



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS (Mac_Pro)

CAMILA DOS SANTOS BRITO

**ANÁLISE HEMATOLÓGICA DE PACIENTES COM
MUCOPOLISSACARIDOSES (MPS) NO ESTADO DO PARÁ**

BELÉM
2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS (Mac_Pro)

CAMILA DOS SANTOS BRITO

ANÁLISE HEMATOLÓGICA DE PACIENTES COM MUCOPOLISSACARIDOSES (MPS) NO ESTADO DO PARÁ

Projeto de Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós Graduação em Análises Clínicas da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Análises Clínicas.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva, Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo- ICB- UFPA.

BELÉM
2018

CAMILA DOS SANTOS BRITO

**ANÁLISE HEMATOLÓGICA DE PACIENTES COM
MUCOPOLISSACARIDOSES (MPS) NO ESTADO DO PARÁ**

Projeto de Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós Graduação em Análises Clínicas da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Análises Clínicas.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva, Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo- ICB- UFPA.

Banca examinadora:

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva (LEIM-UFPA)

Avaliador 01: Dra.^a Prof.^a Isabel Cristina Neves de Souza (HUBFS-UFPA)

Avaliador 02: Dr. ^o Prof.^o Lacy Cardoso de Brito Júnior (ICB-UFPA)

Avaliador 03: Dr. ^o Pedro Eduardo Bonfim Freitas (IEC)

Suplente 01: Dr. ^o Carlos Eduardo de Melo Amaral

Suplente 02: Dr.^a Maria Helena Thomaz Maia

Suplente 03: Dr. ^o Erik Artur Cortinhas Alves

BELÉM
2018

Dedicatória

Dedico a realização deste trabalho à Deus, minha família, amigos e pacientes por terem o tornado possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus primeiramente, pois para quem na vida passou por tantos desafios e necessidades sabe que, só Ele nos guia nas horas difíceis. Agradeço ele também por ter me dado a sorte de ter uma família maravilhosa, que sempre esteve ao meu lado, em todas as circunstâncias.

Pela minha mãe que é meu maior exemplo de vida e perseverança, nada do que vivi durante esses de luta, nem mesmo a realização desse trabalho seriam possíveis se ela não tivesse me ajudado a chegar aqui. Ao meu esposo e sua família que me deram total apoio e incentivo durante o período que mais precisei, pelo seu carinho, amor e amizade. A meu irmão Marcus Vinicius, por ser a razão a união da nossa família em amor!

Ao meu orientador, que é afigura profissional que me induziu a escolher a biomedicina como profissão. Agradeço a ele principalmente pela paciência e compreensão e pela jornada, que às vezes é mais enriquecedora do que a chegada.

Agradeço minha equipe de trabalho da Hematologia do Laboratório Paulo Azevedo, que juntas me deram total apoio na jornada dupla entre trabalho de rotina dura, aulas e muito estudo. E por ter sido tão difícil essa conciliação de jornada, o Laboratório Paulo Azevedo além de ter cedido o espaço e materiais para realização das análises deste trabalho foi onde eu cresci diariamente como profissional e como ser humano.

Em especial, agradeço também aos pacientes e seus familiares, que se propuseram a participar deste estudo, sendo o objetivo maior desse trabalho ser útil para eles.

Em resumo, agradeço a vida pela oportunidade de adquirir conhecimento e experiência, que me enriqueceram como pessoa e como profissional ao longe desses quase dois anos de pesquisa e dedicação para realizar este trabalho.

Obrigada!

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	i
AGRADECIMENTOS	ii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	iii
LISTA DE FIGURAS E QUADROS	iv
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. ERROS INATOS DO METABOLISMO E DOENÇA LISOSSÔMICA DE DEPÓSITO:	01
1.2. CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS DOENÇAS DE DEPÓSITO LISOSSOMAL:	03
1.3. CARACTERÍSTICAS E CLASSIFICAÇÃO DAS MUCOPOLISSACARIDOSES:	04
1.4. ASPECTOS MORFOLÓGICOS DAS MUCOPOLISSACARIDOSES:	08
1.5. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS:	08
1.6. DIAGNÓSTICO CLÍNICO E LABORATORIAL DAS MPS:	08
1.7. TRATAMENTO:	10
1.8. IMPORTÂNCIA DA AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA NAS MPS:	11
2. JUSTIFICATIVAS:	15
3. ASPECTOS ÉTICOS:	17
4. OBJETIVOS:	18
4.1. Objetivo geral:	18
4.2. Objetivos específicos:	18
5. MATERIAIS E MÉTODOS:	19

5.1.	CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS:	19
5.1.1.	COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS:	21
5.2.	HEMOGRAMA AUTOMATIZADO (BC 6800 MINDRAY):	21
5.3.	ANÁLISE MICROSCÓPICA DE ESFREGAÇO SANGUÍNEO:	22
5.4.	ANÁLISE DOS DADOS:	23
6.	RESULTADOS:	24
6.1.	ANÁLISE HEMATOLÓGICA AUTOMATIZADA E HEMATOSCOPIA:	24
6.1.1.	ERITROGRAMA:	24
6.1.2.	LEUCOGRAMA:	25
6.1.3.	PLAQUETOGAMA:	29
7.	DISCUSSÃO:	30
8.	CONCLUSÃO:	34
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	36
10.	ANEXO:	44

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

CHCM: Concentração de hemoglobina corpuscular média

DLD: Doença de depósito lisossômico

EIM: Erros inatos do metabolismo

EPO: Eritropoetina

LEIM: Laboratório de erros inatos do metabolismo

LPA: Laboratório Paulo Azevedo

GAG: Glicosaminoglicanos

HEMOPA: Hemocentro do Pará

HCM: Hemoglobina corpuscular média

Ht: Hematócrito

Hb: Hemoglobina

IDS: Iduronato-sulfatase

MPS: Mucopolissacaridoses

NAGLU: α -N-acetil-glicosaminidase

OMS: Organização mundial de saúde

RDW: *red cell distribution width*

TRE: Terapia de reposição enzimática

VCM: Volume corpuscular médio

LISTA DE TABELAS, FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 01: Linfócito e neutrófilo, presença de granulação de Alder-Reilly, (x1.000)	03
Figura 02: Neutrófilos bastonetes com granulações (x1.000)	14
Figura 03: Leucócito com granulação de Alder-Reilly, podem ser vistos tanto em indivíduos saudáveis quanto em paciente com mucopolissacaridoses (x1.000)	14
Figura 04 e 05: Paciente P2, MPS II, linfócitos com granulação de Alder-Reilly (x100).	27
Figura 06: Paciente P6, MPS VI, neutrófilos com granulações de Alder-Reilly (X100).	27
Figura 07: Paciente P7, MPS VI, neutrófilos com granulações de Alder-Reilly (X100).	27
Figura 09: Paciente P3, MPS II, monócito vacuolizado (x100).	27
Figura 09a: Scattergrama do paciente P2, 29% de linfócitos com granulação de Alder-Reilly (19/65)	28
Figura 09b: Scattergrama do paciente P6, 91% de neutrófilos com granulações de Alder-Reilly (32/35)	28
Figura 09c: Scattergrama de paciente com granulação tóxica e desvio à esquerda até mielócitos	28
Quadro 01: Classificação das MPS	04
Quadro 02: Identificação dos pacientes do estudo por tipo de MPS. Em destaque os pacientes que compreendem irmandades deste estudo.	18
Quadro 03: Caracterização clínica dos pacientes. Em destaque os pacientes que compreendem irmandades deste estudo.	19
Quadro 04: Eritrograma, resultados de pacientes e média de resultados do grupo controle. VR: Valores de referência	25
Quadro 05: Resultados evidenciados na hematoscopia de pacientes. Em destaque os pacientes que correspondem irmandades neste estudo	26

Quadro 06: Leucograma, resultados de pacientes e média de resultados do grupo controle. VR: Valores de referência 26

Quadro 07: Plaquetograma, resultados de pacientes e média de resultados do grupo controle. VR: Valores de referência. 29

RESUMO

Introdução: As mucopolissacaridoses (MPS) dentre os erros inatos do metabolismo (EIM) são doenças de depósito lisossômico (DLD) causadas devido a deficiência de enzimas lisossomais necessárias para degradação dos glicosaminoglicanos (GAG). A célula, e conseqüentemente o tecido “incham”, causando organomegalia típica e outras características morfo celulares. Devido a deficiência enzimática os GAG não degradados se acumulam no citoplasma e são evidenciados como granulações ou inclusões metacromáticas circundadas por um espaço claro nos linfócitos e neutrófilos, essa granulação é conhecida como anomalia de Alder-Reilly. **Objetivos:** Foram verificadas alterações hematológicas quantitativas e qualitativas além da morfologia celular de pacientes com MPS diagnosticados no estado do Pará. **Materiais e Métodos:** O hemograma automatizado dos pacientes e do grupo controle foi realizado no equipamento BC 6800 MINRAY. Foram analisados eritrograma, leucograma, plaquetograma e a morfologia celular destes pacientes em comparação com um grupo controle e alterações. Todas as amostras de pacientes passaram por análise em hematoscopia. **Resultados:** Os resultados encontrados neste estudo sugerem que pacientes com MPS apresentam resultados quantitativos de hemograma normais em comparação com o grupo controle e de acordo com os intervalos de referência adotados e qualitativamente podem ser evidenciadas alterações morfológicas que foram sinalizados pelo analisador hematológico automatizado BC 6800 em forma de *flag* para a série branca e não geram dispersão anormal de *scattergrama*. **Conclusão:** Não é possível correlacionar o perfil clínico do paciente pelo tipo de MPS e o estado de saúde clínico deste com a presença da alteração morfológica, as granulações de Alder-Reilly, pois a mesma foi evidenciada em tipos diferente de MPS (II em linfócitos e VI em neutrófilos) com pacientes de fenótipos clínicos semelhantes.

ABSTRACT

Introduction: Mucopolysaccharidoses (MPS) among inborn errors of metabolism (EIM) are lysosomal storage diseases (DLD) caused due to the deficiency of lysosomal enzymes required for glycosaminoglycan degradation (GAG). The cell, and consequently the tissue "swell", causing typical organomegaly and other morphocellular features. Due to enzyme deficiency, non-degraded GAGs accumulate in the cytoplasm and are evidenced as granulations or metachromatic inclusions surrounded by a clear lymphocyte and neutrophil space, this granulation is known as Alder-Reilly anomaly.

Objectives: Quantitative and qualitative hematological alterations were verified in addition to the cellular morphology of patients with MPS diagnosed in the state of Pará. **Materials and Methods:** The automated hemogram of the patients and the control group was performed in the BC 6800 MINRAY equipment. Erythrogram, leukogram, plaquetogram and the cellular morphology of these patients were analyzed in comparison with a control group and alterations. All patient samples underwent hematopoietic analysis.

Results: The results found in this study suggest that MPS patients present normal quantitative hemogram results in comparison to the control group and according to the adopted reference intervals, and qualitatively, morphological alterations can be evidenced that were flagged by the automated hematology analyzer BC 6800 in flag shape for the white series and do not generate scattergram abnormal dispersion. **Conclusion:** It is not possible to correlate the clinical profile of the patient with the type of MPS and the clinical state of the patient with the presence of the morphological alteration, Alder-Reilly granulations, as it was evidenced in different types of MPS (II in lymphocytes and VI in neutrophils) with patients of similar clinical phenotypes.

1. INTRODUÇÃO:

1.1. ERROS INATOS DO METABOLISMO E DOENÇA LISOSSÔMICA DE DEPÓSITO:

O metabolismo é o processo bioquímico pelo qual um organismo vivo adquire e utiliza a energia necessária para realizar suas diversas funções. Isso ocorre através de uma série de reações enzimáticas consecutivas que produzem produtos específicos, através das chamadas vias metabólicas.

No início do século XX, as observações de Archibald Garrod de que doenças genéticas são consequências de deficiências enzimáticas específicas, contribuíram para a elucidação das vias metabólicas. Seus estudos sobre a Alcaptonúria tornou o termo erro inato do metabolismo (EIM) popular. A maioria dos EIM pode ser atribuído a um defeito de uma determinada enzima de uma via metabólica, acarretando conseqüentemente acúmulo de substrato, ausência de produto e desvio para outras rotas metabólicas geralmente associadas à formação de substâncias tóxicas (VOET, 2013).

Os EIM são, na sua maioria de herança autossômica recessiva, alguns são ligados ao cromossomo X. Ainda existem as heranças mitocondriais. A incidência individual de cada EIM, de acordo com a literatura, é relatada como rara, entretanto quando analisados em conjunto é de 1:5000 recém-nascidos vivos, sendo assim, o diagnóstico precoce e tratamento adequado, podem reverter sintomas agudos e prevenir danos crônicos

Os lisossomos são necessários para o metabolismo intracelular de várias organelas e compostos de diferentes tamanhos e complexidade. Para este propósito, eles contêm uma variedade de enzimas hidrolíticas que atuam em pH ácido (METABOLICUM,

VADEMEDUM 2007). Estão presentes em todas as células, porém, são mais abundantes nas fagocitárias como macrófagos e leucócitos neutrófilos. Devido esta característica, em alguns grupos de EIM, achados celulares e histopatológicos são encontrados como evidência característica da doença (ex.: célula de Gaucher, anomalia de Alder-Reilly) (CARNEIRO, 2004).

Defeitos genéticos de enzimas lisossomais causam acúmulo de substratos que não são catabolizados ou que são catabolizados de forma incompleta. Isso gera progressiva deterioração da função do sistema das células afetadas (ex.; tecido conjuntivo, cartilagens, ossos, tecido nervoso). A célula, e conseqüentemente o tecido “incham”, causando organomegalia típica e outras características morfo celulares. Isto caracteriza uma doença lisossômica de depósito (DLD). (VOET, 2013).

Em 1939 Alder descreveu uma granulação densa, proeminente e maior que o normal em todos os leucócitos, que podem se assemelhar a granulações tóxicas, mas não possuem relação com infecções e nem é transitória. Em 1941 Reilly descreveu granulócitos semelhantes em pacientes (mas não em todos) com síndrome de Hurler. Outras observações realizadas revelaram que esses granulócitos também podem estar presentes em indivíduos saudáveis. Devido a deficiência enzimática, os glicosaminoglicanos não degradados se acumulam no citoplasma e são evidenciados como granulações ou inclusões metacromáticas circundadas por um espaço claro nos linfócitos e este achado ficou conhecido como anomalia de Alder-Reilly (ALDER 1939, REILLY 1941). (Figura 01).

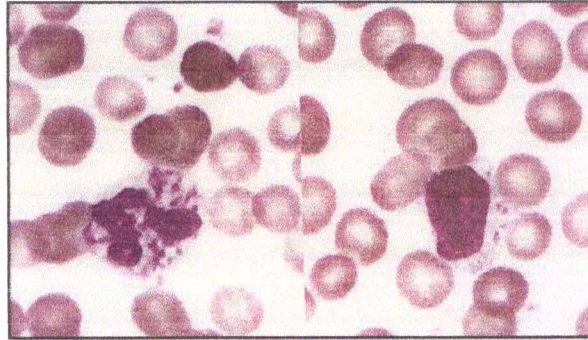


Figura 01: Linfócito e neutrófilo, presença de granulação de Alder-Reilly, (x1.000)

1.2. CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS DOENÇAS DE DEPÓSITO LISOSSOMAL:

As doenças de depósito lisossomal (DLD), de acordo com o substrato acumulado são agrupadas em mucopolissacaridoses, esfingolipidoses, mucolipidoses e glicogenoses (NEUFELD e MUENZER, 2001). Até recentemente sabia-se da existência de onze deficiências enzimáticas para sete tipos e subtipos de MPS. Recentemente, Kowalewski et al. (2012) descreveram um quinto subtipo de MPS III associado à deficiência de N-glucosamine 3-O-sulfatase, representando uma forma única, ainda desconhecida de MPS, que foi denominada MPS III E.

As DLD são individualmente raras na população, com menos de 5 casos em cada 10.000 nascidos vivos, mas em conjunto têm uma incidência de 1 para cada 800 nascidos vivos (BALLABIO, 2009).

As mucopolissacaridoses (MPS) dentre os EIM são DLD causadas devido a deficiência de enzimas lisossomais necessárias para degradação dos glicosaminoglicanos (GAG). Os GAG são açúcares de cadeia muito longa aminoacetilados ou sulfatados ligados a um esqueleto proteico. Desta forma, os GAG se acumulam nos compartimentos lisossomais celulares de tecidos e órgãos importantes, como fígado, baço e sistema nervoso central (METABOLICUM, VADEMECUM, 2007).

1.3. CARACTERÍSTICAS E CLASSIFICAÇÃO DAS MUCOPOLISSACARIDOSES:

As MPS são classificadas de acordo com o defeito enzimático específico. Existem sete tipos de MPS para onze defeitos enzimáticos, isso inclui subclassificações clínicas e bioquímicas em alguns casos. Uma vez acumulado os GAG são excretados na urina e podem ser detectados em testes bioquímicos (WAJNER et al., 2001).

As manifestações clínicas da MPS variam consideravelmente de paciente para paciente. Existem fenótipos clínicos semelhantes para defeitos enzimáticos diferentes, e fenótipos clínicos distintos para o mesmo defeito enzimático. Desta forma, em muitos casos é difícil correlacionar fenótipos clínicos, bioquímicos e moleculares em pacientes com MPS (Pinto, 2005).

As MPS embora heterogênicas, apresentam manifestações clínicas características. Esse é um fator determinante na investigação diagnóstica. A clínica do paciente quando característica, ajuda no direcionamento do estudo enzimático, bioquímico e molecular (Quadro 01).

Quadro 01: Classificação das MPS.

TIPO DE MPS	EPÔNIMO	HERANÇA	GAG NA ACUMLADO NA URINA	DEFICIÊNCIA ENZIMÁTICA	LOCALIZAÇÃO DO GENE
MPS I H	Hurler	HAR	DS + HS	a-L-Iduronidase	4p 16.3
MPS I H/S	Hurler-Scheie	HAR	DS + HS	a-L-Iduronidase	4p 16.3
MPS IS	Scheie	HAR	DS + HS	a-L-Iduronidase	4p 16.3

MPS II (grave)	Hunter	HLX	DS + HS	Iduronato sulfatase	Xq28
MPS II (leve)	Hunter	HLX	DS + HS	Iduronato sulfatase	Xq2
MPS III A	Sanfilippo A	HAR	HS	Heparan-N-sulfatase	17q25.3
MPS III B	Sanfilippo B	HAR	HS	α -N-Acetil-glicosaminidase	17q21
MPS III C	Sanfilippo C	HAR	HS	Acetil-CoA:a-glicosamina acetiltransferase	8p11.1
MPS III D	Sanfilippo D	HAR	HS	N-acetilglicosamina 6-sulfatase	12q14
MPS III E	-	HAR	HS	N-glucosamine 3-O-sulfatase	17q24.2
MPS IV A	Morquio A	HAR	QS	Galactose-6-sulfatase	16q24.3
MPS IV B	Morquio B	HAR	QS	β -galactosidase	3p21.33
MPS VI	Maroteaux-Lamy	HAR	DS	Ariisulfatase B	5q13-q14
MPS VII	Sly	HAR	DS + HS	β -glicuronidase	7q21.11
IX	-----	HAR	CS	Hialuronidase	3p21.1-p21.3

Fonte: Adaptada de Neufeld; Muenzer, 2001. Kowalewski B *et al.* 2012. Legendas: DS: dermatan sulfato; HS: heparan sulfato; QS: queratan sulfato; CS: condroitin sulfato; HAR: herança autossômica recessiva; HLX: Herança ligada ao X; H: Hurler; S: Sheie; HS: Hurler-Sheie.

Este estudo selecionou pacientes diagnosticados no estado do Pará pelo laboratório de Erros Inatos do Metabolismo da Universidade Federal Pará (LEIM-UFPA) com MPS I, II, IV e VI encaminhados pelo serviço especializado do Hospital Betina Ferro Souza (HUBFS-UFPA). Para as MPS I, II e VI existe no serviço o tratamento por terapia de reposição enzimática (TRE). Já existem estudos para TRE para MPS IV.

a) MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO I (MPS I):

A MPS tipo I é caracterizada pela deficiência da enzima alfa-L-iduronidase, responsável pela degradação do GAG dermatan sulfato e heparan sulfato. A MPS tipo I é dividida em três

subformas de acordo com apresentação clínica dos pacientes: Síndrome de Huler (forma grave), Síndrome de Huler-Scheie (forma intermediária) e Síndrome de Scheie (forma atenuada). Os sintomas apresentados estão inseridos em um amplo espectro clínico de caráter progressivo que resultam em sobrevida muito baixa, em função de diagnósticos tardios e/ou ausência de um tratamento específico (NEUFELD, 2001).

b) MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO II (MPS II):

A Síndrome de Hunter ou MPS tipo II é caracterizada pelo defeito enzimático da iduronato-2-sulfatase, responsável pela quebra dos GAGs dermatan sulfato e heparan sulfato. Sua herança, diferente dos demais tipos de MPS, é ligada ao cromossomo X. Os pacientes com esta síndrome apresentam praticamente os mesmos sintomas dos quadros clínicos característicos da MPS I, com exceção da opacificação de córnea e pelo comprometimento progressivo do sistema nervoso central (NEUFELD, 2001).

O gene *IDS* que codifica a enzima estão localizado na região q28 do cromossomo X, possui 9 éxons e 8 íntrons. O gene também possui um pseudogene que corresponde a cópias do gene 2 e 3 e do íntron 7, localizado a 20 kb da região codificante do gene. Mais de 300 mutações já foram identificadas no gene *IDS* (Liné *et al.*, 2006). Dentre as mutações apresentadas no gene *IDS* estão as estruturais, tais como deleções totais e parciais do gene, inserções e mutações no sítio de *splicing*, que representam aproximadamente 20% do total das alterações encontradas no gene. Devido a esta heterogeneidade molecular, a correlação dos fenótipos clínicos, bioquímicos e moleculares em pacientes com MPS II se torna inviável (TIMMS *et al.*, 2007).

c) MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO IV (MPS IV):

A MPS IV também conhecida como Síndrome de Morquio foi descrita em 1929, inicialmente como um nanismo com malformações ósseas. Pacientes com MPS IV podem parecer normais ao nascer, mas as deformidades ósseas do joelho, coluna ou tórax, podem aparecer durante o primeiro ano de vida, quando crianças desenvolvem deformidades em “giba”, claramente visíveis na posição sentada (HUGHES ET AL., 1997).

A MPS IVA é uma DLD autossômica recessiva causada por mutações no gene N-acetilgalactosamina-6-sulfatase ou N - acetilgalactosamina -6- sulfatase (*GALNS*). Esta MPS é caracterizada pelo acúmulo do substrato queratan sulfato nos lisossomos, resultante da baixa atividade da enzima lisossomal. Como resultado do defeito enzimático, o substrato queratan sulfato deixa de ser degradado e acumula-se progressivamente nos lisossomos de vários órgãos, principalmente na córnea e cartilagens, levando a opacidade de córnea e a alterações esqueléticas importantes, sem comprometimento cognitivo (DANGEL, 1998).

c) MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO VI (MPS VI):

A Síndrome de Maroteux-Lamy é caracterizada pela deficiência enzimática da arilsulfatase B, responsável pela degradação do GAG dermatan sulfato. O gene *ARSB* codificador da enzima arilsulfatase B, está localizado na região q13-q14 do cromossomo 5 e possui 8 éxons. Mutações em homozigose desse gene promovem as formas mais graves da doença. As mutações mais frequentes de acordo com a literatura, costumam ocorrer nas regiões dos éxons 4 e 5 (KARAGEORGOS *et al.*, 2007). Vários estudos comprovam que a MPS VI possui uma vasta variabilidade molecular.

1.4. ASPECTOS MORFOLÓGICOS DAS MUCOPOLISSACARIDOSES:

O meio extracelular, especialmente aqueles dos tecidos conectivos, como cartilagens, tendões, a pele e outros, consistem em fibras de elastina e colágeno envoltas em uma matriz gelatinosa, a matriz extracelular. A matriz extracelular é composta principalmente por GAG, heteropolissacarídeos não ramificados de resíduos alternados de ácido urônico e hexosamina. Os GAG mais frequentes são a condroitina-4-sulfato, dermatan-sulfato, queratan-sulfato, heparina, e ácido hialurônico. A solução de GAG tem consistência gelatinosa e mucoide, resultando em sua alta viscosidade e elasticidade (VOET, DONALD 2013).

1.5. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS:

As MPS estão entre as DLD mais frequentes. Estudos relatam uma incidência conjunta para todos os tipos de MPS de 1,9 a 4,5:100.000 recém-nascidos vivos (BAEHNER F et al., 2005; MUENZER, 2004; NELSON J et al., 2003; MEIKLE PJ et al., 1999).

A frequência de MPS é variável em diferentes populações. Uma estimativa realizada para incidência de todos os tipos de MPS no Canadá foi de 1:46.000 nascidos vivos e 1:24.000 nascidos vivos na Irlanda do Norte. No Brasil apenas o Estado do Rio Grande do Sul possui dados sobre a incidência das MPS, sendo 1:74.000 nascidos vivos para todos os tipos de MPS (SCHWARTZ *et al.* 2002)

Castro *et al* (2007), publicaram uma estimativa do perfil epidemiológico das MPS no Estado do Pará entre os anos de 1986 e 2005, apontando uma incidência para MPS I de 1:1.440.000, para MPS II de 1:483.565 meninos nascidos vivos e para MPS VI de 1:1.960.005. Todos os pacientes foram encaminhados ao Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo da UFPA. A incidência de MPS não

classificadas foi de 1:411.430 nascidos vivos. A incidência de todos os tipos foi de 1:192.000 nascidos vivos. Neste período foram diagnosticados no Estado do Pará 22 casos, sendo 03 de MPS I, 05 de MPS II, 04 de MPS VI e 10 casos de MPS não classificada. Dados atualizados até o primeiro semestre de 2018 mostram que foram diagnosticados 15 novos casos de MPS, sendo 02 de MPS I, 06 de MPS II, 02 de MPS III, 01 de MPSIVA e 04 de MPS VI.

1.6. DIAGNÓSTICO CLÍNICO E LABORATORIAL DAS DLD:

O diagnóstico é dado pela suspeita clínica que se confirma pela análise da atividade enzimática. O padrão ouro para diagnóstico das DLD é a dosagem enzimática em leucócito, mas nos últimos anos, devido a necessidade de superar as dificuldades de transporte de amostras biológicas a grandes distâncias, o diagnóstico em papel filtro tem sido implantado com êxito em termo de produtividade de técnica nos laboratórios de referência para este tipo de análise.

Na presença de um teste de triagem anormal ou com padrões sugestivos de uma ou outra doença, haverá a necessidade de confirmação da DLD através da medida da atividade enzimática, utilizando geralmente um substrato artificial com um radical fluorescente, em plasma, leucócitos ou cultura de fibroblastos e, atualmente, em sangue impregnado em papel filtro (WAJNER *et al.*, 2001; CIVALLERO *et al.*, 2006).

Para as MPS, a partir da suspeita clínica, a solicitação médica mais comum é realização da triagem urinária mínima. Por se tratar de uma técnica qualitativa, a triagem urinária mínima é seguida da dosagem de GAG urinários por espectrometria, uma técnica quantitativa (BEYRS *et al.*, 1998).

Embora a dosagem de GAG urinários seja um método muito eficaz para o diagnóstico das MPS, em alguns casos, como na MPS IV, onde a excreção de GAG não é significativa a ponto de ser detectada pelo método de dosagem de GAG, não é o suficiente para se chegar ao diagnóstico definitivo para a doença (BEYRS *et al.*, 1998).

O diagnóstico molecular também é possível. Entretanto, o estudo molecular em alguns casos não revela muitas informações sobre prognóstico da doença, uma vez que as correlações genótipo/fenótipo

não são possíveis devido a variabilidade molecular e fenotípica da doença (SCHWARTZ *et al.*, 2001).

1.7. TRATAMENTO:

A Terapia de Reposição Enzimática (TRE) repõe a enzima ausente através de infusões intravenosas. O Uso da TRE foi na década de 90 e se tornou uma realidade aprovada para uso clínico em 2003 para MPS I, em 2005 para MPS VI, em 2006 para MPS II (KAKKIS ED et al., 2001; GIUGLIANI R et al., 2010) e mais recentemente mostrou-se eficaz também para a MPS IV A (LYSENG-WILLIAMSON, 2014). Estudos verificam a viabilidade da TRE no tratamento das MPS III A, MPS IIIB, MPS II e MPS VII (LYSENG-WILLIAMSON, 2014; GIUGLIANI, R. et al, 2010).

A TRE baseia-se na substituição periódica da enzima deficiente, levando a maior degradação de substratos em tecidos e órgãos, contribuindo para a promoção de uma melhora significativa em algumas características clínicas. No entanto, a influência da TRE em outras manifestações patológicas, como doença progressiva do esqueleto, artropatia, disfunção do sistema nervoso central, o envolvimento cardíaco e deficiência visual, ainda não é bem compreendida (ARORA *et al.*, 2007).

Estudos têm proposto a dosagem de GAG como um parâmetro bioquímico para avaliar a eficácia de protocolos de TRE. Após alguns meses de tratamento, a maioria dos pacientes submetidos a TRE têm mostrado uma melhora de muitos sintomas clínicos, correlacionando com uma diminuição significativa da excreção urinária de GAG (ARORA *et al.* , 2007).

A maior desvantagem da TRE está no fato que a administração intravenosa da enzima não ultrapassa a barreira hemato-encefálica, não revertendo assim danos neurológicos nas MPS (ARORA *et al.*, 2007).

1.8. IMPORTÂNCIA DA AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA NAS MPS:

Na prática clínica, o hemograma é um dos exames mais solicitados, por se tratar de um exame de triagem com um espectro de interpretação e relevância clínica muito amplo. A hematologia laboratorial em toda sua abrangência de técnicas e aplicabilidade no diagnóstico e monitoramento de uma série de doenças deve ser avaliada como uma ferramenta importante no diagnóstico diferencial de pacientes com MPS e no acompanhamento do tratamento de pacientes que realizam a TRE, com a visualização de anomalias hematológicas que na presença da suspeita clínica podem ser úteis.

As primeiras células sanguíneas surgem ainda no período embrionário, precocemente, no mesoderma do saco vitelínico. Posteriormente, fígado e baço funcionam como órgãos hematopoiéticos temporários. Porém, no segundo mês de vida intra-uterina, a clavícula começa sua ossificação, e a medula vermelha começa a se formar. À medida que o restante do esqueleto vai se ossificando e formando medula, este órgão passa a ser o principal e mais importante órgão hematopoiético (JUNQUEIRA, 2004).

No período pós-natal, os elementos figurados do sangue: eritrócitos, granulócitos, linfócitos, monócitos e plaquetas se originam a partir de células-tronco da medula óssea vermelha. Conforme o tipo de linhagem celular formada, a medula realiza processos diferentes para originar, diferenciar e maturar cada tipo celular. Admite-se que, todas as células sanguíneas derivam de um tipo celular da medula óssea, as chamadas células tronco hematopoiéticas. Essas células se diferenciam em duas linhagens: a linhagem mielóide, que dá origem aos eritrócitos, granulócitos, monócitos e plaquetas e a linhagem linfóide, que dá origem aos linfócitos (JUNQUEIRA, 2004).

A hematopoese depende do microambiente adequado e da presença dos fatores de crescimento e de diferenciação celular ou de

colônias (CSF, *colony stimulating factors*). Vários fatos estão vinculados a produção de células sanguíneas, desde o estado nutricional do indivíduo, ao nível de oxigenação que o organismo se encontra até mesmo se há demanda devido a perda de sangue. O período de vida das células sanguíneas é relativamente curto em sua maioria, as hemácias em média 120 dias. As células são produzidas e após desempenharem sua função elas passam por processos de reciclagem, onde são degradadas e em seguida reaproveitadas. Os eritrócitos senescentes são capturados principalmente pelos macrófagos do fígado e do baço onde ocorre o metabolismo do grupamento heme que posteriormente dá origem a substâncias pigmentas como a bilirrubina. O fígado exerce função secundária na produção de eritropoetina (EPO), uma glicoproteína responsável pela formação e produção dos eritrócitos. O processo de morte celular ocorre também principalmente nos capilares sinusóides do baço (GUYTON, 2004).

O hemograma é o exame que consiste na avaliação quantitativa e qualitativa dos componentes sanguíneos figurados e é composto por três análises: O eritrograma que avalia a série vermelha, inclui a contagem de hemácias e hemoglobina circulantes, além de determinar os índices hematimétricos, fundamentais na avaliação de alterações eritrocitárias e anemias. O leucograma que avalia a série branca, ou seja, a contagem dos leucócitos totais e a diferencial leucocitária das células presentes. O plaquetograma que avalia a contagem das plaquetas e índices plaquetários.

Nos últimos anos o hemograma se tornou cada vez mais completo, com o advento da automação em análises clínicas, o emprego de algoritmos cada vez mais sofisticados tornou os analisadores hematológicos uma ferramenta de melhoria na prestação de assistência ao paciente e a comunidade médica. Embora a automação tenha tido salto evolutivo, o exame do esfregaço sanguíneo do sangue periférico na prática laboratorial anda em paralelo. O hemograma e o exame do esfregaço sanguíneo

constituem uma análise indispensável para uma avaliação da hematopoiese, auxiliando no diagnóstico de várias doenças, sejam elas benignas, malignas, hereditárias, adquiridas hematológicas ou não (ROBERT *et al* 2012).

A organização mundial de saúde (OMS) determina valores de referência para hemograma de acordo com a faixa etária e sexo, para contagem de eritrócitos, para a contagem leucocitária, plaquetária e para os valores de índices hematimétricos. A interpretação clínica e laboratorial de um hemograma deve levar em consideração muitos fatores importantes, não somente o sexo e a idade do paciente, mas também seu estado nutricional, estado de consumo metabólico (se é criança em fase de crescimento, gestante, lactante, paciente oncológico em tratamento, etc.) e se o protocolo para a metodologia adotada para a realização do exame, manual ou automatizado, está dentro das normas de qualidade adotadas para este tipo de análise (Ministério da Saúde, 2008).

A análise hematológica de pacientes com MPS em curso de diagnóstico e para aqueles em tratamento, através de técnicas de baixo custo e eficientes, como um hemograma, pode sugerir melhora dos casos em que ocorra hepato ou esplenomegalia com prejuízo para a função hematológica, gerando queda de índices hematimétricos importantes, plaquetopenia e alterações celulares, como as anomalias de Alder-Reilly. Grânulos azurófolos grosseiros em linfócitos, neutrófilos ou monócitos são comumente observados em esfregaços sanguíneos de pacientes com MPS, principalmente dos tipos I, II e VI (Figura 03). Atribui-se o achado ao acúmulo de GAG nos lisossomos que pode ser notado em microscopia óptica convencional em pacientes (BORGES *et al*, 2003).

Devido à falta de prática clínica dos microscopistas em análises clínicas, muitas dessas alterações não são notificadas ao médico, por não serem reconhecidas ou por serem confundidas com granulações tóxicas em neutrófilos maduros reativos (Figura 02).

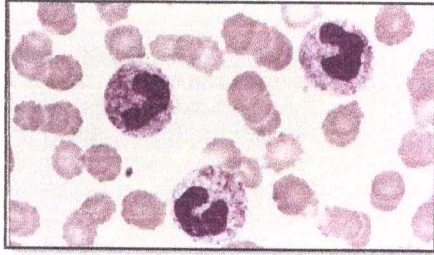


Figura 02: Neutr3filos bastonetes com granula33es (x1.000)

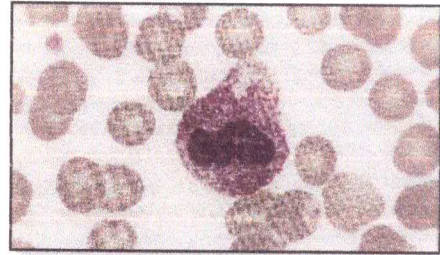


Figura 03: Leuc3cito com granula33o de Alder-Reilly, podem ser vistos tanto em indiv3duos saud3veis quanto em paciente com mucopolissacaridoses (x1.000)

2. JUSTIFICATIVAS:

Em relação à epidemiologia das DLD na Região Norte há escassez de estudos e vários fatores contribuem para esta limitação, dentre estes, pode-se citar a existência de poucos serviços de referência de pesquisa, diagnóstico e tratamento de erros inatos do metabolismo. No estado do Pará, os únicos serviços neste sentido localizam-se na Universidade Federal do Para (UFPA) e no Hemocentro do Pará (HEMOPA).

A TRE tem sido considerada o padrão ouro no que se refere ao tratamento para as MPS. O tratamento pode ser monitorado pela redução na excreção de GAG urinários. Todavia, a dosagem de GAG urinários não corresponde a uma técnica laboratorial comum em laboratório de análises clínicas na rede pública nem na rede privada, por corresponder a uma técnica específica, realizada muitas vezes apenas em laboratórios de referência.

Os ensaios enzimáticos para o diagnóstico de MPS apresentam um elevado custo para sua realização e tem sido feito no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo (LEIM) da UFPA com parceria do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Além dos parâmetros aplicados no diagnóstico e monitoramento da eficácia da TRE, sugerir formas alternativas mais convencionais às práticas de análises clínicas, como a realização de hemograma, pode ser uma outra opção para acompanhar o tratamento desses pacientes.

Considerando que uma análise hematológica de um paciente pode revelar vários aspectos sobre seu estado de saúde, fornecendo uma série de informações relevantes que quando aliadas a outras informações clínicas e laboratoriais consistem em uma ferramenta importante para o acompanhamento desses pacientes ou até auxiliar no diagnóstico diferencial em alguns casos, trabalhos nesta área se fazem necessários para buscar inovações no sentido de avaliar o

tratamento de pacientes com MPS, buscando descentralizar o atendimento laboratorial e avaliar de forma mais ampla o estado clínico do paciente, através de análises hematológicas.

3. OBJETIVOS:

3.1. OBJETIVO GERAL:

Verificar alterações hematológicas e da morfologia celular de pacientes com MPS diagnosticados no estado do Pará.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- a) Analisar eritrograma, leucograma, plaquetograma, *scattergrama* e morfologia celular destes pacientes em comparação com o grupo controle;
- b) Verificar se alterações morfológicas (anomalia de Alder-Reilly, granulações tóxicas, vacuolizações tóxicas, microcitose, macrocitose, hipocromia, presença de macroplaquetas) estão presentes em pacientes independentemente de estar ou não em TRE e do tempo de terapia;
- c) Correlacionar perfis clínicos de acordo com tipo de MPS e os achados hematológicos dos pacientes com DLD quando possível.

4. MATERIAIS E MÉTODOS:

4.1. CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS:

Os pacientes deste estudo são atendidos pelo corpo clínico do Hospital Universitário Bettina Ferro de Souza (HUBFS-UFPA). A amostra foi composta por 7 pacientes: 01 paciente com MPS I, 03 com MPS II, sendo dois destes uma irmandade; 01 com MPS IV A e 02 com MPS VI, sendo estas uma irmandade (quadro 02).

Quadro 02: Identificação dos pacientes do estudo por tipo de MPS. Em destaque os pacientes que compreendem irmandades deste estudo.

N ° PACIENTES ID DOS PACIENTES	TIPO DE MPS
01	MPS I
02	MPS II
03	MPS II
04	MPS II
05	MPS IV A
06	MPS VI
07	MPS VI

Para a caracterização das amostras, o perfil clínico dos pacientes acima foi avaliado através do preenchimento de um questionário elaborado para este fim (anexo 02) no momento da coleta da amostra com o objetivo de caracterizar o estado de saúde dos pacientes. Os dados obtidos estão discriminados no quadro 03.

Quadro 03: Caracterização clínica dos pacientes. Em destaque os pacientes que compreendem irmandades deste estudo.

N ° PACIENTES ID DOS PACINTES	TIPO DE MPS	TEVE INFEÇÕES RECENTES?	TEVE FEBRE RECENTEMENTE?	ESTÁ EM TRE?
01	MPS I	NÃO	NÃO	Não, paciente relata fazer uso de TRE, porém, está a mais de 03 meses sem receber infusão.
02	MPS II	NÃO	NÃO	Paciente diagnosticado, e já em terapia, porém, no momento da sua coleta para análise deste estudo ainda não havia recebido infusão.
03	MPS II	NÃO	NÃO	Não, paciente relata fazer uso de TRE, porém, está a mais de 04 meses sem receber infusão.
04	MPS II	NÃO	NÃO	Não, paciente relata fazer uso de TRE, porém, está a mais de 04 meses sem receber infusão.
05	MPS IV A	NÃO	NÃO	Paciente diagnosticado, e já em terapia, porém, no momento da sua coleta para análise deste estudo ainda não havia recebido infusão.
06	MPS VI	NÃO	NÃO	Sim, paciente relata fazer uso de TRE há mais de 10 anos.
07	MPS VI	NÃO	NÃO	Sim, paciente relata fazer uso de TER há mais de 10 anos.

Para fins de comparação dos resultados quantitativos e qualitativos, foi selecionado um grupo controle composto por 21 indivíduos, selecionados de forma randômica durante a rotina de atendimentos do Laboratório de Patologia Clínica Paulo C. Azevedo, todos de origem ambulatorial. Foi elaborado questionário avaliativo para o grupo controle (anexo 01) onde estão descritos os critérios para seleção da amostra. Os dados dos controles foram obtidos através de consulta ao cadastro no sistema informatizado do laboratório.

O diagnóstico laboratorial dos pacientes deste estudo foi realizado mediante a dosagem da atividade enzimática em leucócito, com ensaios enzimáticos realizados no LEIM/UFPA, conforme protocolos laboratoriais para cada tipo de MPS descritos na literatura.

4.1.1. COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS:

Para a realização dos hemogramas foram coletadas 5 mL de sangue periférico por punção venosa em tubos vacutainer com EDTA. As coletas foram realizadas no Hospital Universitário Bettina Ferro de Souza (HUBFS-UFPA) por técnico do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo da Universidade Federal do Pará (LEIM-UFPA).

As amostras foram devidamente identificadas e encaminhadas ao setor de Hematologia do Laboratório de Patologia Clínica Paulo C. Azevedo (LPA).

Após a realização do hemograma automatizado, foram confeccionadas lâminas de esfregaço sanguíneos, posteriormente coradas e armazenadas para análise. As amostras de sangue total em EDTA foram armazenadas em geladeira de 2 a 8°C por 72 horas e após os procedimentos laboratoriais foram desprezadas em lixo biológico conforme padrão interno do Laboratório de Patologia Clínica Paulo C. Azevedo (LPA) para descarte de material biológico.

4.2. HEMOGRAMA AUTOMATIZADO (BC 6800 MINDRAY):

O hemograma automatizado dos pacientes e do grupo controle foi realizado no equipamento BC 6800 MINRAY. Este equipamento é um analisador hematológico automatizado que utiliza uma combinação de métodos de quantificação e dosagens dos componentes sanguíneos que proporciona uma análise muito mais detalhada e segura dos resultados. O princípio utilizado no analisador é baseado nos métodos de citometria, fluorescência e impedância de

fluxo para a quantificação celular além da colorimetria para determinação de hemoglobina.

Este equipamento é um analisador de baixo custo, rápido e de fácil operação e é operado pelo seu *drive* acoplado a um computador em que todas as suas funções podem ser acessadas e alteradas com muita facilidade e praticidade. Todos os procedimentos diários de controle de qualidade do equipamento foram realizados segundo protocolo de rotina estabelecidos pelo Laboratório Paulo C. Azevedo e pelos órgãos de fiscalização dos serviços de análises clínicas. Este estudo analisou os seguintes parâmetros do hemograma:

5.2.a. Eritrograma com contagem de hemácias, dosagem de hemoglobina, estimativa de hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e RDW.

5.2.b. Plaquetograma com contagem de plaquetas, volume plaquetário médio (VPM) e PDW.

5.2.c. Leucograma com contagem de leucócitos totais e contagem da diferencial leucocitária (neutrófilo segmentado, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos). Analisou também o gráfico de dispersão dessas populações celulares (tamanho x complexidade), o *scattergrama*.

Este estudo também avaliou os alertas eletrônicos emitidos pelo analisador automatizado, os alertas ou *flags* como são conhecidos na prática laboratorial. Eles são emitidos toda vez que é detectada uma alteração no hemograma, seja quantitativa ou qualitativa.

4.3. ANÁLISE MICROSCÓPICA DE ESFREGAÇO SANGUÍNEO:

Todas as amostras de pacientes passaram por análise em hematoscopia. Os esfregaços sanguíneos foram confeccionados a partir do sangue total coletado em EDTA para a realização do hemograma. As amostras foram tratadas com corante May-Grunwald e a visualização microscópica foi realizada por imersão em objetiva de 100x para visualização média de 30 campos microscópicos de acordo com a leucometria do paciente analisado e contagem de 100 leucócitos (W2QUALY LPA, DOCUMENTO 522 2017).

4.4. ANÁLISE DOS DADOS:

Este estudo é descritivo e visa analisar quais são os achados hematológicos quantitativos e morfológicos de pacientes com MPS no estado do Pará. O grupo controle deste estudo foi utilizado para efeito comparativo entre o que se visualiza nos resultados de pacientes e não se visualiza nos resultados do grupo controle.

5. ASPECTOS ÉTICOS:

Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFPA. Este trabalho levou em consideração os princípios éticos básicos das diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos.

A explicação detalhada dos objetivos do estudo foi realizada pelo próprio pesquisador, através de um contato pessoal mediante a entrega do termo de conhecimento livre e esclarecido (TCLE) com elucidação de todas as dúvidas levantadas pelo paciente e/ou responsável. Caso o convite para participação do estudo fosse aceito, o TCLE era assinado e então as coletas de material biológico efetuadas.

O material biológico coletado foi utilizado apenas neste estudo. As amostras foram armazenadas sob responsabilidade do pesquisador até a realização da análise hematológica.

6. RESULTADOS:

6.1. ANÁLISE HEMATOLÓGICA AUTOMATIZADA E HEMATOSCOPIA:

Os resultados obtidos a partir dos hemogramas automatizados realizados de pacientes e do grupo controle foram analisados com base nos valores de referência adotados pelo laboratório de análises clínicas onde os exames foram realizados. Estes resultados levam em consideração o intervalo de referência recomendados pela OMS, considerando a variabilidade clínica característica da população local.

Os resultados dos hemogramas automatizados de pacientes foram conformados em hematoscopia de acordo com a metodologia adotada.

6.1.1. ERITROGRAMA:

Os resultados obtidos para a série vermelha demonstram que os parâmetros avaliados estão dentro do padrão de normalidade dos intervalos de referência adotados neste estudo, para pacientes e para grupo controle. Não houve sinalização de *flag* do analisador automatizado para série vermelha em pacientes e grupo controle (Quadro 04).

Quadro 04: Eritrograma, resultados de pacientes e média de resultados do grupo controle. VR: Valores de referência. DP: desvio padrão.

ERITROGRAMA	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	CONTROLES média	CONTROLES DP	VR
Hemácias 10 ⁶ /mm ³	5,37	4,52	5,02	4,90	4,30	4,45	3,90	5,03	0,51	3,50 - 5,510 ⁶ /mm ³
Hemoglobina g/dL	15,4	13,2	15,3	13,6	13,0	12,9	11,7	13,9	1,31	11,0 - 16,0 g/dL
Hematócrito %	44,5	37,5	42,9	39,3	35,7	37,3	33,4	40,9	3,81	37,0 - 54,0 %
VCM fL	82,9	83,0	85,4	80,2	83,1	83,7	88,5	81,3	4,92	80 - 100 fL
HCM pg	28,7	29,3	30,5	27,8	30,3	28,9	30,0	27,6	1,69	27 - 34 pg
CHCM g/dL	34,6	35,3	35,7	34,7	36,5	34,5	34,9	34,0	0,69	32 - 36 g/dL
RDW %	12,2	12,8	13,0	13,9	12,4	14,0	12,0	12,9	0,87	11 - 16 %

A hematoscopia revelou mesmo padrão descritivo: pacientes com hemácias normocíticas e normocrômicas.

6.1.2. LEUCOGRAMA:

Os resultados obtidos para a série branca demonstram que os parâmetros avaliados estão dentro do padrão de normalidade dos intervalos de referência adotados neste estudo, para pacientes e para grupo controle. O paciente P2 apresentou linfocitose de 65% esperada para sua faixa etária. Houve discreta eosinofilia em P1 e P7. Não houve sinalização de *flag* do analisador automatizado para série branca para os pacientes P3 e P5 e 13 das 21 amostras do grupo controle, ou seja, em média 62% das amostras do grupo controle não apresentou alteração na série branca que gerasse *flag* pelo analisador automatizado (Quadro 05).

A hematoscopia dos pacientes para o leucograma evidenciou os resultados descritos no quadro 06.

Quadro 05: Resultados evidenciados na hematoscopia de pacientes. Em destaque os pacientes que correspondem irmandades neste estudo.

ID PACIENTE	TIPO DE MPS	FLAG OBSERVADO	HEMATOSCOPIA
P1	MPS I	Blastos, eosinofilia	Não evidenciada nenhuma alteração morfofocelar.
P2	MPS II	Blastos, linfocitose	29% de linfócitos com granulação de Alder-Reilly (19/65)
P3	MPS II		Monócitos com vacuolização citoplasmática (7/7).
P4	MPS II	Blastos	28% de linfócitos com granulação de Alder-Reilly (12/42).
P5	MPS IV A		Não evidenciada nenhuma alteração morfofocelar.
P6	MPS VI	Blastos	91% de neutrófilos com granulações de Alder-Reilly (32/35)
P7	MPS VI	Blastos	93% de neutrófilo com granulações de Alder-Reilly (42/45)

Quadro 06: Leucograma, resultados de pacientes e média de resultados do grupo controle. VR: Valores de referência. DP: desvio padrão.

LEUCOGRAMA	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	CONTROLES média	CONTROLES DP	VR
Leucócitos $10^3/\text{mm}^3$	9,11	8,24	6,61	6,92	7,34	5,72	6,0	7,07	1,74	4,0 - 10,0 $10^3/\text{mm}^3$
Neutrófilos %	58	25	55	45	67	35	45	47	11,1	50 - 70 %
Linfócitos %	25	65	32	42	25	55	38	40	11,7	20 - 40 %
Monócitos %	7	5	7	8	7	5	6	6	1,5	3 - 12 %
Eosinófilos %	10	5	4	3	1	4	8	5	2,8	0,5 - 5%
Basófilos %	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0,1	0- 1%

O *scattergrama* dos pacientes MPS que apresentaram *flag* não mostrou alteração sugestiva de dispersão anormal ou plotagem de linhagens celulares anormais. A granulação de Alder-Reilly é evidenciada em leucócitos (Figuras 04, 05, 06 e 07). No entanto, o analisador não alertou para sua presença e não houve *flag* para a presença de grânulos imaturos (granulações tóxicas), nem dispersão do *scattergrama* que sugerisse a presença da granulação (Figuras 09a e 09b)

O *scattergrama* dos pacientes MPS com a presença da granulação de Alder-Reilly nas figuras 05a e 05b são comparados com o *scattergrama*

de uma amostra processada no analisador com granulações tóxicas presentes (Figura 09c).

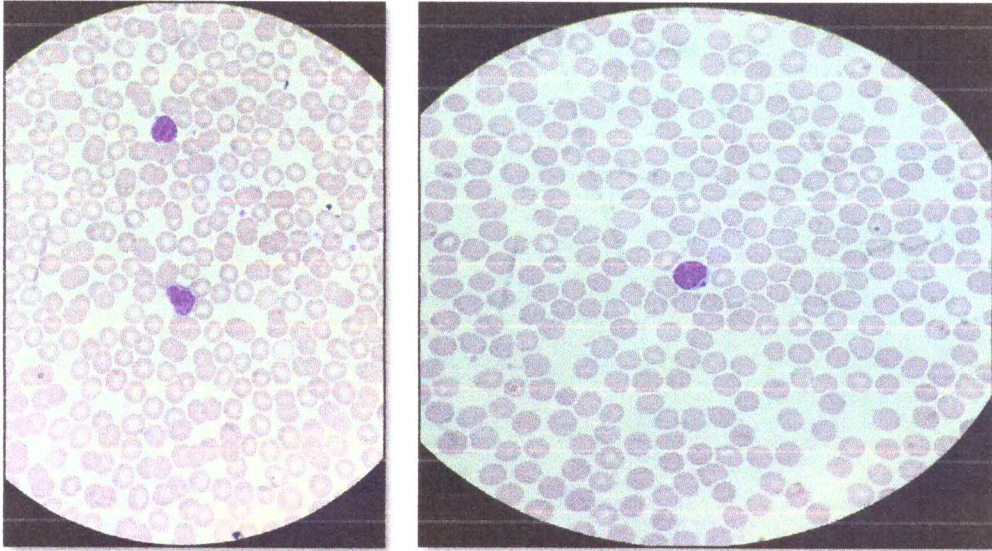


Figura 04 e 05: Paciente P2, MPS II, linfócitos com granulação de Alder-Reilly (x100).

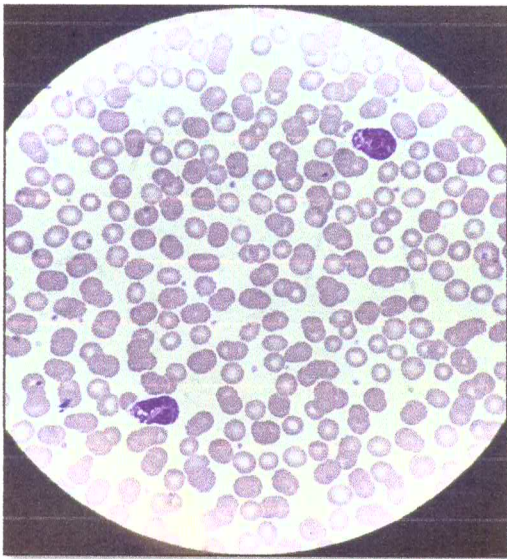


Figura 06: Paciente P6, MPS VI, neutrófilos com granulações de Alder-Reilly (X100).

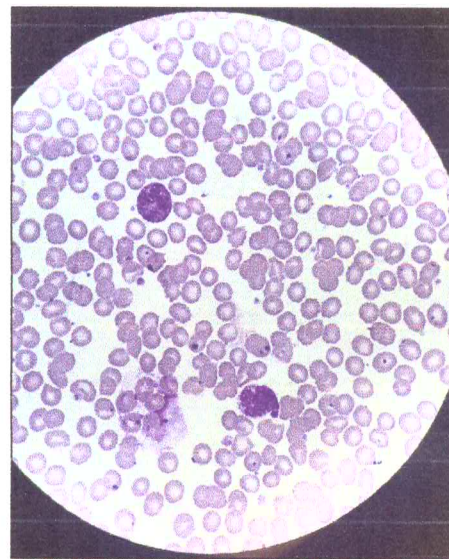


Figura 07: Paciente P7, MPS VI, neutrófilos com granulações de Alder-Reilly (X100).

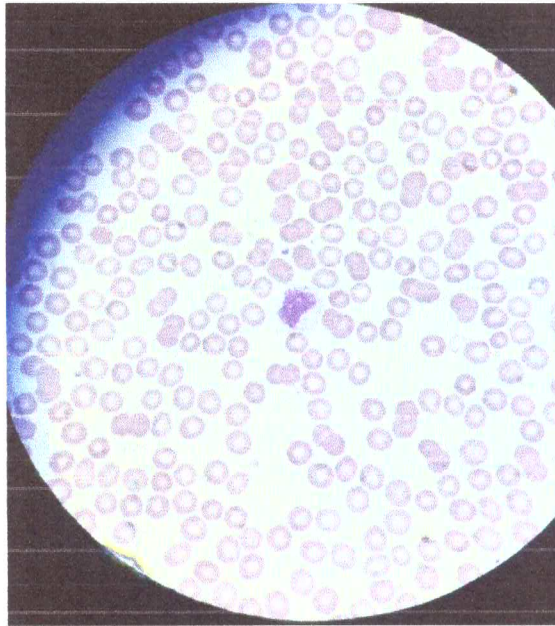


Figura 08: Paciente P3, MPS II, monócito vacuolizado (x100).

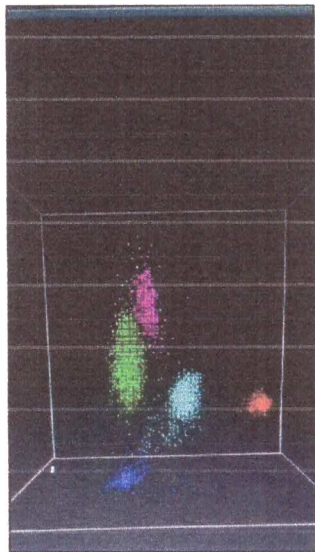


Figura 09a: Scattergrama do paciente P2, 29% de linfócitos com granulação de Alder-Reilly (19/65)

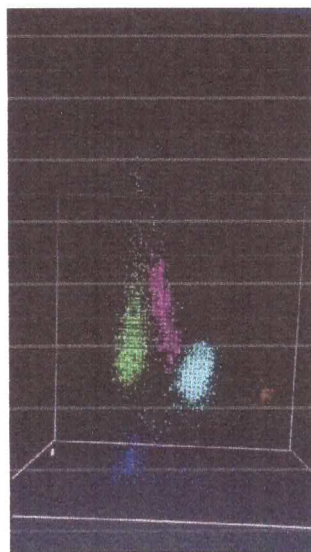


Figura 09b: Scattergrama do paciente P6, 91% de neutrófilos com granulações de Alder-Reilly (32/35)

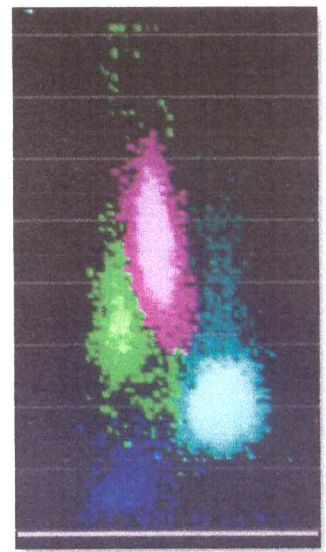


Figura 09c: Scattergrama de paciente com granulação tóxica e desvio à esquerda até mielócitos.

6.1.3. PLAQUETOGRAMA:

Os resultados obtidos para plaquetas demonstram que os parâmetros avaliados estão dentro do padrão de normalidade dos intervalos de referência adotados neste estudo, para pacientes e para grupo controle. Não houve sinalização de *flag* do analisador automatizado para plaquetas para os pacientes e as amostras do grupo controle. A hematoscopia dos pacientes demonstrou presença de macroplaquetas para P1, P5 e P6, mesmo com VPM normais e contagem de plaquetas normais (Quadro 07).

Quadro 07: Plaquetograma, resultados de pacientes e média de resultados do grupo controle. VR: Valores de referência. DP: desvio padrão.

PLAQUETOGRAMA	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	CONTROLES média	CONTROLES DP	VR
Plaquetas 10 ³ /mm ³	280	351	196	178	238	169	205	300	84,0	130-400x10 ³ mm ³
VPM fL	8,6	9,6	12,0	11,3	11,9	11,9	12,2	10,0	1,0	6,5 - 12,0 fL
PDW %	16,0	15,7	16,4	15,4	15,9	16,1	16	15,9	0,8	15 - 17 %

7. DISCUSSÃO:

Para o paciente P1 MPS I, não foram evidenciadas alterações quantitativas, embora tivesse eosinofilia presente (10% de eosinófilos). Ocorreu *flag* para presença de blasto, a hematoscopia não evidenciou nenhuma alteração morfológica o que não confirma o *flag* alertado. Este paciente é tratado com TRE, porém, estava a mais de 02 meses sem receber infusão no momento da coleta para esta análise.

Paciente P2 MPS II, quantitativamente hemograma normal, apresentou linfocitose típica para sua faixa etária. Qualitativamente apresentou *flag* para blastos e linfocitose que em hematoscopia se confirmou presente. Paciente apresentou 29% de linfócitos com presença de granulações de Alder-Reilly dos 65 em 100 células analisadas. Paciente ainda não havia recebido TRE no momento da coleta da amostra para esta análise.

Paciente P3 MPS II, quantitativamente hemograma normal. Qualitativamente não se evidenciou *flag*, hematoscopia relevou presença de vacuolização em todos os monócitos presentes (7%) em 100 células analisadas. Paciente realiza TRE, porém, estava a mais de 04 meses sem receber infusão no momento da coleta para esta análise.

Paciente P4 MPS II, quantitativamente hemograma normal. Qualitativamente apresentou *flag* para blastos. Paciente apresentou 28% de linfócitos com presença de granulações de Alder-Reilly de 45 em 100 células analisadas. Paciente realiza TRE, porém, estava a mais de 04 meses sem receber infusão no momento da coleta para esta análise. Este paciente é membro de uma irmandade anteriormente composta por 03 pacientes masculinos, uma vez que recentemente um dos pacientes evoluiu a óbito.

No paciente P5 MPS IVA não foram evidenciadas alterações quantitativas e qualitativas e também não ocorreu *flag*. A hematoscopia não evidenciou nenhuma alteração morfológica. Paciente não realizava TRE no momento da coleta para esta análise.

Pacientes P6 e P7 apresentaram quantitativamente hemograma normais. Qualitativamente apresentaram *flag* para blastos. Paciente P6 apresentou 91% de neutrófilos com presença de granulações de Alder-Reilly de 35 em 100 células analisadas e paciente P7 apresentou 93% de neutrófilos com presença de granulações de Alder-Reilly de 45 em 100 células analisada. Pacientes realizam TRE há mais de 10 anos.

A literatura cita que pacientes com MPS II e MPS VI apresentam alterações morfológicas em linfócitos e neutrófilo, respectivamente (ROBERT, 2012). A presença da alteração morfológica independe do tipo de MPS e do paciente estar ou não em uso de TRE. Apesar do pequeno tamanho amostral neste estudo é possível inferir, que a presença de alterações morfológicas possivelmente não esteja associada a uma condição clínica específica da MPS II, uma vez que um dos pacientes apresenta a anomalia (P4 MPS II) e outro não (P3 MPS II). Paciente com MPS VI apresentaram granulações de Alder-Reilly, além de fenótipos clínicos semelhantes.

Bhuyan *et al* (2013), relatam neonato do sexo masculino, com 22 dias de idade, que apresentou persistência de icterícia neonatal desde o nascimento. Ao exame clínico apresentava características faciais grosseiras, testa proeminente, língua aumentada, icterícia, hepatoesplenomegalia, deformidades esqueléticas e hérnia inguinal bilateral. Na investigação, o esfregaço de sangue periférico revelou anomalia de Alder-Reilly nos neutrófilos, diferente deste estudo, que que o paciente P4 MPSII apresentou anomalia de Alder-Reilly nos linfócitos, sugerindo mucopolissacaridose. O teste de excreção de

mucopolissacarídeo da urina foi positivo; e um ensaio para glicosaminoglicanos na urina também foi alto, o que confirmou o diagnóstico clínico da síndrome de Hurler (MPSII). Este relato de caso raro destaca a associação de anomalia de Alder-Reilly e hérnia inguinal bilateral na síndrome de Hurler, mesmo em recém-nascidos.

Os analisadores hematológicos devem ser capazes de detectar a sinalização em forma de *flag* ou uma plotagem anormal do *scattergrama* toda vez que uma célula não puder ser classificada devido a presença de granulações na linhagem granulocítica não for típica. Esse sistema de “breque” alerta o analista para a existência de alguma alteração relevante que o analisador não pode distinguir e que deve ser confirmado em hematoscopia.

As granulações de Alder-Reilly quando presentes nos pacientes MPS (1 com MPS II e 2 com MPSVI) não foram confundidas com granulações tóxicas pelo analisador BC 6800. Isto pode evidenciar que para a automação dificilmente é possível ocorrer equívocos na identificação de uma granulação e outra. Microscopicamente as granulações em linfócitos são evidentes, bem formadas, com halo claro circundante e mais basofílica. Em neutrófilo se mostrou grosseira, evidente e mais eosinofílica. Essas características são bem distinguíveis de granulações tóxicas na microscopia.

Em artigo recente, as granulações de Alder-Reilly também foram descritas presentes em células mononucleares de líquido cefalorraquidiano de paciente diagnosticado com MPSII. Evidenciando que este achado celular pode ocorrer tanto em circulação periférica sanguínea como no sistema nervoso central (LUKEFAHR, 2018).

No primeiro caso de MPS VII relatado da Índia, um lactente de 6 meses apresentando regurgitação mitral grave apresentou hepatoesplenomegalia, opacificação da córnea, níveis extremamente

baixos de beta glucuronidase confirmaram o diagnóstico de doença de Sly (Mucopolissacaridose VII), apresentou grânulos de Alder-Reilly nos leucócitos (NAMPOOTHIRI *et al*, 2008). No estado do Pará não houve até o presente momento diagnóstico de pacientes MPSVII.

Além das MPSII, VI e agora também MPSVII, as granulações de Alder-Reilly são citadas como achado hematológico em outro EIM como relatado por Nevsímalová *et al* (1984), deficiência múltipla de sulfatases estudada em 3 irmãos - um par de gêmeos monozigóticos e sua irmã, em que estavam presentes numerosas anormalidades radiográficas, grânulos de coloração metacromática na urina e granulações de Alder-Reilly nos leucócitos do sangue e nos espécimes de medula óssea.

As granulações de Alder-Reilly também são citadas em outras patologias não metabólicas, como na síndrome mielodisplásica, em paciente idoso, com granulações presentes em neutrófilos (GHANDI *et al*, 1996). Também já foram descritas em leucemia (RIZZO *et al*, 1978).

A análise da literatura sugere que o relato da presença das granulações de Alder-Reilly embora também seja descrito em outras patologias metabólicas ou não, ele está mais frequentemente relacionado com as MPS. Isso pode sugerir que a presença dessas granulações é achado hematológico relacionado a MPS, como afirmam as literaturas (ROBERT, 2012).

8. CONCLUSÕES:

Os resultados encontrados neste estudo sugerem que pacientes com MPS apresentam resultados quantitativos de hemograma normais em comparação com o grupo controle e de acordo com os intervalos de referência adotados e qualitativamente podem ser evidenciadas alterações morfológicas que foram sinalizados pelo analisador hematológico automatizado BC 6800 em forma de *flag* para a série branca e não geram dispersão anormal de *scattergrama*.

Paciente com MPS I apresenta hemograma qualitativo e quantitativo normal sem alterações morfológicas independente do uso de TRE.

Paciente MPS II apresenta hemograma qualitativo normal e quantitativo com *flag* para blasto em alguns casos. Pacientes podem apresentar ou não alteração morfológica com presença de granulações de Alder-Reilly em linfócitos em percentual abaixo de 20% destas células em 100 células analisadas. A presença da anomalia independe do uso de TRE.

Paciente com MPS IV A apresenta hemograma qualitativo e quantitativo normal sem alterações morfológicas mesmo sem uso de TRE.

Paciente MPS VI apresentam hemograma qualitativo normal e quantitativo com *flag* para blasto. Pacientes podem apresentar alteração morfológica com presença de granulações de Alder-Reilly em neutrófilo em percentual acima de 90% destas células em 100 células analisadas. A presença da anomalia independe do uso de TRE.

O analisador BC 6800 não plota *scattergrama* anormal para pacientes e grupo controle mesmo se ocorrer *flag* para blasto. O analisador também não confunde as granulações de Alder-Reilly com granulações tóxicas.

Não é possível correlacionar o perfil clínico do paciente pelo tipo de MPS e o estado de saúde clínico deste com a presença da alteração morfológica, as granulações de Alder-Reilly, pois a mesma foi evidenciada em tipos diferente de MPS (II e VI) com pacientes de fenótipos clínicos semelhantes.

Não há na literatura estudos clínicos com as drogas da TRE que elucidem quais os mecanismos celulares pelos quais ocorrem a degradação lisossômica de GAG e quais efeitos citopatológicos ocorrem a nível de lisossomo que possam explicar por que o lisossomo continua com este acúmulo residual que pode ser visto na forma de granulações de Alder-Reilly mesmo após anos de TRE mesmo depois dos efeitos de degradação sistêmico de GAG pelo organismo.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ARORA, R. S.; MERCER, J.; THORNLEY, M.; TYLEE, K.; WRAITH, J. E. Enzyme replacement therapy in 12 patients with MPS II with homozygous p.Leu490Pro mutation. **Journal Metabolism Disease**. 30: 281. 2007.

BORGES, M. F.; TAVARES, F. S.; SILVA, P. C. L.; OLIVEIRA, Z. A. R.; BALLARIN, M. A. S.; GOMES, R. A.; FERREIRA, B. P. **Mucopolissacaridose Tipo VI (Síndrome de Maroteaux-Lamy): Avaliação endócrina de três Casos**. Brazilian Endocrinology metabolic. 47/1:87-94. 2003.

BEESELEY, C. L.; YOUNG, E. P.; VELLODI, A.; WINCHESTER, B. G. Identification of 12 new mutation in a-N-acetylglucosaminidase gene in 14 patients with Sanfilippo syndrome type B (mucopolysaccharidosis type IIIB). **Journal medicine genetics**. 35: 910-914. 1998.

BEYRS, S.; ROSAKLIS, T. BRUMFIELD, L. K.; RANIERE, E.; HOPWOOD, J. Glycosaminoglicanacumulation and excretion in mucopolysaccharidosis: characterization and basics of the diagnostic test for MPS. **The journal of pediatrics**. 65: 222-290. 1998.

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

BHUYAN, P, SINGH B, CHAKRABARTY S, MOHANTY N, AGARWAL M, SATPATHY S. **Alder-Reilly Anomaly in Hurler's Syndrome in a Neonate: A Rare Case Report**. Indian Journal Hematology Blood Transfusion.29(3):184-6. 2013.

CASTRO, N. S. S.; BENTES. E. S.; SOUZA, I. C. N.; GIUGLIANI, R.; SANTANA, L.C.S. Estimativa do perfil epidemiológico das

mucopolissacaridoses no Estado do Pará. **Pediatria moderna**. 53: 23:28. 2007.

COELHO, J. C.; WAJNER, M.; BURIN, M. G.; VARGAS, C. R.; GIUGLIANI, R. Selective screening of 10.000 high-risk brazilian patients for the detection of inborn errors of metabolic. **Eur. Journal pediatrics**. 156: 650: 654. 1997.

DE JONG, J. G.; WEVERS, R. A.; LAARAKKERS, C.; POORTHIUS, B. J. Dimethylmethylene blue-based spectrophotometry of glycosaminoglicans in urine: a rapid screening procedure for mucopolysaccharidoses. **Clinic chemical**. 35: 1472-1477. 1989.

DICK, T. **Práticas de bioquímica**. Porto Alegre-RS, Instituto de pesquisas bioquímicas. 1970.

DEAN, Caroline J.*et al.* Detection of mucopolysaccharidosis type II by measurement of Iduronate-2-Sulfatase in dried blood spots and plasma samples. **Clinical Chemistry: Molecular diagnostics and genetics**,p. 643–649.2006.

DAVID L. NELSON M. COX. **LEHNINGER Princípios de Bioquímica**. 3º Ed. 2009.

E. ROBERT. HUTCHISON, A. RICHARD MACPHERSON. **Diagnósticos clínicos e tratamentos por métodos laboratoriais: Hematologia: exames básicos de sangue e da medula**. Parte IV, cap. 29, pag. 535. ED. Manole. 2012.

E. ROBERT. HUTCHISON, Z. NAIF ABRAHAM JR. **Diagnósticos clínicos e tratamentos por métodos laboratoriais: Hematologia: exames básicos de sangue e da medula**. Parte IV, cap. 32, pag. 637- 644. ED. Manole. 2012.

FEIO, R. H.; SOUZA, I. C. N.; SIQUEIRA, M.L.; SILVA, R.; SANTANA, L.C.S. Mucopolissacaridoses tipo VI e I: três casos em terapia de reposição enzimática no HUBFS. In: **Congresso brasileiro de neurologia**. Belém-PA-Brasil, p-669, 2008.

FROISSART, R.; MILLAT, G.; MATHIEU, M.; BOZON, D.; MAIRE, I. Processing of iduronate-2-sulphatase in human fibroblast. **Journal of biochemical**. 309: 425-430. 1995.

FROISSART, R. MOREIRA, I. S.; MEIRE, I. Mucopolysaccharidosis type II: an update on mutation spectrum. **Acta pediatrica**. 96: 71-77. 2007.

GHANDI MK, HOWARD MR, HAMILTON PJ. **The Alder-Reilly anomaly in association with the myelodysplastic syndrome**. Clin Lab Haematology. 18(1):39-40. 1996.

GIUGLIANI R, LAMPE C, GUFFON N, KETTERIDGE D, LEÃO-TELES E, WRAITH JE, JONES SA, PISCIA-NICHOLS C, LIN P, QUARTEL A, HARMATZ P. **Natural history and galsulfase treatment in mucopolysaccharidosis VI (MPS VI, Maroteaux-Lamy syndrome) -10-year follow-up of patients who previously participated in an MPS VI Survey Study**. Am J Med Genet A. 164 (8):1953-64. 2014

G. MCDONALD, J. PAUL & B. CRUICKSHANK. **Atlas de Hematologia**. 5 Ed. Editora Panamericana. 1998.

GUYTON, A. C. **Tratado de fisiologia médica**. 11 Ed. 2004.

JUNQUEIRA, L. C. CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10 Ed. Editora Guanabara Koogan. 2004.

KARAGEORGOS, L.; BROOKS, D. A.; HARMATZ, P.; KETTERIDGE, D.; POLLARD, A.; MELVILLE, E. L.; PARKINSON-LAWRENCE, E.; CLEMENTS, P. R.; HOPWOOD, J. Mutational analysis of mucopolysaccharidosis type VI patients undergoing a trial of enzyme replamentthepary. **Molecular genetics metabolic.** 90: 64-70. 2007.

LIN, S. P.; CHANG, J. H.; LEE-CHEN, G. J.; LIN, H. Y.; CHUANG, C. K. Detection of Hunter syndrome (mucopolysaccharidoses type II) in taiwaneses: biochemical and linkege studies of the iduronate-e-sulphatase gene detects in MPS II patients and carriers. **Clinicachimica Acta.** 369: 29-43. 2006.

LIMA, N. O. **Monitoramento da excreção de glicosaminoglicanos em pacientes com mucopolissacaridoses submetidos à terapia de reposição enzimática.** 2009,60f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Bacharelado em Biomedicina) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2009.

LORENZI, T. F. **Manual de hematologia. Propedêutica e clínica.** São Paulo: Medsi; 1999.

LEONELI, G. G.; IMPERIAL, R. E.; MARCHI-SALVADOR, D. P.; NAOUM, P. C.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Hemoglobinas anormais e dificuldade diagnostico. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.**2000.

LUKEFAHR AL, PROYTCHIVA M. **Alder-Reilly Anomaly in the Cerebrospinal Fluid of a Child With Hurler Syndrome.** Journal Pediatric Hematology Oncology.40(1):74-75. 2018

MEIKLE, P. J.; HOPWOOD, J.; CLAGUE, A. E. Prevalence of lyossonal storage diseases. **Jama.** 28: 249-254. 1999.

MANUAL, Empresa Shire Human Genetic Therapies. **Elaprase 2 mg/ml concentrado para solução para perfusão Idursulfase**. 2007.

MARTINS, Ana Maria. **Manual de MPS**. 2002.

MCDONALD, G.; PAUL, J.; CRUICKSHANK, B. **Atlas de Hematologia**. 5 Ed. 1998.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de solicitações médicas: quando solicitar um exame**. 3 Ed. 2008.

MONTEIRO, F. G. **Comparação dos resultados dos hemogramas do contador eletrônico ABX PENTRA com a microscopia**. Dissertação apresenta a Faculdade de medicina da UFRS. 2005.

NEVSÍMALOVÁ S, ELLEDER M, SMÍD F, ZEMÁNKOVÁ M. **Multiple sulphatase deficiency in homozygotic twins**. Journal Inherit Metabolic Disease. 7(1):38-40 1984.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 3ª ed. Worth publishers. New York. 2000.

NEUFELD, EF; MEUENZER, J. **Metabolic and Molecular bases of inherited disease**. SCRIVER, C.R. New York. McGraw Hill, 2001.

NAMPOOTHIRI S, KAPPANAYIL M, HIRAN KR, SUNITHA V. **Sly Disease: Mucopolysaccharidosis Type VII**. Indian Pediatric. (10):859-61. 2008.

PINTO, LOUISE LAPAGESSE DE CAMARGO. **Um estudo sobre a história natural da mucopolissacaridose tipo II (Síndrome de Hunter) em pacientes brasileiros**. 2005, 125f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Hospital das Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

RIZZO SC, INVERNIZZI R, BALDUINI CL, RICEVUTI G, FONTANA G. **Acute granulocytic leukemia with Alder-Reilly inclusions.** Haematologica. 63(1):61-6. 1978.

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

SOLYON, E. Indice data for mucopolysacharidoses in Hungary. In: **4 International symposium on mucopolysacharidoses and related diseases program.** Wollongong-Austrália, p.75. 1996.

TIMMS, K. M.; LU, F.; SHEN, Y.; PIERSON, C. A. MUZNY, D. M.; GU, Y. 130 kb of DNA sequence reveals two new genes and a regional duplication distal to the human iduronate-2-sulfatase locus. **Gemone res.** 5: 71-80. 1995.

THOMAS, G. H.; HOWEEL, R. R. Selected screening tests for genetic metabolic diseases. Chicago. **Year book medical publishers.** Pag. 36. 1973.

VIANA, G. M. **Investigação molecular e perfil bioquímico de pacientes com mucopolissacaridoses.** Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, 2010.

VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica.** 4ª ed. Porto Alegre. Artmed. In: cap. 11, p. 359-365. 2013.

VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica.** 4ª ed. Porto Alegre. Artmed. In: cap. 16, p. 559-569. 2013.

VAN ETTEN, R. A. Haematology the education. 2008.

WEBER, B.; BLANCH, L.; CLEMENTS, P. R.; SCOTT, H. S.; HOPWOOD, J. Cloning and expression of the gene involved in Sanfilippo B syndrome (mucopolysaccharidosis III B). **Human molecular genetics**. 5: 771-777. 1996.

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

WEATHERALL, D. J.; CLEGG, J. B. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. **Bull World Health Organ**. 2001

1. ANEXOS:

ANEXO 01



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE ERROS INATOS DO METABOLISMO
RESPONSÁVEL TÉCNICO: Prof.º Dr.º Luiz Carlos Santana da
Silva

QUESTIONÁRIO AVALIATIVO GRUPO CONTROLE

NOME:			PROCEDÊNCIA:
IDADE:	SEXO:	PESO:	ALTURA:
CIDADE:		UF:	
ENDEREÇO:		TEL:	
TEVE FEBRE NOS ÚLTIMOS 05 DIAS? SIM <input type="checkbox"/> NÃO <input type="checkbox"/>			
TEVE ALGUM TIPO DE INFECÇÃO RECENTE? <input type="checkbox"/> SIM, QUAL? _____ NÃO <input type="checkbox"/>			
ESTEVE GRIPADO NOS ULTIMOS 05 DIAS? <input type="checkbox"/> SIM NÃO <input type="checkbox"/>			
POSSUI FERIDAS, QUEIMADURAS OU CORTES QUE SEJAM RECENTES? SIM <input type="checkbox"/> NÃO <input type="checkbox"/>			
FAZ OU ESTÁ FAZENDO USO DE MEDICAÇÃO? <input type="checkbox"/> SIM, QUAL? _____ NÃO <input type="checkbox"/>			

* Os dados acima foram coletados mediante consulta ao banco de dados do sistema informatizado laboratorial *SoftLab* de uso do Laboratório de Patologia Clínica Paulo C. Azevedo.

ANEXO 02



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE ERROS INATOS DO METABOLISMO
RESPONSÁVEL TÉCNICO: Prof.º Dr.º Luiz Carlos Santana da
Silva

QUESTIONÁRIO AVALIATIVO PACIENTES

NOME:		TIPO DE MPS:	
IDADE:	SEXO:	PESO:	ALTURA:
CIDADE:		UF:	
ENDEREÇO:		TEL:	
TEVE FEBRE NOS ÚLTIMOS 05 DIAS?		SIM <input type="checkbox"/>	NÃO <input type="checkbox"/>
TEVE ALGUM TIPO DE INFECÇÃO RECENTE?		<input type="checkbox"/> SIM, QUAL? _____	NÃO <input type="checkbox"/>
ESTEVE GRIPADO NOS ULTIMOS 05 DIAS?		<input type="checkbox"/> SIM	NÃO <input type="checkbox"/>
POSSUI FERIDAS, QUEIMADURAS OU CORTES QUE SEJAM RECENTES?		SIM <input type="checkbox"/>	NÃO <input type="checkbox"/>
FAZ OU ESTÁ FAZENDO USO DE TRE?		<input type="checkbox"/> SIM, HÁ QUANTO TEMPO? _____	<input type="checkbox"/> NÃO

* Os dados acima foram coletados mediante entrevista no momento da coleta das amostras no Hospital Universitário Bettina Ferro de Souza (HUBFS-UFPA) com pacientes e responsáveis.

ANEXO 03

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

INFORMAÇÕES PARA OS PAIS OU RESPONSÁVEIS LEGAIS

TÍTULO DO ESTUDO: “ANÁLISE HEMATOLÓGICA DE PACIENTES COM MUCOPOLISSACARIDOSE (MPS) NO ESTADO DO PARÁ”

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

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

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

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

POR QUE ESTE ESTUDO ESTÁ SENDO REALIZADO? O objetivo desse estudo é avaliar hematologicamente os pacientes com MPS.

COMO E ONDE ESTE ESTUDO SERÁ REALIZADO? Deverão participar deste estudo pacientes do Estado do Pará. Os pacientes selecionados serão solicitados a fornecer informações sobre sua história médica. Se você permitir, estas informações poderão ser obtidas através

do seu médico ou de registros médicos hospitalares. O seguinte procedimento será realizado: **Coleta de sangue** (5 ml) que será analisado no Laboratório Paulo C. Azevedo.

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

QUAIS SÃO OS BENEFÍCIOS DESTE ESTUDO? Como esse diagnóstico, poderá ser possível estabelecer correlação entre eficácia do tratamento e a melhora clínica dos pacientes. Não será permitido retirar os resultados dos exames diretamente no Laboratório Paulo C. Azevedo. Os resultados poderão ser retirados no Laboratório de Erro inato do Metabolismo (LEIM-UFPA).

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

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

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

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

COM QUEM POSSO TIRAR DÚVIDAS? Você está livre para fazer perguntas sobre este estudo. Quando você tiver dúvidas relacionadas a este estudo, poderá falar com: Dr. Luiz Carlos Santana da Silva e/ou com a graduanda Camila dos Santos Brito. Nos contatos:

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

ANEXO 03 (continuação)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PACIENTE)

Eu manifesto meu consentimento com envolvimento do meu(minha) filho(a) no projeto de pesquisa intitulado: **“ANÁLISE HEMATOLÓGICA DE PACIENTES COM MUCOPOLISSACARIDOSE (MPS) NO ESTADO DO PARÁ”**

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

Assinatura do Responsável:

Relação de parentesco com o paciente:

Nome completo do paciente:

Data: __ / __ / __