-SGA) as a nutrition assessment tool in patients with câncer. *Eur J Clin Nutr* 2002; 56:779-785.
11. Eickemberg M, Oliveira CC, Roriz AC, Sampaio LR. Bioimpedância elétrica e sua aplicação em avaliação nutricional. *Rev. Nutr* 2011; 24(6):883-893.
12. Gupta D, Lammersfeld CA, Burrows JL., Dahlk SL, Vashi PG, Grutch, JF, et al. Bioelectrical impedance phase angle in clinical practice: implications for prognosis in advanced colorectal cancer. *Am J Clin Nutr* 2004; 80(6)1634-8.



13. Sant'anna, M. Avaliação de gordura corporal pela bioimpedância elétrica e sua correlação com diferentes pontos anatômicos de medida da circunferência da cintura em crianças, *J. Pediatr. (Rio J)* 2009; 85(1):61-66.
14. Jelliffe DB. Evolución del estado de nutrición de la comunidad. Ginebra: OMS; 1968.
15. World Health Organization. Development of a WHO growth reference for school-age children and adolescents. Geneva. WHO, 2007.
16. World Health Organization. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Geneva. WHO, 1995.
17. Pinto E, Oliveira AN, Alencastre H, Lopes C. Avaliação da Composição Corporal na Criança por Métodos não Invasivos. *Arq Med* 2005; 19(1-2):47-54.
18. Safak SY, Turgut HB. Weight, Length, Head, and Face Measurements in Turkish Newborns of Central Anatolia. *Gazi Medical Journal* 1998; 9:116-20.
19. Gartner A. Reference BIA data in neonates and young infants. *Nutrition* 2003; 19:558-62.
20. Carraro JL, Schwartz R, Behling EB. Comparação do estado nutricional obtido através de antropometria e bioimpedância em crianças e adolescentes submetidos a um tratamento específico em um hospital no Sul do Brasil. *Rev HCPA* 2012;32:35-41.
21. Schwartz IVD, Ribeiro MG, Mota JG, Toralles MBP, Correia P, Horovitz D, et al. A clinical study of 77 patients with mucopolysaccharidosis type II. *Acta Paediatrica* 2007; 96:63-70.
22. Martins AM, Dualibi AP, Norato D, Takata ET, Santos ES, Valadares ER, et al. Guidelines for management of mucopolysaccharidosis type I. *The Journal of Pediatrics* 2009; 155(4): 31-45.
23. Ferreira ACG, Oliveira AC, Veiga LLP, Santana LD, Barbosa PB, Guedes ZF. Interferência da Disfagia Orofaringea no Consumo Alimentar de Indivíduos com Mucopolissacaridose II. *Rev. CEFAC* 2012;14(6):1184-1196.
24. Bradford NF. Overweight and Obesity in Children and Adolescents. *Primary Care: Clinics in Office Practice* 2009; 36: 319-39.
25. Roberts, ALK, Howard GS, Liam WC, Moretta S, Kritas S, Lymn KA, Yazbeck R, Tran C, Fletcher JM, Butler RN, Byers S. Gastrointestinal Pathology in a Mouse Model of Mucopolysaccharidosis Type IIIA. *Journal of Cellular Physiology* 2009; 219:259-264.
26. Regier DS, Oetgen M, Tanpaiboon P. Mucopolysaccharidosis Type IVA. In: Pagon RA, Adam MP, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, Stephens K, ed. *GeneReviews™* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2013., 2013 Jul 11.

27. Harmtz P, Giugliani R, Schwartz I, Guffon N, Teles E, Sá Miranda M, Wraith JE, Beck M, Arash L, Scarpa M, et al. Long-term follow-up of endurance and safety outcomes during enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis VI: Final results of three clinical studies of recombinant human N-acetylgalactosamine 4-sulfatase. *Mol Genet Metab* 2008;94:469-475.
28. Clarke LA, Wraith JE, Beck M, Kolodny EH, Pastores GM, Muenzer J, Rapoport DM, Berger KI, Sidman M, Kakki ED, et al. Long-term efficacy and safety of laronidase in the treatment of mucopolysaccharidosis I. *Pediatrics* 2009;123:229-240.
29. Barbier AJ, Bielefeld B, Whiteman DA, Natarajan M, Pano A, Amato DA. The relationship between anti-idursulfase antibody status and safety and efficacy outcomes in attenuated mucopolysaccharidosis II patients aged 5 years and older treated with intravenous idursulfase. *Mol Genet Metab* 2013; 110(3):303-10. doi: 10.1016/j.ymgme.2013.08.002.
30. Sohn YB, Cho SY, Park SW, Kim SJ, Ko AR, Kwon EK, Han SJ, Jin DK. Phase I/II clinical trial of enzyme replacement therapy with idursulfase beta in patients with mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome). *Orphanet J Rare Dis* 2013;18:8-42. doi: 10.1186/1750-1172-8-42.
31. Lohman TG, Roche AF, Martorell R. Anthropometric standardization reference manual. Champaign:Human Kinetics; 1992.

## 10. ARTIGO 2 EM INGLÊS

Artigo enviado para publicação no periódico American Journal of Clinical Nutrition.

### **Body Fat Assessment by Bioelectrical Impedance in Patients with Mucopolysaccharidosis**

Luciana Giugliani<sup>1</sup>, Carolina F. M. Souza<sup>2</sup>, Roberto Giugliani<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Graduate Program in Child and Adolescent Health, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

<sup>2</sup> Medical Genetics Service, HCPA, Porto Alegre, Brazil

<sup>3</sup> Department of Genetics, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

#### **Correspondence**

Roberto Giugliani  
Serviço de Genética Médica  
Hospital de Clínicas de Porto Alegre  
Rua Ramiro Barcelos 2350  
Porto Alegre, RS 90035-903  
Brazil

Tel + 55 51 3359-6338

Fax + 55 51 3359 8010

Email: [rgiugliani@hcpa.ufrgs.br](mailto:rgiugliani@hcpa.ufrgs.br)

## Abstract

**Background:** Mucopolysaccharidoses (MPS) are lysosomal disorders characterized by the deficiency in lysosomal enzymes in the degradation of glycosaminoglycans. Abnormal accumulation of this molecule compromises cellular and organic function, leading to a spectrum of clinical manifestations, both multisystem and progressive. Despite not being a disease for which a dietary treatment will modify the outcome, it is a condition in which patients benefit from nutritional monitoring. **Objective:** To evaluate the nutritional status of patients with MPS seen in a specialized outpatient, by means of body composition assessment by bioelectrical impedance (BIA). **Desing:** A cross-sectional study with a convenience sampling. Inclusion criteria were confirmed diagnosis of MPS, patient with  $\geq 10$  years of age and the presence of conditions appropriate for the performance for the exams. Subjects were evaluated by means of anthropometrics and body composition parameters provided by BIA. **Results:** thirteen patients were enrolled, seven (53.8%) females and six (46.2%) males, with a median age of 22 (12-28) and 15 (10-19) years, respectively. Regarding to nutritional status, five (38.4%) were eutrophic, four (30.8%) were overweight, and four (30.8%) were obese. There was no statistical difference in the percentage of fat-free-mass (FFM) and fat mass (FM) when compared to different types of MPS. However, it was noted that patients with MPS IVA presented with a greater tendency in %FM in relation to the other MPS types studied. Patients receiving enzyme replacement therapy (ERT) showed a %FM statistically lower compared to the group without ERT, suggesting a possible treatment effect on body fat accumulation. **Conclusion:** We believe is very relevant in nutritional monitoring management of patients with MPS, aiming to adapt the nutritional parameters. Additional studies with larger samples should be conducted in an attempt to confirm this hypothesis.

**Key words:** Lysosomal Disorders, Mucopolysaccharidoses, Bioelectrical Impedance, Body Fat, Enzyme Replacement Therapy

## Introduction

Mucopolysaccharidoses (MPS) are a group of Lysosomal Storage Disorders (LSDs) characterized by the intralysosomal accumulation of glycosaminoglycans (GAGs) secondary to the deficiency in activity of a lysosomal enzyme involved in the degradation of these molecules. The accumulation of non-degraded or partially degraded GAGs compromises cellular and organic function, leading to many clinical manifestations that are progressive and affect multiple organs and systems. These substrates are excreted in increased quantities in the urine (1,2).

MPS are classified in eleven conditions according to the enzyme deficiency involved. According to the deficient enzyme, MPS are classified as MPS I (Deficiency of  $\alpha$ -L-iduronidase); MPS II (Deficiency of Iduronate-2-sulfatase); MPS IIIA (Deficiency of Heparan N-sulfatase); MPS IIIB (Deficiency of  $\alpha$ -N-acetyl- glucosaminidase); MPS IIIC (Deficiency of Acetyl-CoA- $\alpha$ -glucosamine-acetyltransferase); MPS IIID (Deficiency of N-acetyl-glucosamine-6-sulfatase); MPS IVA (Deficiency of N-acetyl-galactosamine-6-sulfatase); MPS IVB (Deficiency of  $\beta$ -galactosidase); MPS VI (Deficiency of N-acetyl-galactosamine-4-sulfatase); MPS VII (Deficiency of  $\beta$ -glucuronidase); and MPS IX (Deficiency of Hyaluronidase) (3).

MPS are rare disorders, with an estimated incidence of 1.9 to 4.5:100,000 in liveborns (4-6), according to studies performed in various countries.

Clinical presentation of MPS is chronic and progressive. Clinical manifestations of these diseases include the presence of coarse face, joint contractures, hepatosplenomegaly, multiple dysostosis, hearing loss, corneal opacity, diarrhea, cardiomyopathy, chronic obstructive pulmonary disease, sleep apnea, growth deficit, and mental retardation (1).

MPS treatment may be specific or symptomatic. Specific treatment seeks to substitute the deficient enzyme, retarding progression of the disease, improving systemic abnormalities

and patient's quality of life. Among current and potential treatments are bone marrow/Hematopoietic Stem Cell Transplantation, enzyme replacement therapy (ERT), substrate reduction therapy, besides gene therapy, for which studies have shown promising results. ERT is already approved for MPS I, II, and VI. This treatment consists of periodic intravenous administration of the specific enzyme that is deficient in the patient. This treatment has been providing good results as to clinical aspects and quality of life (7,8). Symptomatic treatment is directed towards the management of complications of the disease and involves a multidisciplinary team, composed by pediatrician, neurologist, cardiologist, physiatrist, and pneumologist physicians, among others, as well as professionals in rehabilitation such as physical therapists, speech therapists, psychologists, dieticians, and dentists. These treatments aim to improve clinical symptoms and maintain existing functions. To provide counseling to patients and their family members is also important (9).

Nutrition plays an important role in the treatment of MPS. Despite not being a disease for which a dietary treatment modifies the outcome, nutritional monitoring of these patients is necessary, since isolated and nonsystematic observations indicate a greater propensity towards weight gain in proportion to stature (usually diminished), leading to the suggestion that the introduction of ERT may be related to weight changes in patients. An adequate nutritional status is important for the individual, not only for quality of life but also for his/her inter- and intra-personal relations. Even so, there are no studies in literature relative to the nutritional evaluation of body composition in patients with Mucopolysaccharidoses.

Body composition may be evaluated by simple methods such as anthropometry (weight and height), or by more sophisticated measurements such as bioelectrical impedance (BIA) (10).

Bioelectrical Impedance analysis is a tool increasingly used to evaluate nutritional status. This technique incorporates both functional and morphological evaluations, with a portable device developed over the last decades (11).

The use of BIA has demonstrated efficiency in the assessment of body compartments in various clinical situations such as malnutrition, trauma, pre- and postoperative periods, hepatic disease, renal insufficiency, gestation and etc. It could be used in children, and athletes, among others. Nevertheless, body composition should always be analyzed and interpreted according to the specific group (12).

BIA has proved to be a cheap, safe, and noninvasive method for evaluation of body composition in clinical practice, and has attracted attention over the last 20 years. BIA is a high precision test, which affords a direct measurement of body impedance through resistance, reactance, and phase angle of the patient. This evaluation estimates various parameters of body composition such as fat mass, fat free mass, intra- and extracellular mass, relation between intra- and extracellular mass, total body water, intra- and extracellular water, body mass index (BMI), and basal metabolic rate (BMR) (13).

The objective of the present study was to analyze the nutritional status of patients with mucopolysaccharidoses treated at the Medical Genetics Service of the *Hospital de Clínicas de Porto Alegre* by means of body composition evaluation using bioelectrical impedance.

## **Material and Methods**

The present study was approved by the Ethics in Research Committee of HCPA (No. 12-0259). All the patients and/or their guardians signed the Informed Consent Form (ICF).

This is a cross-sectional study involving a series of cases. Data collection occurred from August 2012 to May 2013.

### **Patients**

Were included in the study Mucopolysaccharidoses patients aged  $\geq 10$  years and who had adequate conditions to perform the test. The exclusion criteria were pregnant, use of pacemakers, age  $\leq 09$  years, patients in whom it was impossible to carry out the bioelectrical impedance test (restless and/or hyperactive patient), patient who did not come to the outpatient clinics during the period of data collection, as well as the non-agreement of the patient, parents, and/or legal representatives to participation in the study.

### **Anthropometrics**

Anthropometric data were collected at a single time during the study. Weight was obtained using Toledo® electronic digital scales, with 200Kg maximum capacity and 100g sensitivity. The patients were weighed wearing the least amount of clothing possible, with bare feet together at the center of the scales, standing straight up with arms extended along the body. Patient height was measured using a stadiometer fixed against the wall with 2 meters in length and a 0.1-cm grade. To check the height, patients were positioned with their backs to the stadiometer, with bare feet and no hair ornaments, with their feet together and arms extended along the body, standing straight and looking straight ahead. The techniques used to check height and weight are those recommended by Jelliffe (14).

To assess anthropometric data of patients under 19 years of age, WHO Anthro Plus® version 1.0.4 dated 2009 software was used, determining the percentiles for the BMI for age indicator (BMI/A); and for patients over 19 years of age, the BMI was calculated with the



body mass expressed in kilograms and the height in square meters. The values found for these data were classified according by WHO (2007) (15) and WHO (1995) (16), respectively.

These measurements were made at the Clinical Research Center of the *Hospital de Clínicas de Porto Alegre* (CPC/HCPA) by a single observer, in this case, the dietician who is the first author of the study.

### **Bioelectrical Impedance (BIA)**

To evaluate the body composition of the patients, the *Biodynamics* Model 450 Bioimpedance device was used. The precision is 0.1% in Resistance, 0.2% in Reactance, and 0.2% in phase angle. This equipment emits a subliminal low intensity electrical current (80 mA – 50 kHz), in accordance with the requirements of the *Association for Advancement of Medical Instrumentation* (ES-1988).

To have a good precision on the test, the patients were instructed to: 1. Avoid the ingestion of alcohol and caffeine (coffee, tea, chocolate) 24 hours before the test; 2. Not engage in intense physical activity for 24 hours before the test; 3. Fast for at least 4 hours before the test; 4. Remove metals (earrings, necklace, ring, bracelets, piercings, and adornments in general); 5. Suspend diuretic medication 24 hours before the test, except in the case of hypertensive individuals, who should be under rigorous medical control; 6. Void urine at least 30 minutes before doing the test.

The BIA was performed at the Clinical Research Center of the *Hospital de Clínicas de Porto Alegre* by the author of the project. The measurements for this test were checked only once with the patient lying down, in dorsal decubitus, in a comfortable and relaxed position. The arms were distanced from the trunk at a 30° angle, and the legs were distanced from each other forming an angle of approximately 45°, as per instructions of the manufacturer. According to the international description of the technique, the four electrodes were

positioned on the disinfected and dry skin, in previously standardized locations: **Right foot:** The distal electrode at the base of the middle toe and the proximal electrode slightly above the joint line of the ankle, between the medial and lateral malleoli. **Right hand:** The distal electrode at the base of the middle finger and the proximal electrode slightly above the joint line at the wrist, coinciding with the styloid process. Next, the test was performed, and the device provided the percentage of fat directly.

This method is based on the conduction of a low intensity electrical current through the body. Impedance or resistance to flow of the electrical current is measured by the electrical bioimpedance. Since impedance varies according to the tissue being measured, and since lean mass is a good energy conductor (low resistance to current) as it has a high concentration of water and electrolytes, and fat mass is a poor energy conductor (high resistance to current), we may state that impedance is directly proportional to the amount of body fat.

The percentage of FM was used as parameter furnished by the equipment, by means of equations pre programmed in the instrument by the manufacturer.

Since there are no reference values for the percentage of fat in patients with mucopolysaccharidoses, these values are descriptive and final considerations and nutritional analyses will be made to interpret the results. When there are no reference values for a specific population, the comparison with other standards imposes limitations that hinge on relative differences and nutritional and environmental factors (17,18).

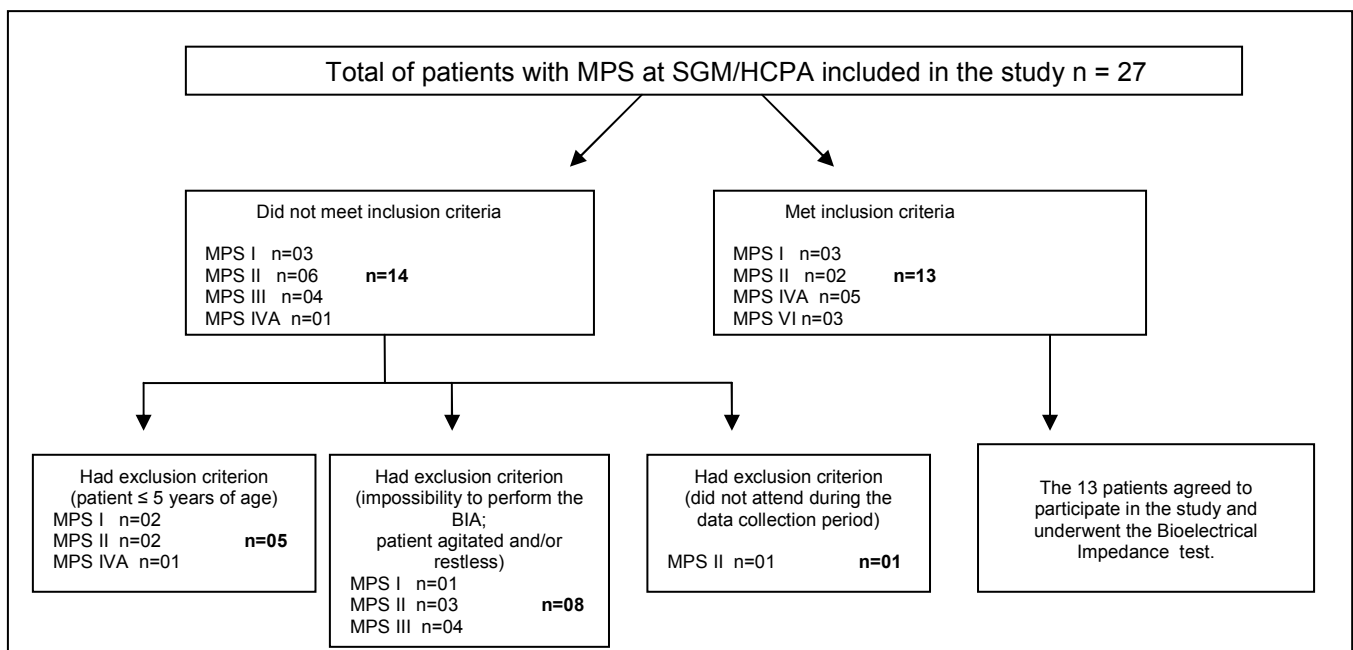
### **Statistical analysis**

Statistical analysis was made using the Statistical Package for Social Sciences program, version 18.0 (SPSS® Inc., Chicago, IL). Categorical variables were presented as frequencies and continuous variables as mean  $\pm$  standard deviation and median with

interquartile intervals. Non-parametric tests were applied for comparisons among the variables (medians). The Mann-Whitney test was used to compare the percentages of lean mass and fat mass relative to the groups with and without Enzyme Replacement Therapy, and the Kruskal-Wallis test was used to compare percentages of lean mass and fat mass relative to the nutritional status of the patients. The level of significance used was 5%.

## Results

Of the twenty-seven patients with MPS in follow-up at the Medical Genetics Service of the *Hospital de Clínicas de Porto Alegre*, 13 were included during the period of the study (**Figure 1**), seven (53.8%) females and six (46.2%) males. The median (interquartile interval) age of the female and male patients was 22 (12 – 28) and 15 (10 -19) years, respectively. Sample characterization is described on **Table 1**.



**Figure 1** Algorithm for sample selection in this study.

**Table 1. Characterization of the sample studied (n=13)**

Variables	N=13
Age (years) – median (IQ)	18 (10 – 28)
M	15 (10 – 19)
F	22 (12 – 28)
Gender – n (%)	
M	6 (46.2)
F	7 (53.8)
Type of MPS – n (%)	
I (Scheie)	3 (23.1)
II (non-neuronopathic)	2 (15.3)
IV (Type A)	5 (38.5)
VI	3 (23.1)
ERT – n (%)	
Yes	8 (61.5)
No	5 (38.5)

\*Gender: F: Female; M: Male; MPS: Mucopolysaccharidosis; ERT: Enzyme Replacement Therapy

The data of the variables collected in the present study are illustrated on **Table 2**, in terms of mean  $\pm$ SD, median, and maximum value and minimum value. The variables studied did not show statistically significant differences when compared between the male and female genders. In the sample studied, the girls demonstrated a mean % FM of 26.7 (14.9-34.7) and the boys of 21.5 (12.6-28.5).

Regarding to the nutritional status of the sample studied, 38.4% (5/13) were classified as eutrophic, 30.8% (4/13) were overweight, and 30.8% (4/13) were obese. The classification of the nutritional status and the percentage values of FFM and FM for the different types of MPS are described on **Table 3**. The percentages of FFM and FM as per classification of the type of MPS were analyzed, but there was no statistical difference between the groups. It was noted that patients with MPS I (Scheie) and MPS VI presented the lowest percentage of FM, with mean values of 15.4 and 17.8, respectively. Patients with MPS IVA had the highest percentage of FM (28.5%) in comparison with the other types of MPS.

**Table 2.** Anthropometric characterization and body composition, divided by gender, of patients with Mucopolysaccharidoses

Variables	Mean±SD		Median (Min-Max)		p
	Male n=6	Female n=7	Male n=6	Female n=7	
Age (years)	15±3.3	21±5.9	15 (10 – 19)	22 (12–28)	0.092
Weight (Kg)	36±12.7	35.5±19.6	33.8 (25 - 58)	31 (2–78)	0.775
Height (cm)	119±18.4	123.9±23.6	113 (105 – 154)	116 (100 -157)	0.830
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	25.6±5.6	23.4±4.7	25.6 (17.8-31.8)	22.6 (18.1– 31.6)	0.475
%FFM	78.2±6.3	72.2±11.7	78.4 (71.5-87.4)	68.1 (55.3-85.1)	0.313
%FM	21.7±6.3	25.2±8.7	21.5 (12.6-28.5)	26.7 (14.9-34.7)	0.474
%Water TBW	54.9±4.5	54.9±8.0	56.5 (49.4-60)	55.8 (47.1-70.5)	0.391
%Water LM	70.9±3.2	72.2±2.5	70.9 (66.3-74.2)	73.7 (68-74.1)	0.830

Masc.: Male; Fem.: Female; BMI: Body mass index; %FFM: Percentage of fat freemass; %FM: Percentage of fat mass; TBW: total body weight; FFM: Fat free mass.

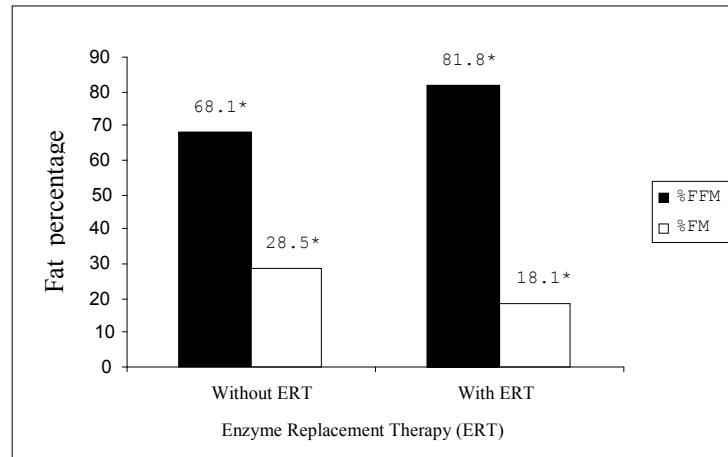
**Table 3.** Classification of the Nutritional Status and Percentage of fat free mass and fat mass in the different types of Mucopolysaccharidosis

	MPS I (Scheie) (n=3)	MPS II (NN*) (n=2)	MPS IV (Type A) (n=5)	MPS VI (n=3)	p
%FFM	84.6 (66.3 – 85.1)	78.4 (76.4 – 80.5)	68.1 (55.3 – 71.5)	82.2 (81.5 – 87.4)	0.877
%FM	15.4 (14.9 – 33.7)	21.5 (19.5 – 23.6)	28.5 (26.7 – 34.7)	17.8 (12.6 – 18.5)	0.765
Eutrophic n (%)	2 (67)	1 (50)	1 (20)	1 (33.3)	-
Overweight n (%)	-	1 (50)	2 (40)	1 (33.3)	-
Obese n (%)	1 (33)	-	2 (40)	1 (33.3)	-

Percentage of LM and FM expressed in Median (min-max); %FFM: Percentage of fat free mass; %FM: Percentage of fat mass; MPS: Mucopolysaccharidosis; \*NN: non-neuronopathic;

When analyzing the percentage of FFM and FM of those patients who received ERT relative to those who were not submitted to this treatment, we observed that the patients under ERT had a statistically lower percentage of FM in comparison with the group without ERT ( $p=0.01$ ) (**Figure 2**). The medians of %FM of patients with and without ERT were 18.1 (12.6 – 33.7) and 28.5 (26.7 – 34.7), respectively.

There was no statistical difference between the patients with and without ERT in comparison to the classification of their nutritional status.



**Figure 2.** Percentage of fat free mass and fat mass in patients with Mucopolysaccharidosis with and without enzyme replacement treatment (ERT); %FFM: Percentage of Fat free mass; %FM: Percentage of fat mass; \*Mann-Whitney Test,  $p < 0.05$ .

## Discussion

This is the first study performed in Brazilian patients with Mucopolysaccharidosis to analyze and evaluate the body composition/nutritional status. The inclusion criteria used sought to select the most collaborative patients (thus, the adoption of the cut-off point at 10 years for age), since the use of Bioelectrical Impedance in infancy has been questioned due to factors related to methodology and accuracy of the results obtained (17,19). There are various definitions of childhood. In this study, childhood is considered the period of life between birth and adolescence, which begins at age 10 according the World Health Organization.

The anthropometric evaluation is commonly used to indicate adiposity in epidemiological studies, but BIA provides a simple, precise, and quick measurement of body composition (20). However, there are no studies in literature relative to the nutritional evaluation of body composition in patients with Mucopolysaccharidoses.

In the present study, it was noted that 61.6% of the patients presented with excess weight (overweight and obese). As was expected, patients with excess weight had a higher percentage of FM and a lower percentage of FFM than eutrophic patients.

Literature shows that, due to clinical manifestations of patients with MPS, an increase of some organs such as the heart, liver, and spleen is common in affected individuals (21-23). Therefore, one hypothesis raised is that this aspect might contribute to the excess weight in the population studied. Additionally, the serious growth deficit shown by these individuals probably collaborated for this finding, suggesting a possible explanation for the high frequency of overweight and obesity of these individuals. It is important to point out that this finding is in accordance with what is seen today in Brazil and worldwide, the process of nutritional transition, with an increase in the incidence of overweight and obese individuals, which reinforces the hypothesis of the influence of the underlying disorder on the depletion of the nutritional status (24).

Roberts et al. (25) described gastrointestinal morphology and its functions in a mouse model with MPS IIIA. Stomach and duodenum weight increased in MPS IIIA mice and duodenum length also increased. An increased submucosal thickness was observed in MPS IIIA intestine compared to normal mice and lysosomal storage of GAGs was observed in this region in its villus. The author suggested that these abnormalities in gastrointestinal tract structure and function observed in MPS IIIA could contribute to weight gain in this disorder.

Studies indicate that patients with MPS have a high prevalence of excess weight (26). Pinto et al. (3) prospectively evaluated, during a 12-month period, seven Brazilian patients with MPS II from the Medical Genetics Service of the *Hospital de Clínicas de Porto Alegre*, and found results similar to ours. After one year of investigation, 100% of the patients were classified as being overweight or obese.

There was no statistical difference in the percentage of fat free mass and fat mass when compared to the different types of MPS. However, it was noted that patients with MPS IVA presented with a greater tendency for %FM relative to the other types of MPS studied. One possible explanation for this finding would be that these patients have severe bone

deformities that can lead to greater difficulties in joint mobility and physical capacity, suggesting a greater tendency of these individuals to accumulate fat.

One important finding in our study was that patients who were on ERT had a statistically lower percentage of FM in comparison with the group without ERT, suggesting a possible benefit of the treatment in the accumulation of body fat.

The development of therapeutic strategies, such as ERT, has changed the natural history of many types of MPS. Although this therapy does not provide cure, weekly intravenous administration of the enzyme has shown measurable and sustainable benefits for affected patients (27,28). This treatment can prevent complications and/or reduce disease progression and improve quality of life (8). According to what was observed in this study, we can raise the hypothesis that this treatment may also help in reducing the percentage of fat mass in patients with MPS. This possible relationship may be associated with improvement of joint mobility and physical and respiratory capacity, which has been observed in studies that included the 6-minute walk test (8,29,30). However, more studies should be conducted to confirm these findings.

In the sample studied, the girls presented with a median %FM of 26.7 (14.9 – 34.7) and the boys of 21.5 (12.6 – 28.5). According to Lohman (31), the mean percentage of fat mass in healthy individuals varies from 16 to 24 for boys and from 24 to 31 for girls, indicating that our sample would be within the range of normality for this variable. Considering that these patients have severe clinical manifestations, with resulting morphometric alterations in their vital organs, thus being included in a specific population, it is questionable to compare them with a healthy population.

When there are no reference values for a specific population, the comparison with universal standards imposes limitations, with differences relative to nutritional and environmental factors (17). Therefore, we believe a nutritional monitoring of patients with



Mucopolysaccharidoses is of great relevance, aiming to adapt the nutritional parameters and a production of appropriate indicators and growth charts specific for this population, which can generate a positive repercussion in the general clinical aspects of these individuals, such as improved joint mobility, physical capacity, and gastrointestinal symptoms, among others. Nevertheless, more studies should be performed to better understand and evaluate the nutritional status of these individuals. Enlargement of the sample size could generate more data and reach statistical significance, reinforcing the importance of Nutrition in the patients affected by MPS.

### **Acknowledgments**

The authors thank all the team at the Medical Genetics Service of HCPA, as well as the Clinical Research Center of HCPA for the support and collaboration in this study. This project was supported by FIPE / HCPA (project No. 12-0259).

### **References**

1. Neufeld EF, Muenzer J. The Mucopolysaccharidoses. In: Scriver, C.R.; Beaudet, A.L.; Sly, W.S.; Valle, D., ed. *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. New York: MacGraw-Hill, 2001; 3421-52.
2. Vieira TA, Schwartz IV, Munoz MV, Pinto LL, Steiner C, Ribeiro M, Boy R, Ferraz V, Kim C, Acosta A, Giugliani R. Mucopolysaccharidosis in Brazil: what happens from birth to biochemical diagnosis?. *American Journal of Medical Genetics* 2008; 146A:1741-1747.
3. Pinto, LL, Schwartz IVS, Puga AC, Vieira TA, Munoz MV, Giugliani R, et al. Prospective study of 11 Brazilian patients with mucopolysaccharidosis II. *J Pediatr (Rio J)* 2006; 82(4): 273-8.

4. Poorthuis BJ, Wevers RA, Kleijer WJ, Groener JE, Jong JG, Van Weely S, et al. The frequency of lysosomal storage in the Netherlands. *Hum Genet* 1999; 105 (1-2) 151-6.
5. Applegarth DA, Tonne JR, Lowry RB. Incidence of inborn errors of metabolism in British Columbia, 1969-1996. *Pediatrics* 2000; 105: 10-14.
6. Nelson J, Crowhurst J, Carey B, Greed L. Incidence of the mucopolysaccharidosis in Western Australia. *Am J Med Genet* 2003; 123A (3):310-3.
7. Giugliani R, Federhen A, Moñoz rojas V, Vieira T, Artigálas O, Pinto L, et al. Mucopolysaccharidosis I, II, and VI: Brief review and guidelines for treatment. *Genetics and Molecular Biology* 2010; 33(4):589–604.
8. Giugliani, R. Mucopolysaccharidoses: From understanding to treatment, a century of discoveries. *Genetics and Molecular Biology* 2012;35(4):924-31.
9. Muenzer J. The Mucopolysaccharidoses: A heterogeneous group of disorders with variable pediatric presentations. *J Pediatric* 2004; 144:S27-S34.
10. Bauer J, Capra S, Ferguson M. Use of the scored Patient-Generated Subjective Global Assessment (PG-SGA) as a nutrition assessment tool in patients with câncer. *Eur J Clin Nutr* 2002; 56:779-785.
11. Eickemberg M, Oliveira CC, Roriz AC, Sampaio LR. Bioimpedância elétrica e sua aplicação em avaliação nutricional. *Rev. Nutr* 2011; 24(6):883-893.
12. Gupta D, Lammersfeld CA, Burrows JL., Dahlk SL, Vashi PG, Grutch, JF, et al. Bioelectrical impedance phase angle in clinical practice: implications for prognosis in advanced colorectal cancer. *Am J Clin Nutr* 2004; 80(6):1634-8.
13. Sant'anna, M. Avaliação de gordura corporal pela bioimpedância elétrica e sua correlação com diferentes pontos anatômicos de medida da circunferência da cintura em crianças, *J. Pediatr. (Rio J)* 2009; 85(1):61-66.
14. Jelliffe DB. *Evolución del estado de nutrición de la comunidad*. Ginebra: OMS; 1968.
15. World Health Organization. *Development of a WHO growth reference for school-age children and adolescents*. Geneva. WHO, 2007.
16. World Health Organization. *Physical status: the use and interpretation of anthropometry*. Geneva. WHO, 1995.
17. Pinto E, Oliveira AN, Alencastre H, Lopes C. Avaliação da Composição Corporal na Criança por Métodos não Invasivos. *Ard Med* 2005; 19(1-2):47-54.
18. Safak SY, Turgut HB. Weight, Length, Head, and Face Measurements in Turkish Newborns of Central Anatolia. *Gazi Medical Journal* 1998; 9:116-20.

19. Gartner A. Reference BIA data in neonates and young infants. *Nutrition* 2003; 19:558-62.
20. Carraro JL, Schwartz R, Behling EB. Comparação do estado nutricional obtido através de antropometria e bioimpedância em crianças e adolescentes submetidos a um tratamento específico em um hospital no Sul do Brasil. *Rev HCPA* 2012;32:35-41.
21. Schwartz IVD, Ribeiro MG, Mota JG, Toralles MBP, Correia P, Horovitz D, et al. A clinical study of 77 patients with mucopolysaccharidosis type II. *Acta Paediatrica* 2007; 96:63-70.
22. Martins AM, Dualibi AP, Norato D, Takata ET, Santos ES, Valadares ER, et al. Guidelines for management of mucopolysaccharidosis type I. *The Journal of Pediatrics* 2009; 155(4): 31-45.
23. Ferreira ACG, Oliveira AC, Veiga LLP, Santana LD, Barbosa PB, Guedes ZF. Interferência da Disfagia Orofaríngea no Consumo Alimentar de Indivíduos com Mucopolissacaridose II. *Rev. CEFAC* 2012;14(6):1184-1196.
24. Bradford NF. Overweight and Obesity in Children and Adolescents. *Primary Care: Clinics in Office Practice* 2009; 36: 319-39.
25. Roberts, ALK, Howard GS, Liam WC, Moretta S, Kritas S, Lymn KA, Yazbeck R, Tran C, Fletcher JM, Butler RN, Byers S. Gastrointestinal Pathology in a Mouse Model of Mucopolysaccharidosis Type IIIA. *Journal of Cellular Physiology* 2009; 219:259-264.
26. Regier DS, Oetgen M, Tanpaiboon P. Mucopolysaccharidosis Type IVA. In: Pagon RA, Adam MP, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, Stephens K, ed. *GeneReviews™* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2013., 2013 Jul 11.
27. Harmtz P, Giugliani R, Schwartz I, Guffon N, Teles E, Sá Miranda M, Wraith JE, Beck M, Arash L, Scarpa M, et al. Long-term follow-up of endurance and safety outcomes during enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis VI: Final results of three clinical studies of recombinant human N-acetylgalactosamine 4-sulfatase. *Mol Genet Metab* 2008;94:469-475.
28. Clarke LA, Wraith JE, Beck M, Kolodny EH, Pastores GM, Muenzer J, Rapoport DM, Berger KI, Sidman M, Kakki ED, et al. Long-term efficacy and safety of laronidase in the treatment of mucopolysaccharidosis I. *Pediatrics* 2009;123:229-240.
29. Barbier AJ, Bielefeld B, Whiteman DA, Natarajan M, Pano A, Amato DA. The relationship between anti-idursulfase antibody status and safety and efficacy outcomes in attenuated mucopolysaccharidosis II patients aged 5 years and older treated with intravenous idursulfase. *Mol Genet Metab* 2013; 110(3):303-10. doi: 10.1016/j.ymgme.2013.08.002.

30. Sohn YB, Cho SY, Park SW, Kim SJ, Ko AR, Kwon EK, Han SJ, Jin DK. Phase I/II clinical trial of enzyme replacement therapy with idursulfase beta in patients with mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome). *Orphanet J Rare Dis* 2013;18:8-42. doi: 10.1186/1750-1172-8-42.
31. Lohman TG, Roche AF, Martorell R. Anthropometric standardization reference manual. Champaign:Human Kinetics; 1992.

## 11. CONCLUSÕES

**Objetivo Específico 1 - Identificar os sintomas gastrointestinais mais prevalentes em pacientes com MPS.**

1) Esse foi o primeiro estudo realizado para avaliar as manifestações gastrointestinais em pacientes brasileiros com diferentes tipos de MPS. Os sinais e sintomas gastrointestinais mais prevalentes apresentados pela amostra estudada de pacientes com MPS foram flatulência, distensão e dor abdominal e fezes amolecidas.

**Objetivo Específico 2 - Identificar se há diferenças nos sintomas gastrointestinais nos diferentes tipos de MPS.**

- 1) Houve uma diferença estatisticamente significativa para o sintoma flatulência entre os diferentes tipos de MPS. Os pacientes com MPS VI apresentaram nesse evento menor prevalência do que os demais tipos de MPS.
- 2) Os demais sintomas gastrointestinais não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando os diferentes tipos de MPS foram comparados entre si.
- 3) Quando agrupamos os sintomas mais frequentes, definidos como flatulência, dor abdominal, distensão abdominal e fezes amolecidas, houve uma diferença estatisticamente significativa em relação a esses sintomas quando comparados aos diferentes tipos de MPS, com prevalência menor na MPS VI. Ou seja, esses sintomas foram prevalentes em toda a amostra estudada. Entretanto, os pacientes com MPS VI apresentaram menos sintomas quando comparados com os demais tipos de MPS envolvidas no estudo.

**Objetivo Específico 3 - Identificar se há diferenças nos sintomas gastrointestinais de pacientes que receberam Terapia de Reposição Enzimática em relação àqueles que não foram submetidos a esse tratamento.**

- 1) A prevalência de flatulência e distensão abdominal foi significativamente maior no grupo dos que não recebiam tratamento de reposição enzimática (TRE), em comparação ao grupo dos que recebiam TRE, indicando um possível benefício do tratamento para esses tipos de sintomatologia.
- 2) Embora não havendo uma diferença significativa, observa-se que os pacientes que possuíam os quatro sintomas mais frequentes simultaneamente (flatulência, dor abdominal, distensão abdominal e fezes amolecidas) estavam em maior proporção no grupo sem TRE. Enquanto que no grupo com TRE a prevalência foi de 16,7% (2/12), no grupo sem TRE essa proporção sobiu para 53% (8/15), indicando um possível benefício do tratamento para esses tipos de sintomatologia.

**Objetivo Específico 4 - Correlacionar valores de GAGs urinários e sintomas gastrointestinais em pacientes com MPS.**

- 1) Pacientes com valores de GAGs urinários normais conforme suas faixas etárias apresentaram significativamente menor proporção de fezes amolecidas quando comparados com o grupo de pacientes com valores de GAGs alterados ( $p=0,016$ ).
- 2) Quando avaliados os quatro sintomas mais frequentes simultaneamente, observa-se que nenhum paciente com valores de GAGs urinários dentro da faixa da normalidade possuía esses sintomas, ao passo que 45,5% do grupo com valores de GAGs alterados

apresentaram a combinação desses quatro sintomas ( $p=0,04$ ). Isso é condizente com o número de sintomas, visto que o grupo com valores de GAG normal apresenta um número bem inferior de sintomas (mediana = 1) do que o grupo com valores de GAG alterado (mediana = 4).

- 3) Observou-se que aqueles pacientes que possuíam valores urinários alterados e que não estavam em TRE apresentaram uma proporção maior de sintomas gastrointestinais em comparação àqueles que também possuíam valores de GAGs urinários alterados e que estavam em TRE. Isso está em conformidade com a literatura, uma vez que um dos benefícios da TRE intravenosa é a redução de GAGs nos pacientes. Assim sendo, essa redução de GAGs consequentemente poderia minimizar o aparecimento de sintomas gastrointestinais em pacientes com MPS.

**Objetivo Específico 5 - Avaliar a persistência da enzima lactase por meio do teste molecular para hipolactasia primária, e correlacionar à presença do polimorfismo *LCT-13910C>T* com as manifestações gastrointestinais nesses pacientes.**

- 1) O estudo demonstrou que 58,8% (10/17) dos pacientes apresentaram genótipo CC (compatível com intolerância à lactose), estando em conformidade com os achados epidemiológicos populacionais já descrito na literatura.
- 2) Houve uma diferença estatisticamente significativa da prevalência dos sintomas gastrointestinais distensão abdominal, dor abdominal e fezes amolecidas entre o grupo de pacientes com genótipo CC (compatível com intolerância a lactose) em relação aqueles com genótipo CT ou TT (não compatível com intolerância a lactose).
- 3) Ao agruparmos os quatro sintomas mais prevalentes do estudo simultaneamente (flatulência, dor abdominal, distensão abdominal e fezes amolecidas), houve uma

diferença significativamente maior desses sintomas nos pacientes com genótipo CC em comparação aos pacientes com genótipo CT/TT ( $p= 0,03$ ).

**Objetivo Específico 6 - Comparar a histologia da mucosa intestinal em camundongos com e sem MPS.**

- 1) Essa foi caracterizada por um acúmulo intracelular na lamina própria das vilosidades das regiões do intestino delgado, o qual não foi evidenciado em amostras normais. Além disso, foi verificada uma redução no número de células caliciformes nos vilos no camundongo com MPS em comparação ao normal.
- 2) As alturas das células epiteliais em camundongos MPS I foram significativamente maiores que as dos camundongos normais
- 3) Através da análise da histologia do intestino delgado do camundongo com MPS I identificamos células aumentadas de volume, sugerindo algum tipo de acúmulo intracelular.

**Objetivo Específico 7 - Avaliar o estado nutricional dos pacientes por meio da avaliação de parâmetros antropométricos, composição corporal e de parâmetros bioquímicos.**

- 1) No presente estudo observou-se que, apesar da sintomatologia frequente de manifestações gastrointestinais, os pacientes não apresentaram alterações significativas em relação ao estado nutricional (avaliado através da hemoglobina, hematócrito, VCM, albumina, ferritina, dentre outros). Isso demonstra que os pacientes apresentaram alterações funcionais que não comprometem seu estado nutricional.



- 2) A maioria dos exames bioquímicos realizados nos nossos pacientes para investigação e/ou exclusão de alguma patologia específica apresentaram resultados normais, sugerindo que o aparecimento de sintomas gastrointestinais nesses pacientes possa ser decorrente da própria MPS através de outro mecanismo fisiopatológico.
- 3) Treze pacientes realizaram a Bioimpedância Elétrica ao longo do período do estudo. Este é o primeiro estudo realizado em pacientes brasileiros com Mucopolissacaridoses, para analisar e avaliar a composição corporal/estado nutricional.
- 4) Em relação ao estado nutricional da amostra estudada, 38,4% (5/13) foram classificados como eutróficos, 30,8% (4/13) apresentaram sobrepeso e 30,8% (4/13) apresentaram obesidade. Assim sendo, observa-se que 61,6% dos pacientes apresentavam excesso de peso (sobrepeso e obesidade). Como já era esperado, pacientes com excesso de peso possuíam maior percentual de MG e menor de MG do que pacientes eutróficos.
- 5) Não houve diferença estatística no percentual de massa magra e massa gorda quando comparados aos diferentes tipos de MPS. Entretanto, observa-se que pacientes com MPS IVA apresentaram uma tendência maior no %MG em relação aos demais tipos de MPS estudadas. Uma possível explicação para esse achado seria que esses pacientes possuem deformidades ósseas graves que podem levar a maiores dificuldades em sua mobilidade articular e capacidade física, sugerindo uma maior tendência de acúmulo de gordura corporal nesses indivíduos.
- 6) Um achado importante do nosso estudo foi que pacientes que estavam em TRE apresentaram um percentual de MG estatisticamente menor em comparação ao grupo sem TRE, sugerindo um possível benefício do tratamento no acúmulo de gordura corporal.

## 12. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Manifestações gastrointestinais já foram evidenciadas em outras doenças de depósito lisossômico, mas elas são frequentemente ofuscadas pelos fenótipos neurológicos graves. Acreditamos sejam necessários mais estudos dirigidos para as manifestações gastrointestinais, para melhor compreender os mecanismos fisiopatológicos dos sintomas relacionados nos pacientes afetados. Acreditamos na necessidade de padronizar uma avaliação específica para o monitoramento de sintomas gastrointestinais em pacientes com MPS, o que, certamente, contribuirá para uma melhora significativa da qualidade de vida desses pacientes e seus familiares.

Além disso, acreditamos ser de grande relevância um acompanhamento nutricional em pacientes com Mucopolissacaridoses visando adequação de parâmetros nutricionais, com produção de indicadores adequados e curvas de crescimento específicas para essa população, o que pode gerar uma repercussão positiva nos aspectos clínicos gerais desses indivíduos, como melhora da mobilidade articular, capacidade física, sintomas gastrointestinais dentre outros. Estudos adicionais com amostras maiores poderiam gerar mais dados com significância estatística, reforçando a importância da nutrição nos pacientes afetados.

A partir dessa tese de doutorado, os autores desse trabalho já estão desenvolvendo um novo projeto para desenvolver uma avaliação nutricional adequada, assim como curvas de crescimento específicas para pacientes com MPS.

## APÊNDICES

## **APÊNDICE I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Projeto: **ESTUDO SOBRE AS MANIFESTAÇÕES GASTROINTESTINAIS EM PACIENTES COM MUCOPOLISSACARIDOSES**

Pesquisador responsável: **Dr. Roberto Giugliani, Centro de Pesquisa Clínica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.** Rua Ramiro Barcelos, 2350. Porto Alegre-RS. Tel: 51-33596338.

Prezado paciente (ou responsável legal),

Como você sabe, as Mucopolissacaridoses (MPS) são doenças genéticas caracterizadas pelo acúmulo de glicosaminoglicanos (GAGs) dentro do lisossomos, devido a uma deficiência na atividade de uma enzima. O acúmulo dos GAGs ocorre em inúmeras partes do corpo, levando a um grande número de manifestações clínicas, as quais são progressivas e afetam vários órgãos.

Manifestações gastrointestinais, tais como episódios recorrentes de fezes amolecidas e diarreia, têm sido frequentemente evidenciado em pacientes com MPS. Entretanto, suas causas ainda são desconhecidas. Embora os sintomas gastrointestinais sejam frequentemente mascarados pelos problemas neurológicos graves, eles podem afetar a qualidade de vida dos pacientes e seus familiares.

Recentemente, dados do Ambulatório de MPS do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, indicam que pacientes com MPS têm apresentado episódios de diarreia e/ou fezes amolecidas que melhoram com a introdução de medidas como dieta restrita a lactose (alimentos derivados do leite), por exemplo, mostrando que mais estudos são necessários para esclarecer as causas dos sintomas nesses pacientes.

Essa pesquisa tem por objetivo avaliar as manifestações gastrointestinais em pacientes com MPS, que estejam ou não recebendo Terapia de Reposição Enzimática, acompanhados no Ambulatório de Mucopolissacaridoses do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (AM-SGM/HCPA).

Caso você decida participar dessa pesquisa, será necessário que você siga o protocolo do estudo. Você virá em uma consulta habitual de Ambulatório de MPS do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre com o seu médico. Nessa visita, será necessário que você responda a um questionário sobre sintomas gastrointestinais e outro questionário sobre a quantidade de alimentos ingeridos no dia anterior à sua consulta (este questionário é chamado Recordatório Alimentar); que você

esteja disposto a coletar uma pequena amostra de sangue e amostra de fezes, para realizarmos os exames laboratoriais, além do teste molecular para análise de DNA; que você permita que uma das pesquisadoras do estudo faça uma avaliação nutricional da composição corporal; e, também, que você autorize a revisão do seu prontuário. O tempo necessário para a realização de tais procedimentos pode variar de 30 minutos à uma hora aproximadamente.

### **RISCOS E BENEFÍCIOS**

Os riscos e desconfortos causados pela coleta de sangue são semelhantes aos riscos envolvidos na coleta de sangue para exames laboratoriais de rotina (manchas roxas e dor no local da coleta). O desconforto e os riscos associados a este procedimento será minimizado pela realização da coleta por profissional treinado. Os benefícios consistem em avaliar de forma mais detalhada os sintomas gastrintestinais para um melhor manejo dos pacientes. Cabe salientar que esse estudo talvez não traga benefícios diretos para você, mas que pode ajudar a melhorar, futuramente, o tratamento dos pacientes com MPS. .

### **CUSTOS**

Não haverá compensação financeira pela sua participação no estudo. Entretanto, todas as despesas relacionadas aos exames e/ou avaliações realizados serão cobertos pelo projeto.

### **DÚVIDAS**

Se você tiver alguma dúvida em relação à pesquisa, deve contatar o pesquisador responsável, Dr. Roberto Giugliani, através do telefone (51) 96933070 ou (51) 33596338, no Centro de Pesquisa Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre ou você também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre através do telefone (51) 33598304 para maiores esclarecimentos. .

### **RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO NA PARTICIPAÇÃO DO ESTUDO**

Sua participação no estudo é voluntária. Se você decidir não participar do estudo, não haverá nenhum prejuízo em seu atendimento ou de seu(s) filho(s) AM-SGM/HCPA ou em qualquer outro serviço deste hospital.

### **CONFIDENCIALIDADE DAS INFORMAÇÕES**

As informações dessa pesquisa serão mantidas em sigilo, sendo apenas utilizadas de forma científica, e sem identificação do seu nome, em relatos especializados. Assim que todos os resultado estiverem prontos você receberá um relatório com todas as informações pertinentes.

Pelo presente termo, você declara que foi informado(a), de forma clara e detalhada, sobre a presente pesquisa, e que teve suas dúvidas esclarecidas. Além disso, declara ter sido esclarecido que não receberá nenhuma remuneração financeira pela participação no estudo. Declara que foi informado da garantia de receber resposta ou esclarecimento sobre a pesquisa a ser realizada, bem como da liberdade de não participar do estudo e da possibilidade de desistir, em qualquer momento, da participação. Além disso, declara que assinou duas vias deste consentimento, e que uma ficou em seu poder.

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

**Nome do paciente:** \_\_\_\_\_

**Assinatura do paciente:** \_\_\_\_\_

**Nome do Responsável legal do paciente:** \_\_\_\_\_

**Assinatura do responsável legal do paciente:** \_\_\_\_\_

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

**Nome do pesquisador que aplicou o Termo de Consentimento:** \_\_\_\_\_

**Assinatura do pesquisador que aplicou o Termo de Consentimento:** \_\_\_\_\_

**Obs.:** O presente documento, baseado no item IV das diretrizes e normas regulamentadoras para pesquisa em saúde, do Conselho Nacional de Saúde (Resolução 196/96), será assinada em duas vias, de igual valor, ficando uma via em poder do voluntário ou de seu responsável legal e outra com o pesquisador responsável

## APÊNDICE II – Ficha de registro do paciente

### ESTUDO SOBRE AS MANIFESTAÇÕES GASTROINTESTINAIS EM PACIENTES COM MUCOPOLISSACARIDOSES

#### DADOS DO PACIENTE /CONTROLE

**Nº Protocolo:**

**Data da avaliação:**

Data de nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Idade:

Sexo: ( ) M ( ) F

Nome do pai:

Nome da mãe:

#### Endereço Completo

Rua/Av.:

No:

Bairro:

Cidade:

CEP:

Estado:

Telefone:

Celular:

Email:

Consangüinidade: ( ) Sim Não ( )

Tipo de MPS: ( ) MPS \_\_\_\_\_ Subtipo: \_\_\_\_\_

Idade de diagnóstico:

Paciente em TRE: ( ) Não ( ) Sim. Se sim, início do TRE: \_\_\_\_\_

Se sim, uso regular da TRE: ( ) Sim ( ) Não

#### Dados antropométricos, composição corporal e Ângulo de Fase

Bioimpedância			
Peso (Kg)		Massa magra (Kg)	
Altura (cm)		Massa Magra (%)	
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )		Água Corporal (L)	
Classificação IMC (Kg/m <sup>2</sup> )		Água Corporal (%)	
BIA IMC (Kg/m <sup>2</sup> )		Água Intracelular (L)	
Gordura Corporal (%)		Água Intracelular (%)	
Gordura Massa (Kg)		Água Extracelular (L)	
TMB (Kcal)		Água Extracelular (%)	
		Ângulo de Fase (°)	

#### Dados Dietéticos:

Ingestão de lactose/dia: \_\_\_\_\_ Classificação: \_\_\_\_\_

**Dados bioquímicos:**

Exames	Valores	Data	Classificação
Valores de GAGs			
Ferritina			
Hematócrito			
Hemoglobina			
VCM			
IgA			
Iga antra-transglutaminase			
PCR			
VSG			
Alfa – 1 – antitriptase fecal			
Elastase -1 - fecal			
ASCA			
ANCA			

\*Valores de referência baseados no Serviço de Patologia Clínica do HCPA

## Medicação em uso:

Medicamento	Quantidade	Data de início	Data de término

## Quadro de sintomas gastrointestinais apresentados pelo paciente:

SINTOMA GASTROINT.	PASSADO	PRESENTE	PERDIDO	OBS:
Diarreia Crônica*				
Constipação				
Flatulência				
Fezes amolecidas				
Regurgitação				
Dor abdominal				
Inchaço na barriga				
Hérnia Inguinal				
Hérnia Umbilical				
Outro, especificar:				
Outro, especificar:				
Outro, especificar:				

\*Definição diarreia crônica (OMS): diminuição da consistência fecal por mais de 4 semanas



### APÊNDICE III – Recordatório Alimentar de 24h

#### RECORDATÓRIO ALIMENTAR

Nº PROTOCOLO: \_\_\_\_\_

DATA \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

REFEIÇÃO	ALIMENTOS INGERIDOS	QUANTIDADE (medida caseira)
Café da Manhã  Horário: _____ Local: _____		
Lanche da Manhã  Horário: _____ Local: _____		
Almoço  Horário: _____ Local: _____		
Lanche da Tarde  Horário: _____ Local: _____		
Jantar  Horário: _____ Local: _____		
Ceia  Horário: _____ Local: _____		
Intervalo refeições		

**APÊNDICE IV – Consumo de cálcio ingerido dos pacientes através do Recordatório de 24h (n=27)**

Paciente ID	Sexo	Idade (anos)	Qtdn Cálcio Ingerido Recor 24h	RDA Ca/idade (mg/dia)	Achado*
1 DSS	Fem	26	600	1.000	Inferior
2 D-Z	Fem	28	1000	1.000	adequado
3 FLS	Fem	04	1200	800	superior
4 PCG	Fem	25	1000	1.000	adequado
5 PBV	Masc	03	500	500	adequado
8 SPS	Fem	07	1000	800	superior
10 AVM	Masc	19	400	1.000	Inferior
11 BOC	Masc	14	1500	1.300	superior
12 CGC	Masc	09	1300	1.300	adequado
15 ENJ	Masc	08	1000	800	superior
17 FTG	Masc	16	1400	1.300	superior
18 GBL	Masc	10	300	1.300	Inferior
19 GAS	Masc	05	100	800	superior
20 JVW	Masc	04	1000	800	superior
22 A-L	Fem	23	1200	1.000	superior
23 EPM	Masc	07	1000	800	superior
24 FBD	Masc	12	1500	1.300	superior
26 GFB	Fem	10	1500	1.300	superior
27 A-C	Fem	01	500	500	adequado
28 E-B	Fem	22	1200	1.000	superior
29 L-P	Masc	18	1500	1.300	superior
30 P-M	Fem	14	1500	1.300	superior
31 PDP	Masc	15	1500	1.300	superior
32 ALM	Masc	13	1300	1.300	adequado
33 DMA	Fem	12	1300	1.300	adequado
34 JPP	Masc	19	1000	1.000	adequado
35 CSR	Fem	20	1000	1.000	Adequado
<b>TOTAL</b>	<b>27</b>				

\*Classificação do Achado: superior, inferior, adequado

## APÊNDICE V – ANÁLISE MOLECULAR DO TESTE DAS MUTAÇÕES NO GENE DA LACTASE

ID	Tipo MPS	Sexo	Genótipo	Interpretação*
1 DSS	I	Fem	CC	Intolerante à Lactose
2 D-Z	I	Fem	CC	Intolerante à Lactose
3 FLS	I	Fem	ND	ND
4 PCG	I	Fem	TT	Tolerante
5 PBV	I	Masc	ND	ND
8 SPS	I	Fem	TT	Tolerante
10 AVM	II	Masc	CT	Tolerante
11 BOC	II	Masc	CT	Tolerante
12 CGC	II	Masc	CC	Intolerante à Lactose
15 ENJ	II	Masc	CT	Tolerante
17 FTG	II	Masc	ND	ND
18 GBL	II	Masc	CC	Intolerante à Lactose
19 GAS	II	Masc	CC	Intolerante à Lactose
20 JVW	II	Masc	CC	Intolerante à Lactose
22 A-L	III	Fem	ND	ND
23 EPM	IIIA	Masc	CC	Intolerante à Lactose
24 FBD	IIIB	Masc	ND	ND
26 GFB	IIIB	Fem	CC	Intolerante à Lactose
27 A-C	IVA	Fem	CT	Tolerante
28 E-B	IV	Fem	ND	ND
29 L-P	IVA	Masc	ND	ND
30 P-M	IVA	Fem	ND	ND
31 PDP	IVA	Masc	CT	Tolerante
32 ALM	VI	Masc	ND	ND
33 DMA	VI	Fem	ND	ND
34 JPP	VI	Masc	CC	Intolerante à Lactose
35 CSR	IVA	Fem	ND	ND
<b>TOTAL</b>	<b>27</b>		CC	Intolerante à Lactose

\*Interpretação: Genótipos CT e TT = Tolerantes à lactose; Genótipos CC = Intolerantes à lactose; ND: Não disponível