

Heparan sulfato no líquido como biomarcador de gravidade na Mucopolissacaridose

Tipo II: opinião de especialistas brasileiros

Roberto Giugliani¹, Ana Cecília Menezes de Siqueira², Emerson Santana Santos³, Emília
Katiane E. A. Leão⁴, Gerson da Silva Carvalho⁵, Mara Lúcia Schmitz Ferreira Santos⁶,
Salmo Raskin⁷, Ana Maria Martins⁸

¹Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

²Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira, Recife, Pernambuco, Brasil

³Universidade Federal de Sergipe, Lagarto, Brasil

⁴Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Salvador, Bahia

⁵Centro de Referência em Doenças Raras, Hospital de Apoio de Brasília, Brasília, Brasil

⁶Hospital Pequeno Príncipe, Curitiba, Paraná, Brasil

⁷Centro de Aconselhamento e Laboratório Genética, Curitiba, PR, Brasil

⁸Centro de Referência em Erros Inatos do Metabolismo, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brasil

Resumo

A Mucopolissacaridose tipo II (MPS II) é uma doença genética recessiva ligada ao X, causada pela deficiência da enzima iduronato-2-sulfatase. Essa deficiência leva ao acúmulo de heparan sulfato (HS) e dermatan sulfato em diversos tecidos, provocando uma variedade de manifestações clínicas, que podem variar desde rigidez articular e problemas cardíacos, a declínio cognitivo. Os pacientes com MPS II podem apresentar um fenótipo grave, neuronopático, ou fenótipo atenuado, não neuronopático.

Em dezembro de 2023, um painel de especialistas brasileiros analisou evidências científicas para discutir o potencial da quantificação de HS no líquido como um biomarcador para avaliar o comprometimento neurológico em pacientes com MPS II, bem como o potencial da molécula como um parâmetro objetivo de monitoramento terapêutico.

Com base nas evidências científicas discutidas na reunião, os especialistas concluíram que o HS presente no líquido é majoritariamente proveniente do cérebro, que reflete a presença do comprometimento neurológico nos pacientes com MPS II,

com um valor de corte de 4.000 ng/mL (que pode ser ajustado conforme a metodologia empregada) diferenciando os pacientes com fenótipo neuronopático dos pacientes com fenótipo não neuronopático.

Os especialistas recomendaram que a monitorização dos níveis de HS no líquido pode ser um parâmetro objetivo para acompanhar a resposta ao tratamento nas terapias que ultrapassam a barreira hematoencefálica. A periodicidade da avaliação de HS no líquido em pacientes com fenótipo grave que recebem essas terapias deve ser: antes do tratamento, após seis meses do início do tratamento e após dois anos do início do tratamento. Para pacientes com fenótipo atenuado que recebem terapias que atravessam a barreira hematoencefálica, esse esquema de monitorização é também recomendado, lembrando que eventuais interrupções do tratamento devam ser levadas em consideração na programação do momento ideal para monitoramento. Após dois anos, pode-se optar por avaliações neurocognitivas periódicas, ao invés da punção lombar para a medida de HS no líquido. Foi ponderado que, embora exista uma associação entre a diminuição dos níveis de HS e melhoria clínica, não há correlação linear entre níveis de HS e desfechos clínicos específicos.

Os especialistas enfatizam a importância de uma metodologia padronizada na dosagem de HS para uma interpretação consistente dos resultados e reconhecem a necessidade de mais estudos para entender a relação entre os níveis de HS no líquido com os níveis em soro, plasma e urina e a patogênese da doença neurológica da MPS II. Por fim, os autores reforçam a importância da avaliação da adesão ao tratamento, incluindo suas interrupções, para melhor apreciação do impacto do tratamento no mundo real e para determinar o momento ideal de coleta do líquido para monitoramento terapêutico.

Introdução

A Mucopolissacaridose tipo II (MPS II), também conhecida como Síndrome de Hunter, é uma doença genética de depósito lisossômico, de herança recessiva ligada ao X, causada pela deficiência da enzima iduronato-2-sulfatase. A deficiência de atividade enzimática, causada por variantes patogênicas no gene *IDS*, resulta em um acúmulo multissistêmico de glicosaminoglicanos (GAGs), principalmente heparan sulfato (HS) e dermatan sulfato, o que afeta diversos processos celulares e ativa diferentes cascatas

patogênicas, levando ao desenvolvimento de uma ampla gama de manifestações clínicas.^{1,2}

Como na maioria das MPS, os sinais e sintomas da MPS II incluem fácies infiltrada, hepatoesplenomegalia, hérnia umbilical, rigidez articular, obstrução das vias aéreas superiores e disfunções cardíacas. Além dos sintomas viscerais e esqueléticos, muitos pacientes com MPS II apresentam envolvimento neurológico significativo. Os fenótipos são classificados como grave (forma neuronopática, de progressão mais rápida) ou atenuado (forma não neuronopática, de progressão mais lenta) e estima-se que aproximadamente 2/3 da população com MPS II apresente o fenótipo grave. Pacientes com o fenótipo grave, geralmente, apresentam declínio cognitivo a partir dos 3-4 anos de idade; hoje reconhece-se que os pacientes com fenótipo atenuado, embora não tenham o declínio cognitivo acentuado observado na forma grave, podem apresentar alguma manifestação neurológica em fases mais avançadas da doença.^{1,3}

A deterioração progressiva do SNC não é um processo comum em todas as MPS; interessante, alterações neurocomportamentais e declínio cognitivo são observadas apenas em pacientes com MPS em que há acúmulo multissistêmico de HS (MPS I, II, III e VII).^{3,4}

O HS é expresso de maneira ubíqua, está presente na superfície celular, membrana basal e matriz extracelular de todos os tecidos de mamíferos. Além de ser um importante componente estrutural, o HS também está envolvido na regulação de diversos processos celulares, como migração celular, regulação da resposta inflamatória, sinalização mediada por receptores, fagocitose, morfogênese e organogênese.⁴⁻⁶ No SNC, tem papel fundamental no desenvolvimento neuronal, pois é um componente essencial da membrana basal vascular no cérebro.^{7,8}

Pacientes com MPS I, II, IIIA, IIIC e IIID apresentam maior quantidade de HS no córtex cerebral em comparação a controles pareados por idade, conforme observado em um estudo *post mortem*.⁹ Além disso, evidências mostram que o acúmulo de HS não é restrito aos lisossomos, sendo a molécula encontrada em diversos locais no espaço intra e extracelular no SNC, prejudicando a função neurológica de pacientes com MPS I, II, III, e VII.¹⁰

Assim, avaliar a quantidade de HS no tecido cerebral de pacientes com MPS poderia trazer informações relevantes para o tratamento, prognóstico e o

monitoramento terapêutico. Entretanto, para isso seria necessária a realização de um procedimento altamente invasivo e com alto risco de infecção (biopsia cerebral), o que torna esta avaliação inviável na prática.

Em modelos animais de MPS II, foi observada uma correlação forte entre as concentrações de HS no cérebro e no líquido cefalorraquidiano (ou líquido), sugerindo que a avaliação de HS no líquido possa ser um indicativo confiável da concentração de HS no cérebro.^{11,12} No mesmo sentido, já foi demonstrado que pacientes com MPS II apresentam concentrações maiores de HS no líquido do que indivíduos sem MPS.^{13,14}

Além disso, os níveis de HS no líquido são mais altos em pacientes com MPS II com fenótipo grave, em comparação àqueles com fenótipo atenuado, com uma pequena sobreposição, sugerindo que a quantificação de HS possa ser um preditor de gravidade da doença, proporcionando um prognóstico mais preciso.¹⁵

Desta forma, uma alternativa possível à análise de HS no cérebro de pacientes com MPS II é a análise de HS no líquido, um meio acessível para investigar alterações bioquímicas no SNC, pois está em constante troca com o fluido intersticial do cérebro.¹⁶

Considerando as evidências apresentadas e a necessidade de ferramentas adicionais para avaliar a gravidade e acompanhar o tratamento de pacientes com MPS II, um painel de oito especialistas brasileiros reuniu-se em dezembro de 2023, de forma virtual, para discutir os resultados disponíveis na literatura e formular um consenso sobre o potencial do HS no líquido como biomarcador de gravidade na MPS II. Este *white paper* reflete a análise rigorosa realizada pelo painel de especialistas e o consenso obtido, com o objetivo de fornecer recomendações claras e baseadas em evidências para a comunidade médica a respeito da dosagem de HS no líquido como biomarcador de gravidade na MPS II.

Metodologia

Este artigo foi desenvolvido por um painel de oito reconhecidos especialistas brasileiros no campo das mucopolissacaridoses (MPS II), com o enfoque específico na avaliação do HS no líquido como um biomarcador potencial para a gravidade da MPS II.

A reunião do painel foi realizada virtualmente em dezembro de 2023 e seguiu um protocolo estruturado que incluiu as seguintes etapas:

(i) Revisão de literatura: antes do encontro virtual, foi realizada uma revisão da literatura, incluindo artigos científicos, estudos clínicos e experimentais relevantes à MPS II e ao biomarcador em questão. Esta revisão foi destinada a fornecer uma base sólida de evidências para as discussões subsequentes.

(ii) Formulação de perguntas: foram elaboradas sete perguntas-chave para direcionar a discussão do painel. Estas perguntas foram desenhadas para abranger diferentes aspectos do uso de HS no líquido como biomarcador de gravidade na MPS II e monitoramento terapêutico.

(iii) Discussão virtual: durante o encontro virtual, cada pergunta foi apresentada e seguida por uma discussão aprofundada. Os painelistas compartilharam suas perspectivas baseadas não apenas na literatura existente, mas também na sua vasta experiência clínica e prática no manejo de pacientes com MPS II, bem como na coleta e análise de líquido.

(iv) Formulação de afirmações: após a discussão de cada pergunta, foi formulada uma afirmação consensual refletindo a posição do painel.

(v) Votação e consenso: as afirmações foram submetidas a uma votação entre os especialistas, indicando sua concordância ou não.

Opinião dos especialistas brasileiros

1. O HS encontrado no líquido de pacientes com MPS II é majoritariamente proveniente do tecido cerebral.

Houve consenso entre os especialistas de que, baseado nas evidências de modelos animais^{11,12}, estudos clínicos^{13,15,17} e avaliação de tecido cerebral de pacientes *post mortem*⁹, o HS encontrado no líquido é majoritariamente proveniente do tecido cerebral. Além disso, a molécula de HS tem aproximadamente 75 kDa, o que impede sua passagem pela barreira hematoencefálica ou pelo plexo coróide, corroborando a hipótese que o HS presente no líquido é proveniente do SNC (a maior molécula já descrita a atravessar a barreira hematoencefálica, o CINC1, tem aproximadamente 7,8 kDa).¹⁸

Dessa maneira, os especialistas concordam que a avaliação de HS no líquido pode ser um indicativo confiável da concentração de HS no cérebro de pacientes com MPS II.

2. Os níveis de HS no líquido são um bom biomarcador para avaliar a gravidade do comprometimento neurológico na MPS II.

Como discutido no tópico anterior, os autores consideram que a dosagem de HS no líquido reflete bem as concentrações dessa molécula no SNC. O fato de o HS estar envolvido na fisiopatologia de todas as MPS que apresentam comprometimento neurológico^{3,4} foi citado como forte evidência que o acúmulo da molécula no SNC está relacionado aos sintomas neurológicos observados na MPS II.

Adicionalmente, consideram que o estudo publicado em 2021¹⁵ mostra claramente uma diferença entre os níveis de HS em pacientes com fenótipo grave e atenuado, com pouca sobreposição. Portanto, todos concordam que há uma forte correlação entre a concentração de HS no líquido e a gravidade do comprometimento neurológico em pacientes com MPS II.

3. O valor de corte de 4.000 ng/mL de HS no líquido é adequado para diferenciar pacientes com as formas neuronopática e não neuronopática da MPS II, quando utilizado o mesmo método de análise laboratorial dos estudos clínicos.

Houve consenso entre os especialistas que o valor de corte de 4.000 ng/mL de HS no líquido é um parâmetro com sensibilidade / especificidade suficientes para distinguir entre os fenótipos neuronopáticos e atenuados da MPS II, que é fundamental para o manejo clínico e terapêutico dos pacientes. Contudo, concluíram que há necessidade de mais dados para compreender o cenário dos pacientes com fenótipo intermediário. Foi enfatizado, porém, que este valor pode variar de acordo com a metodologia empregada, que deve ser levada em consideração na análise dos dados.^{13,15,17,19}

4. O acompanhamento dos níveis de HS no líquido é um parâmetro objetivo para monitoramento terapêutico de pacientes com MPS II em uso de medicamentos que atravessam a barreira hematoencefálica.

Embora a avaliação clínica detalhada e a realização de ressonância nuclear magnética (RNM) sejam reconhecidas como ferramentas valiosas no acompanhamento de pacientes com MPS II, a emergência de novas terapias capazes de transpor a barreira hematoencefálica destaca a quantificação de HS no líquido como um biomarcador de grande potencial no monitoramento terapêutico.

Os autores reconhecem a relevância deste biomarcador, considerando aspectos como: (i) a dificuldade prática de realizar RNM em muitos centros devido à falta de equipamentos ou à ausência de profissionais capacitados para a análise de imagens em pacientes com MPS; (ii) as limitações para a aplicação de testes cognitivos e comportamentais, relacionados à própria doença e à ausência de testes validados para MPS; e (iii) a impossibilidade de acessar diretamente o SNC para medir o HS no tecido cerebral.

A redução significativa dos níveis de HS no líquido após tratamento de pacientes com MPS II com enzimas capazes de atravessar a barreira hematoencefálica, como pabinafuspe alfa, demonstrada em estudos clínicos^{13,15,17} é considerada uma evidência robusta para embasar a avaliação de HS no líquido como um parâmetro objetivo de monitoramento terapêutico, refletindo diretamente o impacto do tratamento sobre a patogênese da doença no SNC.

5. Em pacientes com o fenótipo grave da MPS II, a avaliação dos níveis de HS no líquido deve ser realizada antes do início do tratamento, após seis meses e após dois anos de tratamento. Se houver interrupção do tratamento ou baixa adesão no período, deve-se avaliar os resultados com cautela ou rever o momento de coleta da amostra.

A definição da periodicidade ideal para avaliação do HS no líquido foi um tema de amplo debate, em que os especialistas consideraram diversos fatores: (i) a cinética de redução do HS após o início do tratamento; (ii) a variabilidade individual na resposta ao tratamento; (iii) a estabilidade dos níveis de HS durante o tratamento; (iv) adesão do paciente ao tratamento e ocorrência de interrupções; (v) a logística associada à realização do procedimento de coleta do líquido.

Baseados nos estudos clínicos e na experiência prática de cada especialista, os autores propuseram de maneira unânime que as avaliações de HS no líquido devem ser realizadas antes do início do tratamento com medicamentos que atravessam a barreira hematoencefálica, após seis meses e após dois anos do tratamento. Se houver interrupção do tratamento (maior que três semanas) ou baixa adesão no período (< 80%), o médico deve avaliar os resultados com cautela ou rever o momento de coleta da amostra, pois estes fatores podem ter impacto negativo na redução do HS.

Ainda não há dados de HS no líquido após dois anos de tratamento; portanto, os autores entendem que será necessário avaliar futuramente a necessidade de realização do exame após esse período, ou se o paciente poderá ser acompanhado clinicamente (principalmente se os valores de HS tiverem sido mantidos estáveis entre seis meses e dois anos de tratamento).

6. Em pacientes com o fenótipo atenuado de MPS II, a avaliação dos níveis de HS no líquido deve ser realizada antes do início do tratamento e após seis meses. Após dois anos de tratamento, pode-se realizar a quantificação de HS no líquido e/ou avaliação neurocognitiva.

Apesar de os pacientes com fenótipo atenuado da MPS II geralmente não apresentarem (ou apresentarem pouco) comprometimento cognitivo, os autores consideram a redução do HS no líquido um indicativo relevante de melhora da doença, independente da gravidade, pois o acúmulo de GAGs representa a alteração fisiopatológica primária nas MPS - em indivíduos sem MPS, as concentrações de HS no líquido são muito baixas ou indetectáveis.¹⁴

Dessa forma, consideram que, mesmo em pacientes com fenótipo atenuado de MPS II, é recomendável avaliar as concentrações de HS no líquido quando em tratamento com medicamentos que atravessam a barreira hematoencefálica, com o mesmo esquema utilizado para a forma grave. Para chegar ao consenso, os autores consideraram os mesmos fatores descritos no tópico anterior.

Em termos de pesquisa, o ideal seria manter o protocolo para comparar os resultados nos fenótipos grave e atenuado, porém, no mundo real, pode haver maior dificuldade de aceitação por parte da família para realização da coleta de líquido nos pacientes com fenótipo atenuado, além da dificuldade de acesso ao procedimento em alguns serviços. Assim, os especialistas concordaram que, após dois anos de tratamento, o médico poderá optar entre realizar a quantificação de HS no líquido e/ou realizar avaliações neurocognitivas. Enfatizam que as avaliações neurocognitivas devem ser realizadas por um profissional experientado e incluir aplicação de testes psicométricos.

7. *Há uma associação entre a redução dos níveis de HS no líquido e melhora clínica dos sinais e sintomas em pacientes com MPS II. Entretanto, não é possível estabelecer uma correlação direta entre os valores de HS e desfechos clínicos específicos.*

Houve consenso entre os autores que, em pacientes com MPS II, há uma clara associação entre a redução dos níveis de HS no líquido e a melhora de sinais e sintomas - inclusive os não neurológicos - conforme demonstrado nos estudos clínicos com medicamentos que atravessam a barreira hematoencefálica^{13,15,17}, além da observação dos pacientes na prática diária dos especialistas. Porém, até hoje, não foi possível identificar uma correlação direta entre níveis específicos de HS no líquido e o tipo de manifestação clínica observada, ou o desfecho clínico específico esperado de acordo com a redução de determinada quantidade de HS após o tratamento.

Considerações finais

Os especialistas brasileiros consideram o HS no líquido um biomarcador valioso para avaliação da gravidade neurológica em pacientes com MPS II, bem como para monitoramento do tratamento destes pacientes com medicamentos que atravessam a barreira hematoencefálica, apesar dos desafios associados à coleta e análise do líquido. Entretanto, é essencial garantir que a metodologia de dosagem do HS seja padronizada para que a interpretação dos resultados possibilite a diferenciação adequada entre pacientes com fenótipo graves e atenuado, de acordo com o valor de corte estabelecido.

Estudos futuros devem trazer informações relevantes sobre a presença ou ausência de correlação entre os níveis de HS no líquido e no soro, plasma e urina, para uma melhor compreensão sobre o mecanismo de transporte do HS do cérebro para o líquido e o papel dos níveis elevados de HS na fisiopatologia da doença neurológica na MPS II.

É fundamental considerar o impacto de interrupções no tratamento e adesão do paciente ao analisar resultados do mundo real, além de observar estes fatores para definir o momento mais adequado para coleta do líquido para monitoramento terapêutico.

Em pacientes com fenótipo atenuado, os especialistas consideram que após dois anos de tratamento pode-se substituir a dosagem de HS no líquido por avaliações neurocognitivas, se houver dificuldade para coleta e/ou análise do líquido. Porém,

ressaltam a necessidade da realização destes testes por profissionais experientes e capacitados.

Referências

1. Neufeld EF, Muenzer J. The mucopolysaccharidoses. In: Scriver C, Beaudet A, Sly WS, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw Hill; 2001:3421-3452.
2. Fecarotta S, Tarallo A, Damiano C, Minopoli N, Parenti G. Pathogenesis of Mucopolysaccharidoses, an Update. *Int J Mol Sci*. 2020;21(7). doi:10.3390/ijms21072515
3. Giugliani R, Vairo F, Kubaski F, et al. Neurological manifestations of lysosomal disorders and emerging therapies targeting the CNS. *Lancet Child Adolesc Heal*. 2018;2(1):56-68. doi:10.1016/S2352-4642(17)30087-1
4. De Pasquale V, Pavone LM. Heparan sulfate proteoglycans: The sweet side of development turns sour in mucopolysaccharidoses. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2019;1865(11):165539. doi:10.1016/J.BBADIS.2019.165539
5. Pichert A, Schlorke D, Franz S, Arnhold J. Functional aspects of the interaction between interleukin-8 and sulfated glycosaminoglycans. *Biomatter*. 2012;2(3):142-148. doi:10.4161/BIOM.21316
6. Crijns H, Vanheule V, Proost P. Targeting Chemokine—Glycosaminoglycan Interactions to Inhibit Inflammation. *Front Immunol*. 2020;11:516467. doi:10.3389/FIMMU.2020.00483/BIBTEX
7. Bosch ME, Kielian T. Neuroinflammatory paradigms in lysosomal storage diseases. *Front Neurosci*. 2015;9(OCT). doi:10.3389/FNINS.2015.00417
8. Thomsen MS, Routhe LJ, Moos T. The vascular basement membrane in the healthy and pathological brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2017;37(10):3300-3317. doi:10.1177/0271678X17722436
9. Viana GM, Priestman DA, Platt FM, Khan S, Tomatsu S, Pshezhetsky A V. Brain Pathology in Mucopolysaccharidoses (MPS) Patients with Neurological Forms. *J Clin Med*. 2020;9(2). doi:10.3390/jcm9020396
10. Bigger BW, Begley DJ, Virgintino D, Pshezhetsky A V. Anatomical changes and pathophysiology of the brain in mucopolysaccharidosis disorders. *Mol Genet Metab*. Published online 2018. doi:10.1016/j.ymgme.2018.08.003
11. Morimoto H, Kida S, Yoden E, et al. Clearance of heparan sulfate in the brain prevents neurodegeneration and neurocognitive impairment in MPS II mice. *Mol Ther*. 2021;29(5):1853-1861. doi:10.1016/j.ymthe.2021.01.027
12. Tanaka N, Kida S, Kinoshita M, et al. Evaluation of cerebrospinal fluid heparan sulfate as a biomarker of neuropathology in a murine model of mucopolysaccharidosis type II using high-sensitivity LC/MS/MS. *Mol Genet Metab*. 2018;125(1-2):53-58. doi:10.1016/J.YMGME.2018.07.013
13. Okuyama T, Eto Y, Sakai N, et al. Iduronate-2-Sulfatase with Anti-human Transferrin Receptor Antibody for Neuropathic Mucopolysaccharidosis II: A Phase 1/2 Trial. *Mol Ther*. 2019;27(2):456-464. doi:10.1016/j.ymthe.2018.12.005

14. Zhang H, Young SP, Auray-Blais C, Orchard PJ, Tolar J, Millington DS. Analysis of glycosaminoglycans in cerebrospinal fluid from patients with mucopolysaccharidoses by isotope-dilution ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem*. 2011;57(7):1005-1012. doi:10.1373/clinchem.2010.161141
15. Okuyama T, Eto Y, Sakai N, et al. A Phase 2/3 Trial of Pabinafusp Alfa, IDS Fused with Anti-Human Transferrin Receptor Antibody, Targeting Neurodegeneration in MPS-II. *Mol Ther*. 2021;29(2):671-679. doi:10.1016/j.ymthe.2020.09.039
16. Constantopoulos G, Dekaban AS. Acid mucopolysaccharides in the cerebrospinal fluid of patients with Hunter–Hurler’s syndrome. *J Neurochem*. 1970;17(1):117-120. doi:10.1111/J.1471-4159.1970.TB00508.X
17. Giugliani R, Martins AM, So S, et al. Iduronate-2-sulfatase fused with anti-hTfR antibody, pabinafusp alfa, for MPS-II: A phase 2 trial in Brazil. *Mol Ther*. 2021;29(7):2378-2386. doi:10.1016/j.ymthe.2021.03.019
18. Pan W, Kastin AJ. Changing the chemokine gradient: CINC1 crosses the blood-brain barrier. *J Neuroimmunol*. 2001;115(1-2):64-70. doi:10.1016/s0165-5728(01)00256-9
19. Wang J, Bhalla A, Ullman JC, et al. High-Throughput Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Quantification of Glycosaminoglycans as Biomarkers of Mucopolysaccharidosis II. *Int J Mol Sci*. 2020;21(15). doi:10.3390/ijms21155449