

Papel filtro como alternativa de coleta de urina na doença de Pompe: desenvolvimento do método e avaliação da estabilidade por CL-EMAR

Hygor M. R. de Souza^{1,2} (PG), **Fernanda B. Scalco**³ (PQ), **Flávia F. de C. Marques**¹ (PQ), **Rafael Garrett**^{2*} (PQ)

¹ LaQFAA, Instituto de Química, Campus Valonguinho, UFF.

² LabMeta-LADETEC, Instituto de Química, UFRJ.

³ LBEIM-LADETEC, Instituto de Química, UFRJ.

*rafael_garrett@iq.ufrj.br

Palavras Chave: *Doença de Pompe, papel filtro, doenças raras, urina, CL-EMAR.*

Introdução

A doença de Pompe é um distúrbio de natureza genética caracterizada pela deficiência da enzima α -glicosidase ácida, responsável pela degradação das ligações α -1,4 e α -1,6 dos polímeros de glicogênio.¹ Essa deficiência resulta no acúmulo do glicogênio dentro dos lisossomos, o que provoca o rompimento dos mesmos seguido pelo seu espalhamento para o citoplasma das fibras musculares. Essa ação estimula a liberação de outras enzimas hidrolases, causando autofagia e morte celular. Apesar de rara (1:40.000 nascidos vivos no mundo), essa anomalia apresenta impacto significativo, podendo levar o indivíduo ao óbito logo nos primeiros anos de vida.^{2,3} Uma das maneiras de diagnóstico da doença é através de análises enzimáticas ou moleculares. No entanto, estas análises têm um alto custo. A cromatografia de oligossacarídeos ou a triagem do tetrassacarídeo de glicose (T4) na urina pode também auxiliar no diagnóstico.² Entretanto, tradicionalmente, essa abordagem exige uma etapa de derivatização da amostra. Por se tratar de uma amostra com alta quantidade de água, susceptível a degradação e crescimento microbiano, o armazenamento e transporte, sob refrigeração, de amostras de urina é um fator crítico.³ Nesse sentido, o trabalho tem como objetivo desenvolver uma técnica de triagem simples através da coleta de urina em papel filtro e análise por cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (CL-EMAR) visando contribuir para o auxílio do diagnóstico clínico e precoce da doença de Pompe.

Resultados e Discussão

Uma amostra de urina padrão (UP), formada pela mistura de urinas de indivíduos sadios foi fortificada com o T4. Essa UP (1mL) foi adicionada em papel filtro (Whatman 903), o qual permaneceu em repouso para secagem em uma caixa de plástico (6x3cm) aberta e à temperatura ambiente do laboratório (22 °C \pm 0,3) por 24h. Após a secagem, foi realizada a extração usando uma mistura de ACN:H₂O 0,1% v/v: NH₄OH (1:1, %v/v) sob agitação por 15min. O extrato foi centrifugado e analisado diretamente por CL-EMAR. O método desenvolvido

foi validado e apresentou faixa linear compreendida entre 1-15 μ g/mL, LQ de 0,03 μ g/mL, repetibilidade de 3,80% (n=9) e recuperação de 90 \pm 1,08% para o T4 (n=9) em três níveis de concentração. A estabilidade dos metabólitos presentes na urina armazenada em papel filtro foi realizada em três temperaturas (4°C, 22°C e 50°C) e em um intervalo de tempo compreendido entre 1 e 30 dias. Os dados de estabilidade do T4 foram verificados por análise de variância *one way* (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Os valores obtidos foram considerados satisfatórios com $p < 0,05$. Já para a estabilidade da urina, foi realizada uma Análise de Componentes Principais (PCA) usando uma matriz de dados $tr+m/z$ vs. área dos picos detectados. Os resultados obtidos permitiram verificar a degradação dos metabólitos na urina coletada em papel a partir do sétimo dia a 4°C e 22°C, e a partir do terceiro dia a 50°C. A estabilidade do T4 seguiu o mesmo perfil de degradação. Dados da literatura mostram que, para a urina *in natura*, a degradação metabólica inicia-se em 24h a 4°C e 22°C.⁵ Logo, a coleta de urina em papel filtro torna-se uma alternativa viável para evitar sua rápida degradação.

Conclusões

Os resultados indicaram que o papel filtro pode ser utilizado como material alternativo de coleta e facilitador no transporte de urinas sem refrigeração. Por ser uma doença rara, poucos centros fazem o diagnóstico no Brasil, o uso do papel filtro pode contribuir para facilitar o transporte e consequentemente o diagnóstico da doença de Pompe, principalmente de pacientes que vivem em locais de difícil acesso.

Agradecimentos

Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 88882.183778/2018.1, JCNE/FAPERJ-E-26/202.707/2018, PPGQ-UFF, LBEIM-IQ/UFRJ, LaQFAA-IQ/UFF.

¹ Muraoka, T. *et.al.*; *Internal Medicine*, **2011**, 50, 2987.

² Chien, Y.H. e Hwu, W.L.; *Biologics*, **2007**, 1, 195.

³ Dasouki, M., *et.al.*; *Neurologic clinics*, **2014**, 32, 751.

⁴ Auray-Blais, C.; Lavoie, P.; Boutin, M. e Abaoui, M.; *Current Protocols in Human Genetics*, **2017**, 93, 1.

⁵ Rotter, M et al. *Metabolomics*, **2017**, 13, 4.