

Universidade de Brasília

Curso de Farmácia diurno

Campus Darcy Ribeiro

Faculdade de Ciências da Saúde – FS

Orientador(a): Janice Lisboa De Marco

Aluno: Vitor Akira Arake Shiratori – 14/0165355



**Título: Tratamento de hipofosfatasia com a enzima asfotase alfa, uma revisão da
literatura**

Brasília – DF

2019

Vitor Akira Arake Shiratori – 14/0165355

Tratamento de hipofosfatásia com a enzima asfotase alfa, uma revisão da literatura

**Monografia apresentada à Faculdade de Saúde
da Universidade de Brasília como Trabalho de
Conclusão de Curso para o curso de Farmácia
do Campus Darcy Ribeiro.**

**Orientador: Profa. Dra. Janice Lisboa De
Marco.**

Brasília - DF

2019

Vitor Akira Arake Shiratori

A minha mãe e minha irmã que sempre me apoiaram e ajudaram para que eu não desistisse de seguir meus sonhos,

A Ana Laura que me acompanhou e ajudou a superar obstáculos durante esse processo,

Ao meu pai que, mesmo não estando de corpo presente, me ofereceu condições e oportunidades de seguir minha jornada.

DEDICO!

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade de Brasília pela estrutura oferecida durante o progresso do curso e à professora Janice Lisboa pela oportunidade de executar esse trabalho com total apoio e supervisão durante todo o processo.

RESUMO

A hipofosfatasia, também conhecida como doença de Rathbun, é uma doença genética rara, sem cura, que acomete principalmente as fases perinatal, pré-natal e infantil. A doença se caracteriza pela perda do fluxo de cálcio e fósforo nas células de diversos tecidos devido a perda da função da enzima fosfatase alcalina. O tratamento da hipofosfatasia com a enzima asfotase alfa é praticamente a única alternativa, pois a enzima consegue desempenhar a mesma função da fosfatase alcalina e, assim, melhorar as condições gerais de saúde do paciente.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ÍNDICE DE FIGURAS

1 – INTRODUÇÃO.....	10
2 – OBJETIVOS.....	11
3 – JUSTIFICATIVA.....	12
4 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
5 – REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
5.1 – Enzima fosfatase alcalina	12
5.2 – Estrutura da asfotase alfa.....	13
5.3 – Mecanismo de ação	15
5.4 – Patologia da Hipofosfatasia	15
5.5 – Tratamento.....	18
6 – CONCLUSÃO.....	21
7 – REFERÊNCIAS	22

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ALP – Asfotase alcalina

TNALP ou TNSALP – Fosfatase alcalina não específica de tecido

IgG – Imunoglobulina G

cDNA – DNA complementar

GPI – glicosilfosfatidilinositol

PPi - pirofosfato inorgânico

ANKH - proteína anquilose progressiva

ENPP1 - ectonucleotídeo pirofosfatase fosfodiesterase 1

pNPP - p-nitrofenil fosfato

Fixação IMN – Fixação com hastes intramedulares

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representação da estrutura da fosfatase alcalina	10
Figura 2. Medicamento STRENSIQ e suas respectivas dosagens	11
Figura 3. Representação da estrutura da asfotase alfa	11
Figura 4. Representação das atividades do ENPP1, ANKH e TNSALP na célula	13
Figura 5. Estrutura proteica da enzima Asfotase alfa	15
Figura 6. Aspectos anatômicos de pacientes com HPP	17
Figura 7. Imagens de uma osteotomia e fixação com hastes intramedulares (IMN)	18
Figura 8. Gráfico sobre tratamento de pacientes com Asfotase alfa	19
Figura 9. Custo de dose do medicamento STRENSIQ	21

1 – INTRODUÇÃO

A hipofosfatasia é uma doença genética rara (1:300.000 estimado para a população francesa, 1:500.000 para a população na Europa em geral e uma incidência um pouco maior para o Canadá 1:100.000), sem cura, que acomete principalmente as fases perinatal, pré-natal e infantil (ROUGIER *et al*, 2018). É caracterizada pela perda da função da enzima fosfatase alcalina (ALP), ilustrado pela figura 1, em organismo humano por causa da mutação do gene fosfatase alcalina não específica de tecido (TNALP). A ALP possui sítios de ligação, principalmente, em osteoblastos e condrócitos, ou seja, alteram o fluxo de cálcio e de fosfato (formas da vitamina B6) nos ossos. Quando ocorre a mutação do gene TNALP, conseqüentemente se manifesta a deficiência da ALP, que pode apresentar os seguintes sintomas aos pacientes: hipomineralização de ossos e dentes, fraturas, raquitismo, insuficiência pulmonar, hipotonia, convulsões pela falta de vitamina B6, nefrocalcinose, hipercalcemia/hipercalciúria e craniossinostose (SCOTT, 2016; WHYTE *et al*, 2016).

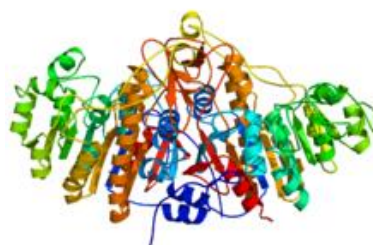


Figura 1. Representação da estrutura da fosfatase alcalina

Fonte: site wwpdb.org – Protein Data Bank

O desenvolvimento do medicamento STRENSIQ (figura 2) para o tratamento de hipofosfatasia foi muito promissor. O medicamento tem como princípio ativo um análogo da enzima fosfatase alcalina, a asfotase alfa. A enzima asfotase alfa é constituída de uma fusão proteica recombinante humana de 726 aminoácidos solúveis (homodímero) e que consiste no sítio catalítico da TNALP, o domínio Fc de IgG e um domínio peptídico deca-aspartato ósseo-alvo,

esquemático pela figura 3 que será melhor elucidada na parte do referencial teórico. A produção da enzima é a partir da linhagem de células de ovário do Hamster chinês por meio de um DNA complementar (cDNA). (CHOIDA; BUBBEAR, 2019)



Figura 2. Medicamento STRENSIQ e suas respectivas dosagens (Doses ilustradas: 18mg/0,45mL; 28mg/mL; 40mg/mL e 80mg/mL)
Fonte: site empr.com

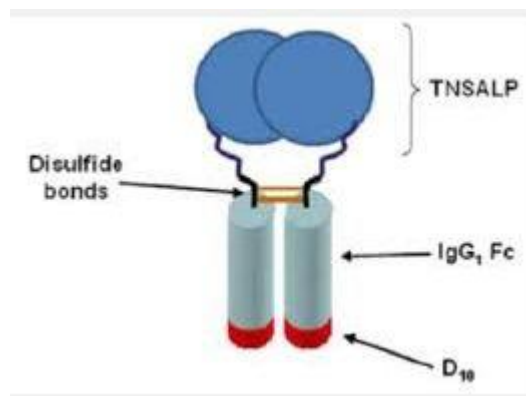


Figura 3. Representação da estrutura da asfotase alfa
Fonte: site ema.europa.eu – European Medicines Agency. Assessment Report - STRENSIQ

2 – OBJETIVOS

Objetivo geral: levantamento bibliográfico da enzima asfotase alfa

Objetivos específicos:

- Revisão da literatura dos anos de 2012 a 2019 sobre a enzima asfotase alfa;

- Descrição da enzima asfotase alfa baseados em trabalhos encontrados na literatura: estrutura, mecanismo de ação, tratamento por meio da utilização dela e desenvolvimento do fármaco;
- Exemplificação da importância de introdução dessa enzima como tratamento da doença hipofosfatasia.

3 – JUSTIFICATIVA

O envolvimento de enzimas como fármacos para o tratamento de doenças é importante para possibilitar uma alternativa mais eficaz para pacientes. A enzima asfotase alfa, por exemplo, é a única alternativa de tratamento para pacientes que apresentam hipofosfatasia.

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizada uma revisão bibliográfica sobre o tema nas revistas acadêmicas científicas disponíveis on-line e bases de dados como: PubMed, COCHRANE e Elsevier, com os seguintes descritores: [HYPOPHOSPHATASIA]; [HYPOPHOSPHATASIA; TREATMENT]; [ASFOTASE ALFA]; [ASFOTASE ALFA; STRUCTURE].

5 – REFERENCIAL TEÓRICO

5.1 – Enzima fosfatase alcalina

A enzima TNSALP é altamente expressa por ossos, dentes, fígado e rins (em poucas concentrações nos fibroblastos, células endoteliais e no sistema nervoso) e é expressa pelo gene ALP no cromossomo 1 dos humanos. A TNSALP é ligada aos tecidos por meio de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) que pode ser clivada e acabar lançando a enzima na circulação, onde a atividade da ALP pode ser identificada no plasma e usada como diagnóstico para algumas condições de saúde. O sítio ativo de ligação da TNSALP se encontra no meio

extracelular, definindo-o como uma ectoenzima. (LOSENKOVA *et al*, 2019). O fosfato inorgânico (PPi) é um subproduto do metabolismo celular capaz de inibir o fosfato de cálcio (hidroxiapatita – HAP) que é um componente inorgânico importante para a cristalização dos ossos e dentes. As concentrações de PPi aumentam de acordo com a atividade de proteínas, como a anquilose progressiva (ANKH) que regula o transporte de PPi da célula para o meio extracelular e a ectoenzima ectonucleotídeo pirofosfatase fosfodiesterase 1 (ENPP1) que cliva o trifosfato para gerar o PPi. Todos os componentes juntos, TNSALP, ANKH e ENPP1, compreendem um complexo sistema de *feedback* que direciona o local e extensão da mineralização no corpo humano. Como ilustrado na figura 4, o complexo não teria função biológica normal caso a TNSALP não fosse funcional. (BOWDEN; FOSTER, 2018)

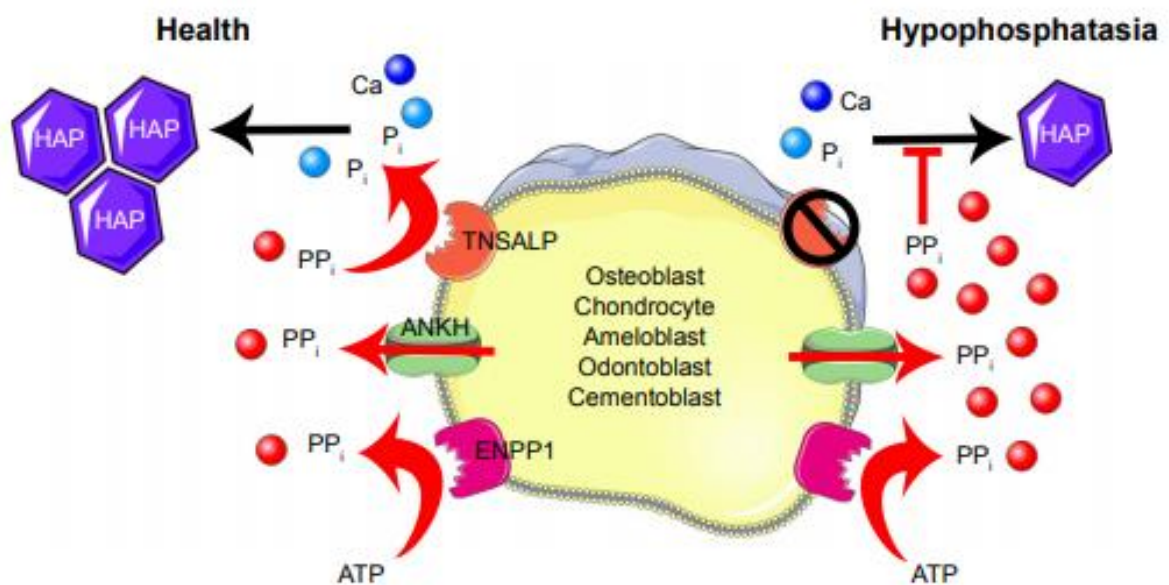


Figura 4. Representação das atividades do ENPP1, ANKH e TNSALP na célula. Do lado esquerdo, há a representação do funcionamento do complexo em uma célula saudável (Health) e, do lado direito, há a representação do complexo em uma célula com hipofosfatase (Hypophosphatasia).
 Fonte: BOWDEN; FOSTER, 2018

5.2 – Estrutura da asfotase alfa

A asfotase alfa é uma enzima fusionada de glicoproteínas compreendidas de duas cadeias de polipeptídeos idênticas, cada cadeia com 726 aminoácidos, ligadas covalentemente

por duas ligações dissulfeto. Cada cadeia polipeptídica é composta por um sítio catalítico do TNSALP, uma imunoglobulina IgG1 humana de receptores Fc e um peptídeo deca-aspartato (figura 5). O IgG1 foi uma alternativa para a substituição do GPI na TNSALP, para que a molécula fosse mais solúvel, estável e facilmente purificada e expressa *in vitro*. A extensão do peptídeo deca-aspartato foi adicionada no TNSALP para aumentar a distribuição, ligação aos tecidos de mineralização devido a sua alta densidade de carga negativa. A alta densidade negativa facilita naturalmente a associação de proteínas, ossos e dentes. (CHOIDA; BUBBEAR, 2019)

As propriedades farmacocinéticas foram definidas por meio de uma análise populacional de testes clínicos de pacientes com HPP, faixa etária entre 1 dia e 66 anos e 60 pacientes no total. A asfotase alfa administrada de forma subcutânea exibe uma farmacocinética linear para dosagens de 28 mg/kg/semana. Na análise da população, o peso do paciente afeta diretamente o volume de distribuição e clearance da asfotase alfa. A biodisponibilidade é de 60,2% para a população de análise. O clearance central e periférico, para um paciente com peso de 70kg é de 15,8 e 51,9 L/dia, respectivamente. A meia-vida média para a asfotase alfa é de 2,28 dias. (SCOTT, 2016). Com isso, a asfotase alfa tem atividade similar a fosfatase alcalina, porém, com características farmacocinéticas e reações diferentes no organismo humano.

A enzima é produzida a partir da linhagem de células de ovário do Hamster chinês por meio de um cDNA humano para gerar a proteína de fusão. Para isso, foi necessário usar métodos de crescimento celular e biorreatores para aumentar a cultura de células ovarianas de Hamster. Após o término da fase de crescimento celular, utilizou-se procedimentos de cromatografias, inativação viral por meio de um solvente para segurança do meio, uma filtração viral e esterilização para acabamento do produto. (CHOIDA; BUBBEAR, 2019)

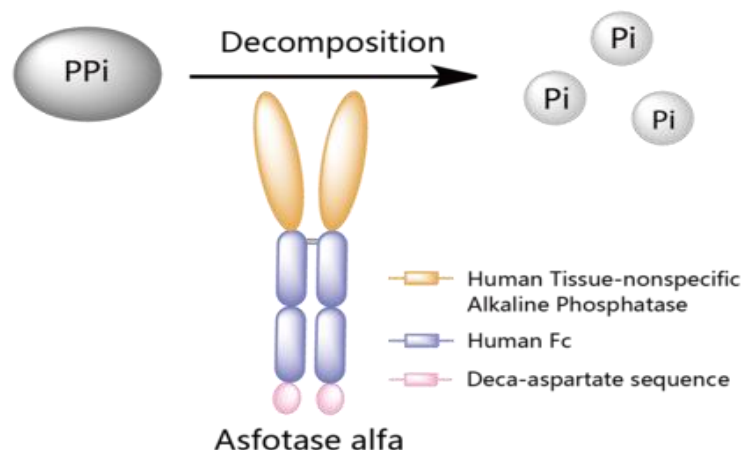


Figura 5. Estrutura proteica da enzima Asfotase alfa

Fonte: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB09105>

5.3 – Mecanismo de ação

A TNSALP é uma ectoenzima catalisadora de fosfomonoésteres com liberação de fosfato inorgânico e álcool. A atividade enzimática é determinada pelo uso de um substrato sintético pNPP e um substrato natural, PPI. Quando ligada à célula, a atividade da enzima se caracteriza especialmente pelo complexo sistema entre proteínas e formação de moléculas de hidroxiapatita (Principal mineral de cálcio encontrado no osso humano). (BIANCHI; VAI, 2019)

5.4 – Patologia da Hipofosfatasia

A hipofosfatasia (HPP) é uma doença genética rara caracterizada pela deficiência óssea e existem cinco formas principais da doença que variam quanto à idade de manifestação e gravidade do quadro clínico do portador: as formas perinatal, pré-natal, infantil, juvenil e adulta. No cromossomo 1 há 2281 genes, e dentre eles, está aquele que codifica ALP e é altamente expressa nos ossos, dentes, fígado e rins. Foram descritas 388 mutações que podem

ocorrer em qualquer exon do gene que desencadeie a doença e pode estar presente tanto no alelo dominante como no recessivo. (ROUGIER *et al*, 2018)

A hipofosfatasia na forma perinatal é a mais severa e a mais letal devido à ausência quase completa de mineralização óssea. Deformidades ósseas, encurtamento nas extremidades dos ossos e excesso de fluido amniótico podem ser detectadas no útero. O recém-nascido pode morrer em poucas semanas após o parto por causa da má formação dos ossos no tórax, resultando em insuficiência respiratória. Pode ser diagnosticado no período pré-natal por sinais e sintomas generalizados como osteopenia e falta de calcificação óssea. (BOWDEN; FOSTER, 2018)

A doença na forma pré-natal é manifestada no útero, apresenta deformidades no esqueleto com ossos poucos mineralizados ou pernas curtas e tortas, detectadas no período pré-natal por ultrassom. Apesar de ser detectada no mesmo período da HPP na forma perinatal, a doença na forma pré-natal é expressa depois do terceiro trimestre de gravidez ou após o nascimento. (BOWDEN; FOSTER, 2018)

A forma infantil da HPP pode apresentar sinais e sintomas depois de seis meses após o nascimento. Os bebês afetados logo desenvolvem hipotonia, dificuldade de alimentação, falha no crescimento e hipomineralização generalizada com deformidades no esqueleto severas, incluindo defeitos raquíticos do tórax, ocasionando insuficiência respiratória. Diferente de outras formas de raquitismo genéticos e nutricionais, os níveis de cálcio no sangue são, na maioria das vezes, alto no diagnóstico de HPP devido ao bloqueio da entrada de minerais no esqueleto causada pela elevada concentração de PPI extracelular. Hipercalciúria e nefrocalcinose podem ocorrer devido à hipercalcemia. O índice de mortalidade para esta forma é de 50% devido à insuficiência respiratória ocasionada. (BOWDEN; FOSTER, 2018)

A forma juvenil da HPP expressa anormalidades esqueléticas que aparecem após seis meses, especialmente pernas curvas e alargamento dos ossos perto dos ligamentos manifestados

pelo raquitismo. Dor crônica nos ossos, fraturas recorrentes, baixa estatura, enfraquecimento dos músculos, dificuldade de deambulação e perda prematura de dentes são sinais e sintomas comuns na HPP juvenil. Nesta forma, ainda, pode-se classificá-la em HPP juvenil severa ou moderada, na qual a severa apresenta as anormalidades esqueléticas até craniossinostose e a moderada permite uma boa qualidade física com sintomas ou mudanças esqueléticas mínimas. Esses sintomas e deformidades são exemplificadas pela figura 6, com exemplos de hipofosfatase juvenil e adulta. (BOWDEN; FOSTER, 2018)

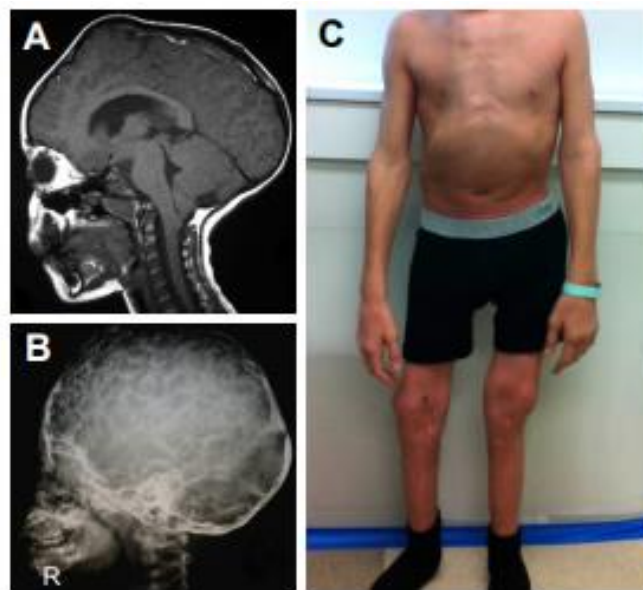


Figura 6. (A). Imagem por ressonância magnética de um crânio de uma criança de 6 anos com HPP com craniossinostose. (B). Radiografia de uma criança de 4 anos com HPP e falta de mineralização cranial. (C). Deformidades nas baixas extremidades com alargamentos dos ligamentos como os joelhos e cotovelos. Fonte: BOWDEN; FOSTER, 2018

A HPP adulta pode ser expressa em qualquer momento da fase adulta, ou seja, maior ou igual a 18 anos de idade. Pode ter uma variedade de sintomas, desde fraturas ou osteomalacia a sintomas dentários. Indivíduos com HPP adulta são diagnosticados, normalmente, em torno dos

40 anos e apresentam sintomas esqueléticos, como fraturas no fêmur ou pelves, osteomalacia, condrocalcinose e osteoartropatia. Pacientes com menores níveis de ALP e maior concentração de substratos fisiológicos podem apresentar mais fraturas pelo corpo. Outros sintomas como dores nos músculos esqueléticos, edema nos ligamentos, pseudogota, baixa densidade óssea e perda de audição podem ser encontradas. Porém, as dores no músculo esquelético, resultado da condrocalcinose, podem ser debilitantes com restrições de movimento até uma incapacidade severa de movimento. (BOWDEN; FOSTER, 2018)

5.5 – Tratamento

Há ensaios clínicos relatados na literatura apresentando a eficácia do tratamento da asfotase alfa em paciente com HPP em qualquer faixa etária e, também, o aumento da sobrevida do paciente. Recém-nascidos apresentam, na maioria das vezes, insuficiência respiratória devido ao enfraquecimento das costelas, necessitando de um aparelho para auxiliar na respiração. Após alguns meses de tratamento com a enzima, pode-se notar uma boa evolução dos pacientes quanto à caixa torácica, fraturas ósseas e desenvolvimento odontológico. (SIMON *et al*, 2018)

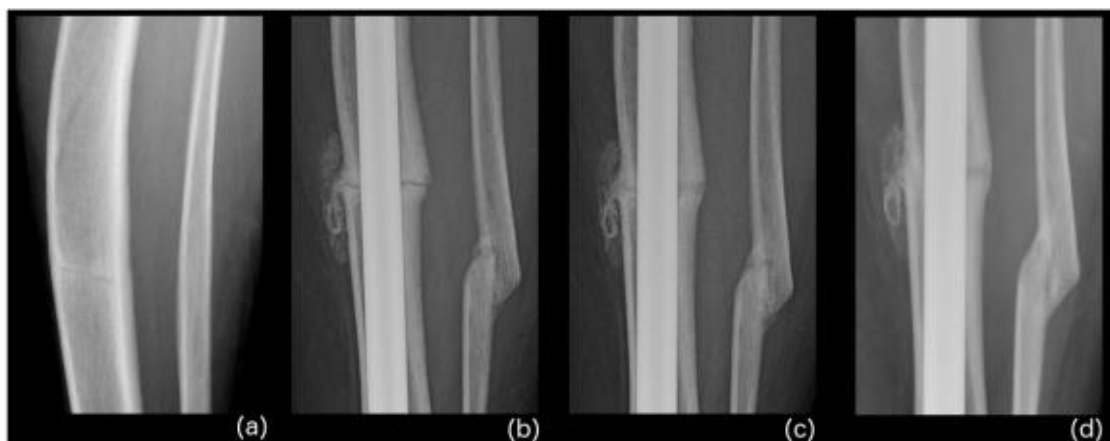


Figura 7. Radiografia da ligação entre a tíbia e fíbula esquerda depois de uma osteotomia e fixação com hastes intramedulares (IMN). (a) 3 anos depois da fratura da tíbia; início do tratamento com Asfotase alfa e com tratamento pós-cirúrgico. (b) 2 meses depois do início do tratamento com Asfotase alfa; formação de calo onde se executou a osteotomia. (c) 5 meses depois da cirurgia; 6 meses de tratamento com Asfotase alfa; Aumento da formação de calo. (d) 10 meses depois da cirurgia; 11 meses de tratamento com Asfotase alfa; Osteotomias da fíbula e tíbia parecem ter se unido.

Fonte: KLIDARAS, 2018

A Figura 7 demonstra radiografias de um paciente com hipofosfatasia que passou por uma cirurgia de osteotomia, para alinhar a tíbia e a fíbula, seguida de uma fixação com hastes intramedulares e acompanhado do tratamento com Asfotase alfa. A primeira radiografia (a) demonstra que os ossos estão desmineralizados e com algumas fraturas. Após a cirurgia e tratamento com Asfotase alfa, pode-se perceber uma melhora na densidade óssea e o desaparecimento de fraturas, principalmente ao analisar a radiografia (d). (KLIDARAS *et al*, 2018)

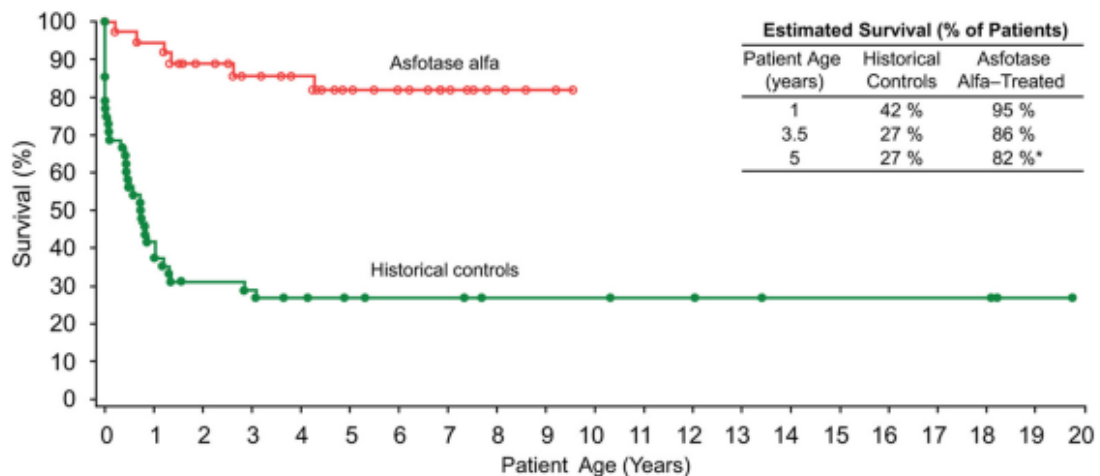


Figura 8. Porcentagem de sobrevivência de pacientes com tratamento de Asfotase alfa e controle histórico. Fonte: WHYTE *et al*, 2016

A figura 8 representa a porcentagem de pacientes com hipofosfatasia que sobreviveram ao longo dos anos. A amostra de dados de pacientes coletados foi de estudos de testes clínicos de fase 2, em andamento que tiveram intervenção com tratamento de Asfotase alfa em 12 diferentes lugares do mundo e outra amostra de dados da história natural da doença em 7 lugares diferentes do planeta. A linha em vermelho representa os pacientes que receberam o tratamento de Asfotase alfa (Um total de 65 pacientes com HPP perinatal ou infantil foram selecionados para o grupo HC (ENB-011-10) e 48 foram inscritos. O grupo de tratamento com

asfotase alfa compreendeu 39 pacientes, com 5 anos de idade ou menos no momento da inscrição, com HPP perinatal ou infantil (11 pacientes de ENB-002-08 / ENB-003-08 (1) e 28 pacientes de ENB-010-10) Todos os pacientes da análise foram inscritos antes de 22 de novembro de 2013, com dados intermediários de 29 de outubro de 2014 e 12 de novembro de 2014, respectivamente.

Ao analisar a figura, pode-se perceber uma grande discrepância entre a quantidade de pessoas que sobreviveram com o tratamento da Asfotase alfa e aqueles que não receberam o tratamento. Por exemplo, a comparação de pacientes com idade de 1 ano tem uma sobrevivência estimada de 47% sem tratamento contra 95% com tratamento de Asfotase alfa, assim, comprovando a eficácia do medicamento. O autor consegue dados de tratamento somente até os 10 anos de idade, pois a maioria recebe alta após a manutenção do tratamento e por ser a faixa etária mais prevalente com a doença. Mesmo após a alta do paciente, as doses de Asfotase alfa deverão ser aplicadas sempre. (WHYTE *et al*, 2016)

Alguns efeitos adversos foram reportados em estudo de caso clínico no uso de Asfotase alfa subcutânea foram: dores de cabeça, eritema, dores nas extremidades, reações no local de administração, pirexia e irritabilidade. A reação adversa mais comum ocorrida durante o tratamento de pacientes foi a reação do medicamento no local de administração, como eritemas e prurido. Aproximadamente 73% dos pacientes apresentaram reações ao local de administração do medicamento e a maioria de leve a média intensidade. (SCOTT, 2016)

A figura 9 demonstra o custo do tratamento de acordo com as diferentes doses. A dose recomendada de STRENSIQ é de 2mg/kg de forma subcutânea três vezes por semana ou 1mg/kg de forma subcutânea seis vezes por semana.

Drug/Comparator	Strength	Dosage Form	Price (\$) ^a	Recommended Dose	Weekly Drug Cost (\$) ^b	Annual Drug Cost (\$) ^b
Asfotase alfa	18 mg	40 mg/mL single-use vial	\$1,836.0000	2 mg/kg SC 3 times per week or 1 mg/kg SC 6 times per week	0–9 kg: \$5,508 ^c	\$286,416
	28 mg		\$2,856.0000		10–14 kg: \$8,568 ^d	\$445,536
	40 mg		\$4,080.0000		15–20 kg: \$12,240 ^e	\$636,480
	80 mg	100 mg/mL single-use vial	\$8,160.0000		21–40 kg: \$24,480 ^f	\$1,272,960
					41–80 kg: \$48,960 ^g	\$2,545,920

Figura 9. Custo de dose do medicamento STRENSIQ

(Drug/Comparator – Droga/Comparador; Strength – Dose; Dosage form – Forma de dosagem/posologia; Price – Preço em dólares americanos; Recommended dose – dose recomendada; Weekly drug cost – custo da droga por semana; Annual drug cost – custo da droga anual).

Fonte: Site ncbi.nlm.nih.gov – livro Common drug review da *Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health* – Asfotase alfa (Strensiq).

O medicamento STRENSIQ foi aprovado pela ANVISA em 2017 e não há tanta documentação reportando o uso no Brasil.

6 – CONCLUSÃO

A enzima Asfotase alfa mostrou ser muito eficaz no tratamento de hipofosfatasia, melhorando o quadro clínico e sobrevida dos pacientes. É praticamente a única forma de tratamento para hipofosfatasia com alta eficácia, pois não há outras formas que possam substituir a enzima fosfatase alcalina. Devido a forma de produção, especificidade de tratamento e ser um medicamento novo no mercado, o custo do medicamento é muito elevado. Por isso, é necessário procurar métodos mais baratos para produção de Asfotase alfa e ser acessível a todos os pacientes com essa doença rara fatal.

7 – REFERÊNCIAS

1. BIANCHI, Maria Luisa; VAI, Silvia. Alkaline Phosphatase Replacement Therapy. *Advances In Experimental Medicine And Biology*, [s.l.], 2019. Springer Singapore.
2. BOWDEN, Sasigarn A.; FOSTER, Brian L.. Profile of asfotase alfa in the treatment of hypophosphatasia: design, development, and place in therapy. *Drug Design, Development And Therapy*, [s.l.], v. 12, p.3147-3161, set. 2018. Dove Medical Press Ltd.
3. CHOIDA, V.; BUBBEAR, J. S.. Update on the management of hypophosphatasia. *Therapeutic Advances In Musculoskeletal Disease*, [s.l.], v. 11, jan. 2019.
4. KISHNANI, Priya S. *et al.* Monitoring guidance for patients with hypophosphatasia treated with asfotase alfa. *Molecular Genetics And Metabolism*, [s.l.], v. 122, n. 1-2, p.4-17, set. 2017. Elsevier BV.
5. KITAOKA, Taichi *et al.* Safety and efficacy of treatment with asfotase alfa in patients with hypophosphatasia: Results from a Japanese clinical trial. *Clinical Endocrinology*, [s.l.], v. 87, n. 1, p.10-19, 2 maio 2017.
6. KLIDARAS, Philostratos *et al.* Fracture Healing in Two Adult Patients With Hypophosphatasia After Asfotase Alfa Therapy. *Jbmr Plus*, [s.l.], v. 2, n. 5, p.304-307, 17 maio 2018. Wiley.
7. LINGLART, Agnès; BIOSSE-DUPLAN, Martin. Hypophosphatasia. *Current Osteoporosis Reports*, [s.l.], v. 14, n. 3, p.95-105, 15 abr. 2016. Springer Nature.
8. LOSENKOVA, Karolina *et al.* Histochemical Approach for Simultaneous Detection of Ectonucleotidase and Alkaline Phosphatase Activities in Tissues. *Methods In Molecular Biology*, [s.l.], p.107-116, 24 out. 2019. Springer New York.
9. OYACHI, Maki *et al.* A case of perinatal hypophosphatasia with a novel mutation in the ALPL gene: clinical course and review of the literature. *Clinical Pediatric*

- Endocrinology, [s.l.], v. 27, n. 3, p.179-186, 2018. Japanese Society for Pediatric Endocrinology.
10. PHILLIPS, Dawn *et al.* Development and validation of a modified performance-oriented mobility assessment tool for assessing mobility in children with hypophosphatasia. *Journal Of Pediatric Rehabilitation Medicine*, [s.l.], v. 11, n. 3, p.187-192, 26 set. 2018. IOS Press.
 11. RODRIGUEZ, Elena *et al.* Respiratory mechanics in an infant with perinatal lethal hypophosphatasia treated with human recombinant enzyme replacement therapy. *Pediatric Pulmonology*, [s.l.], v. 47, n. 9, p.917-922, 10 fev. 2012. Wiley.
 12. ROLVIEN, Tim *et al.* Recovery of bone mineralization and quality during asfotase alfa treatment in an adult patient with infantile-onset hypophosphatasia. *Bone*, [s.l.], v. 127, out. 2019. Elsevier BV.
 13. ROUGIER, H. *et al.* Enzyme-replacement therapy in perinatal hypophosphatasia: Case report and review of the literature. *Archives de Pédiatrie*, [s.l.], v. 25, n. 7, p.442-447, out. 2018. Elsevier BV.
 14. SCOTT, Lesley J.. Asfotase Alfa: A Review in Paediatric-Onset Hypophosphatasia. *Drugs*, [s.l.], v. 76, n. 2, p.255-262, 7 jan. 2016. Springer Nature. Asfotase alfa therapy for children with hypophosphatasia.
 15. SIMON, Sebastian *et al.* Hypophosphatasia: From Diagnosis to Treatment. *Current Rheumatology Reports*, [s.l.], v. 20, n. 11, p.1-2, 10 set. 2018. Springer Nature America, Inc.
 16. WHYTE, Michael P.. Hypophosphatasia: An overview For 2017. *Bone*, [s.l.], v. 102, p.15-25, set. 2017. Elsevier BV.

17. WHYTE, Michael P. *et al.* Asfotase Alfa Treatment Improves Survival for Perinatal and Infantile Hypophosphatasia. *The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism*, [s.l.], v. 101, n. 1, p.334-342, jan. 2016.