

## VALORES DE REFERENCIA DE B-GLUCOSIDASA Y QUITOTRIOSIDASA EN GOTAS DE SANGRE SECA DE LACTANTES VENEZOLANOS.

Luis E. Miranda (1), José A. Chacín (2), Carlos J. Chávez (3),  
Karile Méndez (4), Ana Bracho (2), Ernesto Solís Añez (5),  
Fernanda Bender (6), Maira Graeft Burin (7), Roberto Giugliani (8)

Recibido: 6/6/2016  
Aceptado: 2/11/2016

### RESUMEN

La enfermedad de Gaucher es un trastorno de herencia autosómica recesiva y la enfermedad de depósito lisosomal más frecuente causada por deficiencia de la actividad enzimática de la  $\beta$ -Glucosidasa. **Objetivo:** establecer valores de referencia de actividad enzimática lisosomal de  $\beta$ -glucosidasa y quitotriosidasa en lactantes en población Venezolana. **Método:** Se realizó un estudio prospectivo y transversal en 98 lactantes sanos con edades comprendidas entre 1 mes y 24 meses, de ambos sexos (48 femeninos y 50 masculinos). La actividad enzimática de  $\beta$ -glucosidasa y quitotriosidasa fue determinada en gotas de sangre seca (siglas en inglés, DBS) siguiendo el protocolo propuesto por Chamoles y col. El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa estadístico SPSS Statistics 17.0 para Windows. **Resultados:** El rango de actividad enzimática para la  $\beta$ -Glucosidasa obtenido en esta investigación fue 2,3 – 12 nmol/ml/h, con una media de  $6,7 \pm 2,5$  y para la Quitotriosidasa 0 - 44,2 nmol/ml/h con una media de  $18,4 \pm 10,4$  nmol/ml/h, utilizando discos de papel de filtro de 3mm de diámetro con sangre seca (aproximadamente 3,6  $\mu$ l de sangre). **Conclusión:** Los valores de referencia de actividad enzimática lisosomal en DBS para  $\beta$ -glucosidasa y quitotriosidasa son establecidos por vez primera en lactantes sanos venezolanos; no obstante, estos resultados difieren con los reportados en estudios internacionales, recomendándose la determinación de valores de referencias autóctonos en diferentes grupos etarios.

**Palabras claves:** Enfermedad de Gaucher,  $\beta$ -glucosidasa, quitotriosidasa, gotas de sangre seca (DBS), valores de referencia, lactantes venezolanos.

### Reference Values for $\beta$ -glucosidase and chitotriosidase using dried blood spots in Venezuelan infants

### SUMMARY.

Gaucher's Disease is an autosomal recessive disorder and the most common lysosomal storage disease caused by deficiency of  $\beta$ -glucosidase enzyme activity. **Objective:** to establish reference values for lysosomal enzyme activity of  $\beta$ -glucosidase and chitotriosidase in Venezuelan infants. **Methods:** A prospective cross-sectional study was conducted in 98 healthy infants with ages ranging from 1 month to 24 months (48 females and 50 males). Enzymatic activity of  $\beta$ -glucosidase and chitotriosidase were determined in dried blood spots (DBS) following the protocol by Chamoles et al. Statistical analysis of data was performed with software SPSS 17.0 for Windows Statistics. **Results:** The range of enzymatic activity for  $\beta$ -glucosidase was 2.3 to 12 nmol/ml/h, with an average of  $6.7 \pm 2.5$ . Chitotriosidase activity was from 0 to 44.2 nmol/ml/h with an average of  $18.4 \pm 10.4$  using 3mm diameter discs of filter paper with dried blood (approximately 3.6  $\mu$ l of blood). **Conclusions:** The reference values of lysosomal enzyme activity in DBS for  $\beta$ -Glucosidase and quitotriosidase were established for the first time in healthy Venezuelan infants; however, these results differ from those reported in international studies, for which reason autochthonous reference values should be determined in different age groups.

**Keywords:** Gaucher disease,  $\beta$ -glucosidase, chitotriosidase, dried blood spots (DBS), reference values, Venezuelan infants.

- (1) Instituto de Investigaciones Genéticas. Facultad de Medicina. Universidad del Zulia. MgSc. en Genética Humana. Licenciado en Química y Biología.
- (2) Instituto de Investigaciones Genéticas. Facultad de Medicina. Universidad del Zulia. Doctor en Ciencias Médicas. MgSc. en Genética Médica. Especialista en Puericultura y Pediatría. Médico Cirujano.
- (3) Instituto de Investigaciones Biológicas. Facultad de Medicina. Universidad del Zulia. Doctor en Ciencias Médicas. MgSc. en Genética Médica. Especialista en Neurología. Médico Cirujano.
- (4) Instituto de Investigaciones Genéticas. Facultad de Medicina. Universidad del Zulia. MgSc. en Genética Humana. Licenciada en Bioanálisis.
- (5) Instituto de Investigaciones Genéticas. Facultad de Medicina. Universidad del Zulia. Doctor en Ciencias Médicas. MgSc. en Genética Médica. Médico Cirujano.
- (6) Hospital de Clínicas Porto Alegre. Servicio de Genética Médica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Licenciada en Biología
- (7) Hospital de Clínicas Porto Alegre. Servicio de Genética Médica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Doctora en Ciencias Médicas. Licenciada en Bioquímica Farmacéutica.
- (8) Hospital de Clínicas Porto Alegre. Servicio de Genética Médica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Doctor en Ciencias Médicas. MgSc. en Genética Médica. Médico Cirujano.

Autor correspondiente: Luis E. Miranda.  
Teléfonos +58 261-7535267, +58 261 7597250. Fax: +58 261 7597249.  
Correo electrónico: lmiranda@fmed.luz.edu.ve

### INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Gaucher (EG) es una enfermedad de depósito lisosomal (EDL) de herencia autosómica recesiva, consecuencia de mutaciones del gen GBA que codifica la enzima glucocerebrosidasa ( $\beta$ -glucosidasa ácida), gen localizado en el locus 1q21.31 (1). La ausencia o actividad reducida de la enzima provoca acumulación progresiva de glucosilceramida en los lisosomas, causando almacenamiento de sustrato en macrófagos de bazo, hígado, médula ósea y otros órganos (2). La prevalencia mundial de EG se ha estimado en 1: 50000-10000; no obstante, en población Judía Ashkenazi es de 1:850 individuos (3). En Venezuela se desconoce la incidencia de esta enfermedad; sin embargo, existe un registro de enfermedades lisosomales dirigido por el laboratorio Genzyme, el cual documenta 81 afectados para la EG (datos tomados de base de datos del IVSS).

Clínicamente la EG se clasifica en tres tipos: Tipo I (OMIM #230800), conocida como no neuropática, presente desde la niñez, asociada con disfunción hepática, alteraciones hematológicas y afectación ósea en pacientes que pueden permanecer asintomáticos o sin diagnóstico durante gran

parte de su vida (4, 5). Tipo II (OMIM #230900) es la forma neuropática aguda o infantil; es una variante grave de curso rápido y progresivo, cuyas manifestaciones neurológicas aparecen en los primeros meses de vida caracterizadas por convulsiones, trastornos deglutorios y oculomotores, falleciendo prematuramente a los 2 años de vida (6, 7). Tipo III (OMIM # 231000) es una variante intermedia entre EG tipo I y tipo II, los síntomas neurológicos y la hepatoesplenomegalia generalmente se presentan en la primera o segunda década de vida (8, 9).

Existe también una forma variante de la EG debida al déficit de la proteína activadora de la enzima  $\beta$ -glucosidasa denominada saposina C, la cual está codificada en el gen PSAP, situado en el cromosoma 10q22.1. Sin embargo, esta variedad es muy poco frecuente y la mayoría de pacientes con EG presentan exclusivamente déficit de la enzima  $\beta$ -glucosidasa (10).

El diagnóstico de EG está basado en el estudio bioquímico a través de la cuantificación de la actividad de la enzima  $\beta$ -glucosidasa y quitotriosidasa en leucocitos en sangre periférica, fibroblastos, vellosidades coriales, amniocitos y recientemente, en gotas de sangre seca (DBS, siglas de Dried Blood Spots) impregnada sobre papel de filtro, utilizando análisis de fluorometría, inmunocaptura y espectrometría de masa en tándem (11-13).

Recientemente algunos estudios han descrito las ventajas que tiene la determinación de actividad enzimática en gotas de sangre seca impregnada en papel de filtro (14-16). Estas muestras pueden ser fácilmente transportadas por correo a temperatura ambiente sin alterar la actividad enzimática (17-18); adicionalmente, las DBS minimizan el riesgo biológico, puesto que la sangre se impregna en el papel de filtro y solo una pequeña cantidad es requerida para realizar el análisis. Por otra parte, estas muestras no requieren de condiciones especiales de almacenamiento durante su transporte y el proceso en microplacas y tubos Eppendorf es fácil de realizar y menos costoso que otras técnicas diagnósticas. El análisis en DBS es una metodología que facilita el acceso a pacientes que requieran estudios para el diagnóstico de enfermedades de depósito lisosomal, desarrollada en Latinoamérica y puesta en práctica en todo el mundo. Esta metodología permite traslados de muestras de sitios lejanos hasta el lugar de procesamiento sin que la actividad enzimática se vea afectada, lo que permite el estudio de poblaciones de alto riesgo sin hacer discriminación por ubicación geográfica.

En consecuencia, diversos trabajos han demostrado la viabilidad para el diagnóstico de enfermedades de depósito lisosomal empleando DBS (19-21); no obstante, es importante establecer valores de referencia específicos para cada centro, considerando que la actividad de la enzima puede variar debido a características específicas de cada población y principalmente a diferentes condiciones ambientales durante los análisis (22). El objeto de la presente investigación consiste en determinar y establecer valores de referencia de ac-

tividad enzimática lisosomal de  $\beta$ -glucosidasa y quitotriosidasa en lactantes sanos de la población Venezolana.

## MÉTODOS

Se realizó un estudio prospectivo y transversal en 98 lactantes sanos con edades comprendidas entre 1 mes y 24 meses, de ambos sexos (48 femeninos y 50 masculinos). La investigación cumplió con todos los principios éticos citados en la declaración de Helsinki (2004) para la investigación médica en seres humanos. Asimismo, la investigación fue aprobada por el comité de ética del Instituto de Investigaciones Genéticas de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia. Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de padres y/o representantes legales.

Los criterios principales de inclusión fueron: lactantes, padres y abuelos nacidos en Venezuela sin antecedentes familiares de enfermedades metabólicas o degenerativas. Los criterios de exclusión fueron: desarrollo psicomotriz anormal, padres consanguíneos, enfermedades crónicas de base, visceromegalias, convulsiones y desarrollo pondoestatural anormal.

Se tomaron 98 muestras de sangre por punción venosa en la consulta de niños sanos de los hospitales: Fundación Hospital de Especialidades Pediátricas, Materno Infantil Cuatricentenario y Hospital Chiquinquirá. De cada lactante se aplicaron directamente 4 gotas de sangre sobre papel de filtro grado 903 (Schleicher and Schuell, Whatman®) proporcionado por Genzyme a Sanofi Company. Las muestras fueron secadas a temperatura ambiente durante 8 horas, posteriormente se almacenaron a 4°C en bolsas plásticas cerradas provistas de desecante para prevenir la humedad hasta su análisis.

Para el análisis de la actividad de las enzimas  $\beta$ -glucosidasa y quitotriosidasa se utilizaron los sustratos 4-metilumbeliferil  $\beta$ -glicosideo y 4-metilumbeliferil  $\beta$ -D-NN'N''-triacetilquitotrioside (Sigma-Aldrich®), así como, los reactivos taurodeoxicolato de sodio, ácido cítrico monohidratado, fosfato de sodio dibásico, hidróxido de sodio, glicina, acetato de sodio anhidro, ácido acético y etilenodiamina dihidrocloruro, todos de grado de alta pureza. La actividad enzimática de  $\beta$ -glucosidasa y quitotriosidasa fue determinada en DBS siguiendo el protocolo propuesto por Chamoles y col. (23).

En tubos Eppendorf de 2 mL por duplicado se colocó un disco de 3mm de diámetro de papel de filtro con sangre seca (aproximadamente 3,6  $\mu$ l de sangre), se incubó en baño de maría con agitación a 37 °C con el sustrato artificial y buffer dilución señalado en la Tabla 1. Se añadió buffer de parada a los tubos identificados como blanco antes del sustrato. Después de la incubación, las muestras fueron centrifugadas a 6000 rpm por 10 minutos a 4°C. La fluorescencia fue medida en el sobrenadante a una longitud de onda de 365 nm de excitación y 450 nm de emisión en un fluorómetro Spectra Max M2 (molecular Devices). La fluorescencia leída fue co-

regida con los blancos y los resultados comparados con la curva de calibración de 4-methylumbelliferone. La actividad enzimática fue calculada como nanomoles de sustrato hidrolizado por hora por mililitro de sangre (nmol/h/mL).

El análisis estadístico de los datos, se realizó con el uso del programa estadístico (SPSS Statistics 17.0 para Windows), la organización de los datos se efectuó mediante el uso de tablas de contingencia, tabla de percentiles y prueba de Mann-Whitney para el cálculo de la media de muestras independientes, tomando 95% como índice de confiabilidad estadística y considerando significancia estadística una  $p < 0,05$  ( los datos cuantitativos se mostraron como valores promedio  $\pm$  desviación estándar (DS) y porcentaje)

## RESULTADOS

La tabla 2 muestra los valores de referencia obtenidos para la actividad enzimática de B- glucosidasa y quitotriosidasa en gotas de sangre seca en los 98 lactantes estudiados.

La tabla 3 muestra la actividad enzimática de  $\beta$ -glucosidasa y quitotriosidasa en gotas de sangre seca en lactantes sanos según el sexo. Obsérvese que en ambos sexos, el promedio de valores de actividad enzimática de  $\beta$ -glucosidasa y quitotriosidasa expresada en nmol/h/ml para las enzimas analizadas no presentaron diferencias significativas.

La tabla 4 muestra los percentiles de actividad enzimática de  $\beta$ - glucosidasa y quitotriosidasa en gotas de sangre seca en lactantes sanos según el sexo. La concentración de la actividad enzimática de  $\beta$ - glucosidasa en ambos sexos osciló

entre 4 - 9 nmol/h/ml, distribuidas entre el percentil 25 y 75 del grupo estudiado. Asimismo, los valores de concentraciones de quitotriosidasa fluctuaron entre 10-28 nmol/h/ml, correspondiendo con la distribución de los percentiles 25 y 75.

## DISCUSIÓN

En la presente investigación se establecieron los valores de referencia para las enzimas  $\beta$ -glucosidasa y quitotriosidasa en gotas de sangre seca en papel de filtro en lactantes sanos venezolanos de ambos sexos. Los valores de referencia de  $\beta$ -glucosidasa y quitotriosidasa reportados por Ciballero y col (24) para la población adulta son similares a los de lactantes venezolanos, aunque resultaron diferentes en el caso de los recién nacidos. Por otra parte, los valores de referencia establecidos por Chamoles y col (25) en población argentina adulta y recién nacidos sanos presentan una marcada diferencia en la actividad enzimática para la  $\beta$ -Glucosidasa en comparación a los lactantes Venezolanos. Estos hallazgos destacan la importancia de establecer valores de referencia en diferentes poblaciones y grupos etarios autóctonos.

Asimismo, se debe considerar que existe una "idiosincrasia genética" determinada por la presencia de polimorfismos que modifican la expresión génica y la actividad enzimática en diferentes poblaciones, denotando la importancia de determinar por grupos étnicos el comportamiento biológico de las enzimas lisosomales. Este argumento apunta con especial énfasis a la población venezolana caracterizada por ser de origen poli-étnico.

**TABLA 1. Condiciones de Incubación para el análisis de  $\beta$ -glucosidasa y quitotriosidasa**

ENZIMA	SOLVENTE DE ELUSIÓN	SUSTRATO	TIEMPO DE INCUBACIÓN	BUFFER DE PARADA
B-Glucosidasa	50 $\mu$ L buffer citrato-fosfato pH: 5,5	100 $\mu$ L 4- metilumbeliferilo - $\beta$ -D-Glucosida 50mmol/L	5 H	1200 $\mu$ L buffer Glicina-NaOH 0,5M
Quitotriosidasa	40 $\mu$ L buffer acetato de sodio 0,25 pH:5,5	40 $\mu$ L 4- metilumbeliferilo - $\beta$ -DN-N'-N"- triacetilcitotriosa en agua destilada	30 minutos	600 $\mu$ L Etilendiamina 0,13M

**TABLA 2. Valores de referencia para la actividad enzimática de B- glucosidasa y quitotriosidasa en gotas de sangre seca.**

Enzima	Valores de referencia
B- glucosidasa	6,7 $\pm$ 2,5 (media $\pm$ D.S) (rango:2,3- 12 nmol/h/mL)
Quitotriosidasa	18,4 $\pm$ 10,4 (media $\pm$ D.S) (rango:0- 44,2 nmol/h/mL)

**TABLA 3. Actividad enzimática de B- Glucosidasa y Quitotriosidasa en gotas de sangre seca en lactantes sanos según el sexo.**

Actividad enzimática	Lactantes		P
	Femeninos (n=48)	Masculinos (n=50)	
B- Glucosidasa (nmol/h/ml)	6,9 $\pm$ 2,4 (media $\pm$ D.S) (rango:3- 11,9)	6,5 $\pm$ 2,6 (media $\pm$ D.S) (rango:2,3- 12)	0,42
Quitotriosidasa (nmol/h/mL)	17,2 $\pm$ 9,5 (media $\pm$ D.S) (rango:4- 44,2)	19,5 $\pm$ 11,1 (media $\pm$ D.S) (rango:0- 43,5)	0,39

**TABLA 4. Percentiles de actividad enzimática de  $\beta$ - glucosidasa y quitotriosidasa en gotas de sangre seca en lactantes sanos según el sexo**

Actividad enzimática	Sexo	Percentiles				
		p10	p25	p50	p75	p90
B- Glucosidasa (rango:2,3- 12 nmol/h/mL)	Femenino	3,980	4,800	6,800	8,900	10,920
	Masculino	3,540	4,600	5,900	8,600	11,100
Quitotriosidasa (rango:0- 44,2 nmol/h/mL)	Femenino	7,358	10,000	15,800	20,500	31,718
	Masculino	6,194	10,150	17,750	28,030	36,028

Las concentraciones de actividad enzimática de  $\beta$ -glucosidasa y quitotriosidasa han mostrado fluctuaciones en la transición que ocurre entre el recién nacido y el lactante, por lo que un valioso aporte de esta investigación consiste en el análisis exclusivo de lactantes. Esto en contraposición con Uribe y col (26), quienes realizaron y reportaron un estudio en un grupo de 715 individuos colombianos sanos, con edades comprendidas entre 6 meses y 63 años estableciendo un rango único de actividad enzimática de  $\beta$ -glucosidasa (5,9 – 16,8 nmol/ml/h).

Es conveniente considerar la existencia de individuos portadores heterocigotos compuestos, hecho particularmente relevante para quienes presentan aproximadamente la mitad de la actividad enzimática de individuos sanos (27). Por ende, el discernimiento entre heterocigotos que tienen actividades enzimáticas bajas y pacientes afectados en base a las actividades de las enzimas  $\beta$ -glucosidasa y quitotriosidasa puede resultar desafiante. Sin embargo, en estos casos, una combinación de ensayos bioquímicos estándares y moleculares en conjunto con los datos clínicos debe proporcionar información suficiente para permitir un diagnóstico preciso.

La determinación del rango de referencia de actividad enzimática de  $\beta$ -glucosidasa y quitotriosidasa facilitan en la población Venezolana el análisis enzimático para el diagnóstico de la EG, constituyendo un valioso recurso en la selección de pacientes que serán favorecidos con tratamiento de reemplazo enzimático disponible en Venezuela.

Por otra parte, se establecieron por vez primera en una investigación de esta naturaleza percentiles de actividad en sangre seca para la  $\beta$ -glucosidasa y quitotriosidasa, mostrando valores de actividad enzimática distribuidos entre el percentil 25 y 75 con valores de concentraciones similares e independientes del género.

En consecuencia, existe la necesidad en Venezuela y Latinoamérica de que cada centro de investigación especializado en enfermedades metabólicas establezca valores de referencia en población sana según grupos etarios para el análisis de muestras en individuos con sospecha clínica de enfermedades de depósito lisosomal como la EG.

## AGRADECIMIENTOS

Hospital de Especialidades Pediátricas, Hospital Materno Infantil Cuatricentenario Hospital Chiquinquirá. Padres de lactantes. Sociedad Latinoamericana de Errores Innatos del Metabolismo Y Pesquisa Neonatal. Laboratorio de Errores Innatos del Metabolismo del Hospital de Clínicas Porto Alegre Brasil. NetMedical. Genzyme a Sanofi

## REFERENCIAS

- Pastores G, Weinreb N, Aerts H, Andria G, Cox T, Giral M et al. Therapeutic goals in the treatment of Gaucher's disease. *Semin Hematol* 2004; 41 (5): 4-14
- Sidransky E. Gaucher disease: complexity in a "simple" disorder. *Mol Genet Metab*. 2004; 83:6–15.
- Mistry P, Cappelini M, Lukina E, Özsan H, Pascual S, Rosebaum H, et al. Consensus Conference: A reappraisal of Gaucher disease – diagnosis and disease management algorithms. *Am J Hematol* 2011; 86 (1): 110-115
- Lukina E, Watman N, Arreguin E, Dragosky M, Iastrebner M. Improvement in hematological, visceral, and skeletal manifestations of Gaucher's disease type 1 with oral eliglustat tartrate (Genz-112638) treatment: 2-year results of a phase 2 study. *Blood* 2010; 116: 4095–4098.
- Beutler, E.; Grabowski, G. Gaucher Disease. En: *The Metabolic and Molecular Bases of inherited Disease*. Scriver S, Beaudet A, Sly W, Valle D. Eds. McGraw-Hill; New York, NY: 2001. pp: 3635-3688.
- Eblan M, Goker-Alpan O, Sidransky E. Perinatal lethal Gaucher disease: a distinct phenotype along the neuronopathic continuum. *Fetal Pediatr Pathol* 2005; 24:205–222.
- Stone D, Sidransky E. Hydrops fetalis: lysosomal storage disorders in extremis. *Adv Pediatr*. 1999; 46:409–440.
- Hruska K, LaMarca E, Scott R, Sidransky E. Gaucher disease: Mutation and polymorphism spectrum in the Glucocerebrosidase gene (GBA) 2008. *Hum Mutat*; 29: 567-583.
- Alfonso P, Aznarez S, Giral M, Pocovi M, Giraldo P. on behalf of Spanish Gaucher's disease Registry. Mutation analysis and genotype/phenotype relationships of Gaucher disease patients in Spain 2007. *J Hum Genet*; 52: 391-396.
- Gort L y Coll J. Diagnóstico, biomarcadores y alteraciones bioquímicas de la enfermedad de Gaucher. *Med Clin* 2011; 137(supl 1): 12-16
- Omura K, Higami S, Tada K. Alpha-L-iduronidase activity in leukocytes: diagnosis of homozygotes and heterozygotes of the Hurler syndrome. *Eur J Pediatr* 1976; 122: 103-105.
- Gelb M, Turecek F, Scott C, Chamoles N. Direct multiplex assay of enzymes in dried blood spots by tandem mass spectrometry for the newborn screening of lysosomal storage disorders. *J Inher Metab Dis* 2006; 29:397-404.
- Fuller M, Lovejoy M, Brooks D, Harkin M, Hopwood J, Meikle P. Immunocuantification of alpha-galactosidase: evaluation for the diagnosis of Fabry disease. *Clin Chem* 2004; 50:1979-1985.
- Chamoles N, Blanco M, Gaggioli D, Casentini C. Gaucher and Niemann-Pick diseases – Enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper: retrospective diagnoses in newborn screening cards. *Clin Chim Acta*. 2002, 317:191–197
- Olivova P, Van der Veen K, Cullen E, Rose M, Zhang X, Sims K et al: Effect of sample collection on alpha-galactosidase A enzyme activity measurements in dried blood spots on filter paper. *Clin Chim Acta* 2009; 403:159-162.
- De Jesus V, Zhang X, Keutzer J, Bodamer O, Muhl A, Orsini J, Et al. Development and evaluation of quality control dried blood spot materials in newborn screening for lysosomal storage disorders. *Clin Chem* 2009; 55:158-164.
- Chamoles N, Blanco M, Iorcansky S, Gaggioli D, Specola N, Casentini C. Retrospective diagnosis of GM1 gangliosidosis by use of a newborn-screening card. *Clin Chem* 2001; 47:2068.
- Miranda Contreras L, Delgado Luengo W, Zerpa N, Chacín Hernández J, Chávez C, González Ferrer S. Tripeptidil Peptidasa 1 en pacientes con ceroidlipofuscinosis neuronal infantil tardía. *An Pediatr* 2012; 76(3):148-152.
- Gasparotto N, Tomanin R, Frigo A, Niizawa G, Pasquini E, Blanco M. et al. Rapid diagnostic testing procedures for lysosomal storage disorders: alpha-glucosidase and betagalactosidase assays on dried blood spots. *Clin Chim Acta* 2009; 402(1-2):38-41.
- Kallwass H, Carr C, Gerrein J, Titlow M, Pomponio R, Bali

- D. et al. Rapid diagnosis of late-onset Pompe disease by fluorometric assay of alpha-glucosidase activities in dried blood spots. *Mol Genet Metab* 2007; 90:449-452.
21. Li Y, Scott C, Chamoles N, Ghavami A, Pinto B, Turecek F. et al. Direct multiplex assay of lysosomal enzymes in dried blood spots for newborn screening. *Clin Chem* 2004; 50:1785-1796.
  22. Fuentes X, Arderiu, Mas-Serra R, Aluma' -Trulla' A, Marti'-Marcet M, Dot-Bach B. Guideline for the production of multicentre physiological reference values using the same measurement system. A proposal of the Catalan Association for Clinical Laboratory Sciences. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42 (7):778-782.
  23. Chamoles N, Blanco M, Gaggioli D. Fabry disease: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. *Clin Chim Acta*. 2001; 308:195-196.
  24. Civallero G, Michelin K, De Mari J, Viapiana M, Burin M, Coelho J et al: Twelve different enzyme assays on dried-blood filter paper samples for detection of patients with selected inherited lysosomal storage diseases. *Clin Chim Acta* 2006; 372:98-102.
  25. Chamoles N, Blanco M, Gaggioli D, Casentini C: Hurler-like phenotype: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. *Clin Chem* 2001; 47:2098-2102.
  26. Uribe A, Giugliani R. Selective Screening for Lysosomal Storage Diseases with Dried Blood Spots Collected on Filter Paper in 4,700 High-Risk Colombian Subjects. *JIMD* 2013; 11: 107-116.
  27. Brand GD, Matos HC, Cruz GC, Fontes Ndo C, Buzzi M, Brum JM. Diagnosing lysosomal storage diseases in a Brazilian non-newborn population by tandem mass spectrometry. *Clinics (Sao Paulo)* 2013; 68(11):1469-1473.