

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU

Valores de referência da atividade da enzima iduronato-2-sulfatase para o diagnóstico de mucopolissacaridose II

Marina Mastelaro de Rezende

Relatório de Iniciação Científica
apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, para obtenção do
título de Bacharel em Ciências
Biomédicas.

BOTUCATU – SP

-2011-

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Rezende, Marina Mastelaro de.

Valores de referência da atividade da enzima iduronato-2-sulfatase para o diagnóstico de mucopolissacaridose II / Marina Mastelaro de Rezende. – Botucatu : [s. n.], 2011

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Vânia D'Almeida

Capes: 20805004

1. Mucopolissacaridose - Diagnóstico.

Palavras-chave: Diagnóstico; GSPF; Iduronato-2-sulfatase; Mucopolissacaridose.

Valores de referência da atividade da enzima iduronato-2-sulfatase para o diagnóstico de mucopolissacaridose II

Marina M. Rezende¹, Karen B. Müller², Vânia D'Almeida¹

¹Departamento de Psicobiologia, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

²Departamento de Pediatria, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

Autor correspondente: Vânia D'Almeida

Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo

Rua Napoleão de Barros, 925, 3º andar, sala 10

Vila Clementino – São Paulo (SP)

CEP: 04024002

Telefone: 2149-0155 Ramal: 283

Contato:

MMR: marina.mrez@gmail.com

KBM: kbmuller@gmail.com

VDA: yaniadalmeida@uol.com.br

Resumo

Justificativa

Mucopolissacaridoses são erros inatos do metabolismo nos quais a deficiência ou falta de uma enzima faz com que os glicosaminoglicanos não sejam degradados e se acumulem nos lisossomos. O acúmulo se dá em todos os tecidos, dessa forma, a sintomatologia é multissistêmica e de gravidade variável. Essas características, unidas à baixa frequência, fazem com que a doença seja subdiagnosticada. O estudo teve como objetivo padronizar uma técnica laboratorial para a dosagem da atividade enzimática da iduronato-2-sulfatase, enzima alterada na mucopolissacaridose de tipo II, em gota seca em papel filtro (GSPF) por método fluorimétrico, tendo como material de referência a técnica em leucócitos.

Resultados

Os valores obtidos dos indivíduos saudáveis variaram entre 1,830-16,860 $\mu\text{mol/L/h}$ em leucócitos e entre 2,710-17,360 $\mu\text{mol/L/h}$ em GSPF, contra 0,650-3,060 $\mu\text{mol/L/h}$ dos afetados em GSPF, que tiveram uma atividade entre 0,020-0,000 $\mu\text{mol/L/h}$ em leucócitos. O melhor valor de corte, levando em consideração sensibilidade e especificidade, foi de 3,48 $\mu\text{mol/L/h}$.

Conclusões

Este estudo possibilitou determinar o intervalo de referência da atividade da enzima iduronato-2-sulfatase em GSPF para a população brasileira, assim como validar as técnicas em leucócitos e GSPF.

Introdução

Mucopolissacaridoses (MPS) são erros inatos do metabolismo nos quais há a ausência ou deficiência de enzimas lisossomais que agem no catabolismo de glicosaminoglicanos (GAG) [1-3]. Com isso, há o acúmulo destes dentro dos lisossomos [3, 4], o que resulta em graves implicações na qualidade de vida das pessoas afetadas, podendo debilitar, sequestrar ou até levar à morte [5].

O acúmulo se dá em todos os tecidos e órgãos, o que confere a esse grupo de doenças um caráter multissistêmico [1, 6]. Além disso, a grande variabilidade dos sinais e sintomas clínicos e a baixa frequência na população são aspectos que dificultam o diagnóstico [5] e retardam um possível tratamento ou acompanhamento.

Considerando seus 7 subtipos [1], as mucopolissacaridoses possuem uma incidência conjunta de 1:25.000 [7], porém há subtipos que se sobressaem. Em geral, as MPS são doenças de herança genética autossômica recessiva, com exceção à MPS II ou, Síndrome de Hunter, cujo gene alterado localiza-se no cromossomo X [1-4, 8, 9].

Apesar da frequência isolada da MPS II ser de apenas 1:110.000 a 132.500 na população geral [9], sua ocorrência em mulheres é ainda mais rara [9], não só pela possibilidade de heterozigose, mas também pela baixa penetrância nessa situação e inativação preferencial do cromossomo X [6, 9]. Contudo, os casos de mulheres afetadas costumam ter sintomatologia grave [9].

Nesta síndrome, a enzima alterada é a iduronato-2-sulfatase [1, 2, 9, 10], responsável pela degradação dos GAG dermatan sulfato e heparan sulfato [9]. Esta pode ter ou não uma atividade residual, o que influi na sintomatologia, que ainda que heterogênea, possui algumas alterações de frequência significantes, tais como: *facies* grosseiras, disostose múltipla, problemas auditivos, hepato e/ou esplenomegalia e recorrentes infecções das vias aéreas superiores, associadas a dificuldades respiratórias

[2, 9-11] e apneia obstrutiva do sono [1, 11]. Além disso, cardiopatias precoces e comprometimento do sistema nervoso central são comuns entre os pacientes [1].

Antigamente, fazia-se a divisão da MPS II em grave e moderada, de acordo com a intensidade das alterações apresentadas, envolvimento ou não do sistema nervoso central e expectativa de vida [9, 11] (nos casos mais graves, que representam aproximadamente 75% dos casos [10], não ultrapassa 15 anos) [1, 2, 6, 9]. Atualmente, o espectro da doença é visto de maneira contínua, de forma que não há mais essa distinção [3].

Ainda que não existam sinais patognômicos, o conjunto de evidências pode gerar uma suspeita clínica, que deve ser seguida de confirmação laboratorial. Geralmente, o primeiro teste se baseia na procura de GAG na urina [12], que costumam aparecer aumentados nos casos de não degradação [1, 6, 9]. Porém, o ensaio colorimétrico utilizado nesta etapa não é específico, não identificando qual o tipo de GAG excretado em excesso [3].

Atualmente, o padrão ouro para o diagnóstico de MPS II é o que avalia a atividade da enzima iduronato-2-sulfatase em leucócitos [13], sendo assim, uma amostra de sangue é obtida e o material passa pelas reações que se resumem a sua incubação com um substrato sintético que, quando quebrado, libera uma fluorescência que é medida em fluorímetro. O problema com esse método é a baixa praticidade de transporte e manipulação do material biológico até o centro de diagnóstico. Além disso, é essencial que não se extrapole o prazo entre coleta do sangue e teste, já que, o material pode ter sua qualidade prejudicada [4].

Como melhor alternativa à técnica anterior há a análise feita a partir de gota de sangue seca em papel filtro (GSPF), que, além de utilizar apenas uma gota de sangue, oferece menor risco biológico [4] e possibilita um maior intervalo entre o momento da

coleta e a realização do ensaio; o que é interessante em um país com as dimensões do Brasil. Porém, para que realmente possa ser utilizada, deve ter seus valores padronizados para a população em que se aplicará [4].

Resultados

Grupo Controle Negativo (CN)

A atividade da iduronato-2-sulfatase foi analisada no grupo CN, tanto em leucócitos quanto em GSPF, para que fosse estabelecido o intervalo de valores de referência na população brasileira. As amostras que tiveram os valores de β -galactosidase (teste de controle de qualidade – vide sub item “obtenção e preparo das amostras”, nos métodos) inferiores a 6 $\mu\text{mol/L}$ sangue foram excluídas da pesquisa por serem consideradas inadequadas. Sendo assim, foram excluídos da pesquisa 4 dos 56 voluntários para o grupo CN (ficando 28 homens e 24 mulheres). A média dos valores de β -galactosidase obtida ficou em 18,67, o que significa que, de maneira geral, a qualidade do material estava boa.

Os valores médios do grupo CN obtidos, assim como o desvio padrão e intervalo estão descritos na tabela 1.

Tabela 1: Análise descritiva das dosagens da iduronato-2-sulfatase no grupo CN

	Leucócitos			GSPF		
	Total	Homens	Mulheres	Total	Homens	Mulheres
Média	8,393	8,704	8,030	8,076	7,448	8,809
Desvio Padrão	3,463	3,651	3,268	2,715	2,801	2,469
Intervalo	1,830–	2,040–	1,830–	2,710–	2,710–	3,870 –
	16,860	16,860	13,520	17,360	17,360	15,450

Grupo Controle Positivo (CP)

Dos iniciais 12 suspeitos clínicos que chegaram ao laboratório para a confirmação diagnóstica e que tiveram um resultado positivo na análise em leucócitos, 10 apenas foram selecionados para a pesquisa, uma vez que os outros 2 apresentaram uma dosagem de atividade da β -galactosidase inferior a 6 $\mu\text{mol/L/h}$ e foram considerados inadequados. Todos os indivíduos eram do sexo masculino.

Os valores médios do grupo CP obtidos, assim como o desvio padrão e intervalo estão descritos na tabela 2.

Tabela 2: Análise descritiva das dosagens da iduronato-2-sulfatase no grupo CP

	Leucócitos	GSPF
Média	0,003	1,297
Desvio Padrão	0,007	0,683
Intervalo	0,020 – 0,000	0,650 – 3,060

É importante enfatizar que o grupo CP é formado apenas por indivíduos do sexo masculino.

Análise dos dados

A normalidade dos resultados do grupo CN foi confirmada com a utilização do teste de Kolmogorov-Smirnov (como mostra a figura 1) e o teste t-Student para amostras independentes foi utilizado para se comparar os resultados entre os gêneros, mas a diferença não foi significativa ($p=0,071$). Foi previamente estabelecido um nível de significância de 5% ($p>0,05$).

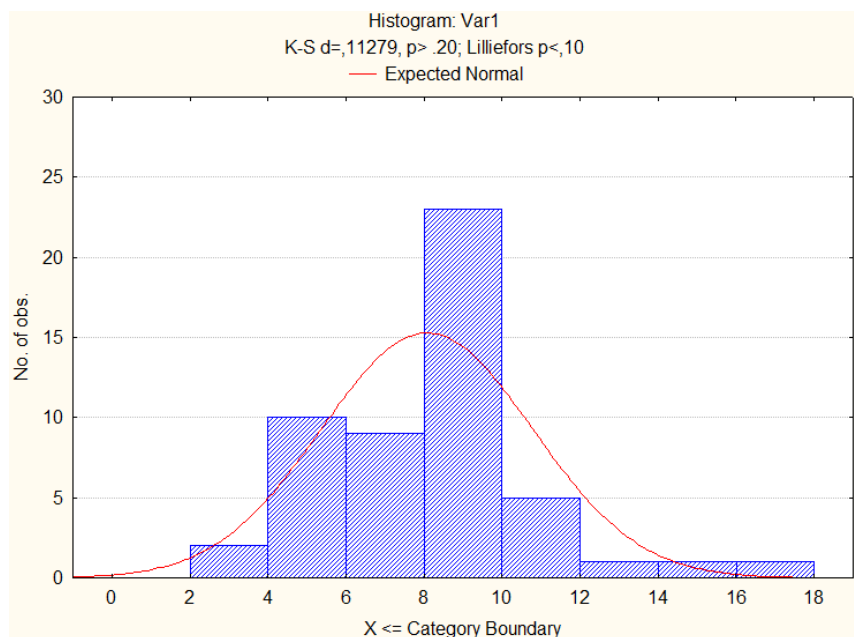


Figura 1: Histograma de normalidade obtido por Kolmogorov-Smirnov.

A curva ROC construída leva em consideração os resultados dos testes em leucócitos e os valores de referência da literatura [13] para categorizar os indivíduos como positivos ou negativos. A partir disso, os resultados em GSPF são analisados e conforme sensibilidade e especificidade apresentadas o melhor valor de corte é definido.

Os resultados obtidos com essa curva sugeriram um valor de corte de 3,480 $\mu\text{mol/L/h}$, em que a sensibilidade é de 98% e a especificidade é de 100%. A partir dessa etapa foi feita uma tabela de contingência e cálculo da especificidade, sensibilidade, valor preditivo positivo e negativo, além da eficiência para o ensaio em GSPF. Os dados obtidos estão expostos na tabela 3.

Tabela 3: Tabela de contingência

		Resultados em leucócitos		
		Positivos	Negativos	Total
Resultados em GSPF	Positivos	10	1	11
	Negativos	0	51	51
	Total	10	52	62

O valor de sensibilidade obtido foi de 100% e o de especificidade, 98%. Já os valores preditivos positivo e negativo ficaram em 91% e 100% respectivamente, o que resultou em uma eficiência de 98%.

Discussão

O uso de GSPF para diagnóstico de doenças lisossomais vêm crescendo não apenas por facilitar questões práticas como: transporte e segurança biológica, como também pela própria praticidade dos testes e estabilidade do material [4]. Porém, para que essas vantagens sejam usufruídas, é importante que haja cuidado tanto com a coleta de sangue quanto com a própria elaboração das gotas e secagem apropriada [4].

Além disso, é importante que as amostras sempre passem por um controle de qualidade (por exemplo, a β -galactosidase) para que um possível diagnóstico positivo por um resultado baixo não seja confundido com uma amostra de má qualidade. Além disso, para que se controle a reprodutibilidade dos testes, é fundamental que algumas amostras sempre se repitam em todos os testes [4].

Como o mais comum e descrito é a técnica em leucócitos, sugerimos o uso de GSPF para triagem, sobretudo em famílias em que haja histórico familiar que favoreça

a ocorrência de doenças genéticas (como consanguinidade), ainda que raras, e o uso da técnica em leucócitos para a confirmação diagnóstica.

Como esperado, não houve diferença significativa entre os sexos, porém, por ser uma doença ligada ao cromossomo X, sua dosagem em mulheres pode ser falha [9], uma vez que pode ocorrer heterozigose (acompanhada de baixa penetrância) e inativação preferencial do X [9].

É possível que nossos resultados difiram de outros laboratórios, principalmente porque diferenças em equipamentos e reagentes podem interferir [4], assim como a própria heterogeneidade étnica brasileira, o que enfatiza a necessidade de estabelecimento de valores de referência próprios para cada população.

Conclusões

Este estudo possibilitou a determinação do intervalo de referência da atividade da enzima iduronato-2-sulfatase em GSPF para a população brasileira, assim como a padronização de sua técnica, que não tinha sido descrita anteriormente. Além disso, possibilitou também o estabelecimento dos valores de referência para a reação em leucócitos e validação de sua técnica, que já havia sido descrita por Voznyi e colaboradores [13].

Métodos

Grupos experimentais

O estudo foi realizado no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo (LEIM) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da mesma (0384/05).

Inicialmente a amostra foi constituída por 56 voluntários sadios com idade superior a 18 anos e de ambos os sexos, sem doença crônica ou genética previamente identificada, porém, destes ficaram apenas 52 (28 homens e 24 mulheres) após o teste da enzima β -galactosidade (Ver sub item “obtenção e preparo das amostras”), uma vez que foram excluídos os que apresentaram atividade inferior a 6 $\mu\text{mol/L}$ sangue no teste. Os indivíduos que foram incluídos na pesquisa compuseram o grupo controle negativo (CN).

O grupo controle positivo (CP) foi composto por 10 indivíduos, de vários estados brasileiros, que foram encaminhados ao laboratório com suspeita clínica e tiveram a confirmação diagnóstica no teste com leucócitos. Todos esses indivíduos eram do sexo masculino, já que a incidência em mulheres é bastante rara, como descrito anteriormente.

Obtenção e preparo das amostras

Um volume de 5 a 10 mL de sangue periférico foi coletado em tubo de heparina, através de punção venosa, na própria instituição, por profissional especializado.

Uma parte foi separada para a elaboração da gota seca em papel filtro (GSPF), em que foi utilizado o papel filtro Whatman® 903 (Intercientífica), e que ficou secando

em temperatura ambiente por pelo menos 4 horas e, posteriormente, foi guardado em câmara fria a 4° C em embalagem plástica com dissecante até o momento da análise.

Gotas com aspecto heterogêneo não foram utilizadas. Além do controle macroscópico, as gotas foram submetidas ao teste de quantificação da atividade da enzima β -galactosidase, uma vez que esta técnica é utilizada como controle de qualidade e já tem seus valores de referência estabelecidos pelo laboratório onde ocorreu a pesquisa [4]. Sua utilização como controle de qualidade se dá graças ao seu baixo preço, simplicidade, rapidez e estabilidade em papel filtro [14], além da baixa incidência das doenças relacionadas a sua deficiência (GM1 gangliosidose e Morquio B) [15, 16].

Para análise em leucócitos, o sangue restante passou por tratamento para a extração dessas células segundo método de Skoog e Beck [17] e o material foi armazenado a -20°C até a análise.

Ensaio de atividade enzimática

A avaliação da atividade enzimática em leucócitos se baseia no método descrito por Voznyi e colaboradores [13] em que os resultados são expressos em nmol/mg de proteína/4 horas. Este ensaio foi utilizado como teste de referência (padrão ouro) para a atividade enzimática das amostras.

Para a quantificação de proteínas, necessária para a normalização do seu total nas amostras, foi utilizado o kit comercial da BIORAD® (RC DCTM Protein Assay; BIORAD Laboratories, CA).

A análise em GSPF foi feita a partir de uma modificação no método de Voznyi e colaboradores [13], e descrita pela primeira vez no presente trabalho. Tanto na análise em leucócitos quanto em GSPF foi utilizado o substrato fluorogênico 4-

metilumbeliferil- α -L-iduronídeo-2-sulfato (Moscerdam Substrates®). As condições dos ensaios em GSPF e leucócitos estão descritas na tabela 4.

O método utilizado para a dosagem de β -galactosidase foi descrito por Chamoles e colaboradores [18] e suas condições de ensaio também estão descritas na tabela 4, que foi descrita por Müller e colaboradores [4].

As reações foram realizadas em placa de 96 poços branca e para cada amostra são utilizados 3 poços, sendo 2 para o teste em duplicata e outro para o branco, que não leva substrato, afim de se evitar a interferência da possível quebra espontânea do substrato. Parte do substrato é incubada separadamente para que seja adicionado apenas no final da reação nos brancos. As incubações são feitas a 37° C e rotação de 200 rpm. No caso das reações em GSPF, são utilizados picotes com 1,5 mm de diâmetro.

Ao final da reação, a fluorescência resultante da quebra do substrato é detectada na excitação de 360 nm e emissão de 450 nm no fluorímetro SpectraMax M2 (Molecular Devices). Os valores de fluorescência obtidos dos brancos são subtraídos das médias das duplicatas e os resultados são comparados a uma curva de calibração que deve ser feita no dia da reação. Essa curva é feita com alíquotas de 4-metilumbeliferona com concentrações de 57 μ M até 0,11 μ M.

Os suspeitos clínicos que tiveram a atividade da iduronato-2-sulfatase com resultado igual ou inferior a 0,09 em leucócitos foram consideradas compatíveis com Síndrome de Hunter. Amostras com atividade da β -galactosidase inferiores a 6 foram considerados inadequados e excluídas da pesquisa.

Análise de dados

A análise descritiva dos dados foi realizada através do cálculo das seguintes medidas-resumo: média, desvio padrão, mínimo e máximo (intervalo).

Para a verificação da normalidade das amostras foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. Para comparar a atividade enzimática entre os gêneros foi realizado o teste T de Student para amostras independentes. Foi previamente estabelecido um nível de significância de 5% ($p > 0,05$).

Uma curva ROC (*receiver operator characteristic*), bem como o cálculo dos valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, eficiência e razão de verossimilhança [19], foram determinados para estabelecer o melhor valor de corte para o ensaio em GSPF.

Os dados foram digitados em planilhas do programa Microsoft Office Excel 2007, para o adequado armazenamento das informações. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio dos softwares: SPSS (Statistical Package for Social Sciences) versão 13.0 e STATISTICA versão 8.

Tabela 4: Ensaios de atividade enzimática em leucócitos e GSPF.

Enzima	Tipo da amostra	1° incubação	Tempo	2° incubação	Tempo	Tampão STOP
Iduronato-2-sulfatase	Leucócitos*	20 µL de substrato	4 horas	20 µL tampão citrato 0,1M-fosfato 0,2M pH 4,5 com 0,02% de azida sódica; 10 µL de LEBT [#]	24 horas	200 µL tampão bicarbonato de sódio e carbonato de sódio 0,5 M pH 10,7 com 0,025% triton X-100
Iduronato-2-sulfatase	GSPF	20 µL de substrato	24 horas	40 µL tampão citrato 0,1M-fosfato 0,2M pH 4,5 com 0,02% de azida sódica; 10 µL de LEBT [#]	24 horas	200 µL tampão bicarbonato de sódio e carbonato de sódio 0,5 M pH 10,7 com 0,025% triton X-100
β-galactosidade	GSPF	20 µL substrato**; 20 µL tampão citrato-fosfato 0,1 M pH 4,4; 20 µL cloreto de sódio 0,9%.	3 horas	--	--	200 µL solução 10% de etilenodiamina 1,32 M pH 11,3

*Para a análise em leucócitos, são utilizados 10 µL da amostra diluída em BSA 0,2% com 0,02% de azida sódica.
 **O substrato utilizado é o 4-metilumbeliferona-β-D-galactopiranosídeo.
 # LEBT: *Lysosomal Enzymes purified from Bovine Testis* – Extrato purificado de α-iduronidase.

Conflito de interesse

Os autores declararam não apresentarem conflitos de interesse.

Contribuição dos autores

MMR, KBM e VDA participaram da coleta das amostras, discussões sobre as técnicas e análise e interpretação dos dados. KBM e VDA também revisaram o texto do artigo, escrito por MMR. Todos os autores leram e aprovaram a versão final do texto.

Agradecimentos

Nós gostaríamos de agradecer a todos os técnicos e alunos do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo, além dos voluntários que disponibilizaram material para que os testes fossem feitos. Além disso, agradecemos também à FAPESP, CNPq, AFIP e IGEIM.

Referências

1. Giugliani R, Federhen A, Rojas MV, Vieira T, Artigalás O, Pinto LL, Azevedo AC, Acosta A, Bonfim C, Lourenço CM, et al: **Mucopolysaccharidosis I, II, and VI: Brief review and guidelines for treatment.** *Genet Mol Biol*, **33**:589-604.
2. Pinto LL, Schwartz IV, Puga AC, Vieira TA, Munoz MV, Giugliani R: **Prospective study of 11 Brazilian patients with mucopolysaccharidosis II.** *J Pediatr (Rio J)* 2006, **82**:273-278.
3. Coutinho MF, Lacerda L, Alves S: **Glycosaminoglycan storage disorders: a review.** *Biochem Res Int*, **2012**:471325.
4. Muller KB, Rodrigues MD, Pereira VG, Martins AM, D'Almeida V: **Reference values for lysosomal enzymes activities using dried blood spots samples - a Brazilian experience.** *Diagn Pathol*, **5**:65.
5. Chiaratti de Oliveira A, dos Santos AM, Martins AM, D'Almeida V: **Screening for inborn errors of metabolism among newborns with metabolic disturbance and/or neurological manifestations without determined cause.** *Sao Paulo Med J* 2001, **119**:160-164.

6. Martin R, Beck M, Eng C, Giugliani R, Harmatz P, Munoz V, Muenzer J: **Recognition and diagnosis of mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome).** *Pediatrics* 2008, **121**:e377-386.
7. Clarke LA: **The mucopolysaccharidoses: a success of molecular medicine.** *Expert Rev Mol Med* 2008, **10**:e1.
8. Albano LM, Sugayama SS, Bertola DR, Andrade CE, Utagawa CY, Puppi F, Nader HB, Toma L, Coelho J, Leistner S, et al: **Clinical and laboratorial study of 19 cases of mucopolysaccharidoses.** *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 2000, **55**:213-218.
9. Pinto LL, Vieira TA, Giugliani R, Schwartz IV: **Expression of the disease on female carriers of X-linked lysosomal disorders: a brief review.** *Orphanet J Rare Dis*, **5**:14.
10. Muenzer J, Beck M, Eng CM, Escolar ML, Giugliani R, Guffon NH, Harmatz P, Kamin W, Kampmann C, Koseoglu ST, et al: **Multidisciplinary management of Hunter syndrome.** *Pediatrics* 2009, **124**:e1228-1239.
11. Al Sawaf S, Mayatepek E, Hoffmann B: **Neurological findings in Hunter disease: pathology and possible therapeutic effects reviewed.** *J Inherit Metab Dis* 2008, **31**:473-480.
12. Martins AM: **Inborn errors of metabolism: a clinical overview.** *Sao Paulo Med J* 1999, **117**:251-265.
13. Voznyi YV, Keulemans JL, van Diggelen OP: **A fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of MPS II (Hunter disease).** *J Inherit Metab Dis* 2001, **24**:675-680.
14. Chamoles NA, Blanco MB, Gaggioli D, Casentini C: **Hurler-like phenotype: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper.** *Clin Chem* 2001, **47**:2098-2102.
15. Brunetti-Pierri N, Scaglia F: **GM1 gangliosidosis: review of clinical, molecular, and therapeutic aspects.** *Mol Genet Metab* 2008, **94**:391-396.
16. Gasparotto N, Tomanin R, Frigo AC, Niizawa G, Pasquini E, Blanco M, Donati MA, Keutzer J, Zacchello F, Scarpa M: **Rapid diagnostic testing procedures for lysosomal storage disorders: alpha-glucosidase and beta-galactosidase assays on dried blood spots.** *Clin Chim Acta* 2009, **402**:38-41.
17. Skoog WA, Beck WS: **Studies on the fibrinogen, dextran and phytohemagglutinin methods of isolating leukocytes.** *Blood* 1956, **11**:436-454.
18. Chamoles NA, Blanco MB, Iorcansky S, Gaggioli D, Specola N, Casentini C: **Retrospective diagnosis of GM1 gangliosidosis by use of a newborn-screening card.** *Clin Chem* 2001, **47**:2068.
19. Halley SBC, Browner SR, Grady WS, Hearst PR, Newman TB. **Delineando a pesquisa clínica - uma abordagem epidemiológica.** 2003; ARTMED, Porto Alegre.