

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA
E DO ADOLESCENTE**

**ESTABELECIMENTO DE UM NOVO MÉTODO DE
DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA
MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO I**

ANDRESA CARDOSO GRANDINI ALMEIDA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre, Brasil

2010

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA
E DO ADOLESCENTE**

**ESTABELECEMENTO DE UM NOVO MÉTODO DE
DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA
MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO I**

ANDRESA CARDOSO GRANDINI ALMEIDA

A apresentação desta dissertação é exigência do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof.^a Dra. Ursula da Silveira Matte

Porto Alegre, Brasil

2010

A447e Almeida, Andresa Cardoso Grandini

Estabelecimento de um novo método de diagnóstico molecular para mucopolissacaridose tipo I / Andresa Cardoso Grandini Almeida ; orient. Ursula da Silveira Matte. – 2010.

69 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente. Porto Alegre, BR-RS, 2010.

1. Mucopolissacaridose I 2. Iduronidase 3. Glicosaminoglicanas 4. Patologia molecular I. Matte, Ursula da Silveira II. Título.

NLM: WD 205.5.C2

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA
E DO ADOLESCENTE

ESTA DISSERTAÇÃO FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM:

13/12/2010

E, FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

Prof. Dr. Roberto Giugliani
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof.^a Dra. Ida Vanessa Doederlein Schwartz
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof.^a Dra. Sandra Leistner-Segal
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao grande amor da minha vida, Joel, que sempre foi um estímulo, me impulsionando a buscar meus sonhos e sempre me apoiando incondicionalmente.

Dedico também ao meu filho Mateus, que embora não tenha nascido ainda, já é um incentivo a buscar o melhor da vida em todos os sentidos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida e pela graça de me guiar pelos caminhos que escolho seguir;

À minha mãe, pela paciência, compreensão e amor que sempre demonstrou;

Ao meu pai, que apesar de não estar mais entre nós, tenho certeza que está feliz com o meu sucesso;

Ao meu marido Joel, por agüentar brigas e mau humor, sempre me apoiando e me dando carinho incondicional;

Aos mestres que conheci pelo caminho e, neste momento, um agradecimento muito especial para minha orientadora Ursula Matte, que esteve do meu lado me auxiliando e orientando nesta etapa decisiva;

Aos colegas e amigos de laboratório, pelas conversas, brincadeiras, risadas e apoio técnico-científico;

Aos demais amigos, pela compreensão das minhas ausências e pelo apoio mesmo que de longe, às vezes;

A todos que fazem parte da minha vida, por estarem comemorando comigo mais esta realização.

A adversidade é um trampolim para a maturidade.

Charles Chaplin

RESUMO

A mucopolissacaridose tipo I (MPS I) é uma doença genética autossômica recessiva, causada pela deficiência da enzima lisossomal α -L-iduronidase (IDUA), envolvida na degradação de dermatan e heparan sulfato. O acúmulo desses substratos nas células provoca inúmeras e variadas manifestações clínicas, acarretando diferentes formas da doença, as quais estão divididas de acordo com a sua gravidade: forma atenuada (Síndrome de Scheie ó MPS I S), forma intermediária (Síndrome de Hurler-Scheie ó MPS I SH) e forma grave (Síndrome de Hurler ó MPS I H). O diagnóstico molecular precoce e preciso pode ser feito pela análise de DNA. Entretanto, como essa abordagem despande bastante tempo e recursos, procurou-se estabelecer uma estratégia mais eficiente de diagnóstico molecular. Inicialmente foi feita a comparação entre a metodologia tradicional e a análise por RNA através de levantamentos comparativos de tempo e custos de ambas as metodologias. A seguir, foi realizada a padronização e a validação dessa técnica. A padronização foi realizada em plasmídeo contendo cDNA de *IDUA* e a sua validação foi feita utilizando-se sangue e/ou fibroblastos de pacientes com diagnóstico molecular já estabelecido pela metodologia tradicional. Finalmente, foi sugerida uma nova abordagem otimizada de análise de DNA através da análise das frequências de mutações descritas na literatura. O estudo do RNA pareceu, num primeiro momento, bastante vantajoso, sendo realizado em menos tempo e com custo reduzido para a genotipagem completa do gene. Para pesquisa das mutações comuns, a análise por RNA teve um custo mais alto, porém uma redução de 60% no tempo de processamento. Passou-se para a padronização da técnica, que foi realizada com sucesso. Entretanto, na etapa de validação observou-se que em pacientes com mutações sem sentido ou que alteram o sítio de *splice*, não são corretamente diagnosticados através dessa metodologia. Apenas as mutações com sentido trocado aparecem claramente, porém ainda assim pacientes

heterozigotos compostos para essas mutações e uma mutação sem sentido são incorretamente diagnosticados como homozigotos, devido à falha de amplificação do alelo com mutação sem sentido. Como a abordagem proposta inicialmente não foi satisfatória, procurou-se uma estratégia otimizada de análise de DNA através do seqüenciamento direto de éxons com maior frequência de mutações. Essa nova abordagem utilizando DNA ainda necessita ser validada em uma amostra de pacientes para que se possa conhecer o seu real impacto no tempo e custo do diagnóstico molecular de pacientes com MPS I.

Palavras-chave: Hurler. Glicosaminoglicanos. -L-iduronidase.

ABSTRACT

Mucopolisaccharidosis type I (MPS I) is an autosomal recessive genetic disorder caused by the deficiency of the lysosomal enzyme α -L-iduronidase (IDUA), responsible for the degradation of dermatan and heparan sulfate. The storage of these undegraded or partially degraded substrates causes the various clinical manifestations of the disease that can be classified into three main forms: Scheie Syndrome (MPS I S), the attenuated form; Hurler-Scheie Syndrome (MPS I HS), the intermediate form; and Hurler Syndrome (MPS I H), the severe form. Early and precise molecular diagnosis can be performed by DNA analysis. However, as this methodology is time and resource-consuming, more efficient approaches are needed. Initially, a comparison between the traditional DNA analysis and RNA-based analysis was performed for each step of both techniques. Then, the RNA-based technique was set up using a plasmid with IDUA cDNA and validated on patients with molecular diagnosis already performed by DNA analysis. Finally, an optimized strategy for DNA-based analysis based on the mutation frequencies was proposed. In comparison with DNA-based analysis, RNA studies seem more advantageous, as it is less expensive and faster for whole gene sequencing. For the screening of common mutations it is more expensive but 60% less time-consuming. This technique was successfully set-up. However, at the validation step it was noticed that nonsense and splice site mutations are not correctly diagnosed by this methodology. Missense mutations can be clearly identified even though compound heterozygotes with nonsense mutations are wrongly diagnosed as homozygotes due to amplification failure of the nonsense carrying allele. As this approach was considered unsuitable for the analysis of MPS I patients, a new optimized strategy based on direct sequencing of selected exons was suggested. This approach still needs to be validated in a sample of patients so that its real impact on molecular diagnosis of MPS I can be established.

Keywords: Hurler. Glycosaminoglycans. -L-iduronidase.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Rota de degradação do heparan sulfato nos lisossomos (adaptado de Winchester, 1996)	14
Figura 2: Rota de degradação do dermatan sulfato nos lisossomos (adaptado de Winchester, 1996)	15
Figura 3: Desenho esquemático do gene <i>IDUA</i> com a localização dos <i>primers</i> e seus respectivos tamanhos de <i>amplicons</i>	28
Figura 4: Fotos de eletroforeses em gel de agarose 1,5% com as bandas correspondentes aos 5 <i>amplicons</i>	35
Figura 5: Mutação p.R383H em heterozigose no cDNA do paciente A.....	36
Figura 6: Mutação p.W402X em heterozigose no cDNA do paciente C.....	37
Figura 7: Mutação p.Q70X não visível no cDNA do paciente D.....	38
Figura 8: Mutação p.R89W em homozigose no cDNA do paciente E.....	38
Figura 9: Mutação p.W402X não visível no cDNA do paciente E	39

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Tempo médio de análise de todo o gene <i>IDUA</i> através de análise por DNA e RNA, com destaque para o tempo de cada etapa em particular, por paciente	31
Gráfico 2: Tempo médio de rastreio por mutações comuns no gene <i>IDUA</i> através de análise por DNA e RNA, com destaque para o tempo de cada etapa em particular, por paciente	33
Gráfico 3: Custo médio de análise de todo o gene <i>IDUA</i> através de análise por DNA e RNA, com destaque para o custo de cada etapa em particular.....	33
Gráfico 4: Custo médio para diagnóstico de mutações comuns no gene <i>IDUA</i> através de análise por DNA e RNA, com destaque para o tempo de cada etapa em particular, por paciente	34
Gráfico 5: Frequência absoluta das mutações descritas para cada éxon do gene <i>IDUA</i>	40
Gráfico 6: Comparativo entre a análise proposta pelo HGMD e a frequência cumulativa aplicada a nossa população amostral de 176 pacientes.....	41
Gráfico 7: Frequência das mutações em 176 pacientes	41
Gráfico 8: Frequência Cumulativa das mutações encontradas para o gene <i>IDUA</i> na nossa população amostral de 176 pacientes.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação das mucopolissacaridoses (adaptado de Neufeld <i>and</i> Muenzer, 2001).	13
Tabela 2: Mutações sem sentido e com sentido trocado descritas para o gene <i>IDUA</i>	20
Tabela 3: Tempo médio em horas de cada etapa da análise de DNA e RNA.....	27
Tabela 4: Tempo e custo detalhados de cada etapa envolvida na análise por DNA e RNA por paciente	32
Tabela 5: Temperatura de anelamento dos <i>amplicons</i> na análise por cDNA.....	35
Tabela 6: Genótipo dos cinco pacientes utilizados para validação da análise de cDNA.....	36
Tabela 7: Comparativo dos diagnósticos por DNA e RNA dos pacientes analisados.....	39
Tabela 8: Frequência Cumulativa das mutações descritas para o gene <i>IDUA</i>	40
Tabela 9: Agrupamento proposto baseado nas frequências das mutações encontradas na população amostral	42

LISTA DE ABREVIATURAS

ARMS ó *Amplification Refractory Mutation System* (Sistema de Amplificação Refratória de Mutações)

dHPLC ó *Denaturing High-Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida Desnaturante de Alta Performance)

DMSO ó Dimetilsulfóxido

EXO I ó Exonuclease I

GAGs ó Glicosaminoglicanos

HCPA ó Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HGMD ó *Human Gene Mutation Database*

HLA ó *Human Leukocyte Antigen* (Antígenos Leucocitários Humanos)

HRM ó *High Resolution Melting* (Dissociação de Alta Resolução)

MPS ó Mucopolissacaridose

MPS I ó Mucopolissacaridose Tipo I

MPS IH ó Mucopolissacaridose Tipo I: Síndrome de Hurler

MPS IHS ó Mucopolissacaridose Tipo I: Síndrome de Hurler-Scheie

MPS IS ó Mucopolissacaridose Tipo I: Síndrome de Scheie

NMD ó *Nonsense-Mediated mRNA Decay* (Mecanismo de Decaimento do mRNA mediado por mutações sem sentido)

RFLP ó *Restriction Fragment Length Polymorphism* (Polimorfismo de Tamanho de Fragmento de Restrição)

SAP ó *Shrimp Alkaline Phosphatase* (Fosfatase Alcalina de Camarão)

SGM ó Serviço de Genética Médica

SSCP ó *Single Strand Conformational Polymorphism* (Polimorfismo de Conformação de Fita Simples)

TCTH ó Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas

TRE ó Terapia de Reposição Enzimática

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO I (MPS I)	14
MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	15
TRATAMENTO.....	16
MUTAÇÕES DESCRITAS	19
CORRELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO.....	22
DIAGNÓSTICO.....	22
OBJETIVOS	25
OBJETIVO GERAL	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
MATERIAL E MÉTODOS	26
1 ANÁLISE DE TEMPO E CUSTO DA DETECÇÃO DE MUTAÇÕES ATRAVÉS DO SEQÜENCIAMENTO DIRETO DO cDNA EM COMPARAÇÃO COM A ANÁLISE DE DNA TRADICIONAL	26
2 PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO DE SEQÜENCIAMENTO DIRETO DE cDNA	27
3 PROPOSTA DE UM PROTOCOLO MAIS EFICIENTE PARA DETECÇÃO DE MUTAÇÕES EM MPS I.....	29
RESULTADOS	31
1 ANÁLISE DE TEMPO E CUSTO DA DETECÇÃO DE MUTAÇÕES ATRAVÉS DO SEQÜENCIAMENTO DIRETO DO cDNA EM COMPARAÇÃO COM A ANÁLISE DE DNA TRADICIONAL	31
2 PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO DE SEQÜENCIAMENTO DIRETO DE cDNA	34
Paciente A	36
Paciente B	37
Paciente C	37

Paciente D	38
Paciente E	38
3 PROPOSTA DE UM PROTOCOLO MAIS EFICIENTE PARA DETECÇÃO DE MUTAÇÕES EM MPS I.....	39
DISCUSSÃO	43
CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS	50
ANEXO A	59
ANEXO B	66

INTRODUÇÃO

As mucopolissacaridoses são erros inatos do metabolismo causados pela deficiência de enzimas lisossomais, responsáveis pela quebra de carboidratos complexos, os glicosaminoglicanos (GAGs), também chamados de mucopolissacarídeos. A deficiência dessas enzimas resulta na acumulação de dermatan sulfato, heparan sulfato e/ou keratan sulfato no interior lisossomal (Neufeld *and* Muenzer 2001), levando a inúmeros danos em tecidos e órgãos, como problemas esqueléticos, cardíacos, articulares e neurológicos.

Segundo Clarke (2008) e Neufeld *and* Muenzer (2001), as mucopolissacaridoses são classificadas de acordo com a enzima deficiente, conforme ilustra a Tabela 1: tipo I (Hurler, Hurler-Scheie e Scheie), tipo II (Hunter), tipo III (Sanfilippo A a D), tipo IV (Mórquio A e B), tipo VI (Maroteaux-Lamy), tipo VII (Sly) e tipo IX (Natowicz).

Tabela 1: Classificação das mucopolissacaridoses (adaptado de Neufeld *and* Muenzer, 2001).

Tipo de MPS	Síndrome	Enzima deficiente	GAGs em excesso
MPS IH	Hurler	-L-iduronidase	dermatan sulfato e heparan sulfato
MPS IS	Sheie	-L-iduronidase	dermatan sulfato e heparan sulfato
MPS I HS	Hurler-Scheie	-L-iduronidase	dermatan sulfato e heparan sulfato
MPS II	Hunter	Iduronato-sulfatase	dermatan sulfato e heparan sulfato
MPS III A	Sanfilippo A	Heparan-N-sulfatase	heparan sulfato
MPS III B	Sanfilippo B	-N-acetilglicosaminidase	heparan sulfato
MPS III C	Sanfilippo C	Acetil CoA: - glicosaminídeo acetiltransferase	heparan sulfato
MPS III D	Sanfilippo D	N-acetilglicosamina 6- sulfatase	heparan sulfato
MPS IV A	Morquio A	Galactose-6-sulfatase	keratan sulfato
MPS IV B	Morquio B	-galactosidase	keratan sulfato
MPS VI	Maroteaux-Lamy	Arilsulfatase B	dermatan sulfato
MPS VII	Sly	-glicuronidase	dermatan sulfato e heparan sulfato
MPS IX	-	Hialuronidase	hialuronan

Fonte: Neufeld *and* Muenzer (2001)

MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO I (MPS I)

A mucopolissacaridose tipo I é uma doença genética autossômica recessiva, que provoca a não degradação ou degradação parcial de dermatan e heparan sulfato (Figuras 1 e 2), devido à presença de mutações no gene *IDUA*, que codifica para a enzima lisossomal α -L-iduronidase, envolvida nessa rota metabólica.

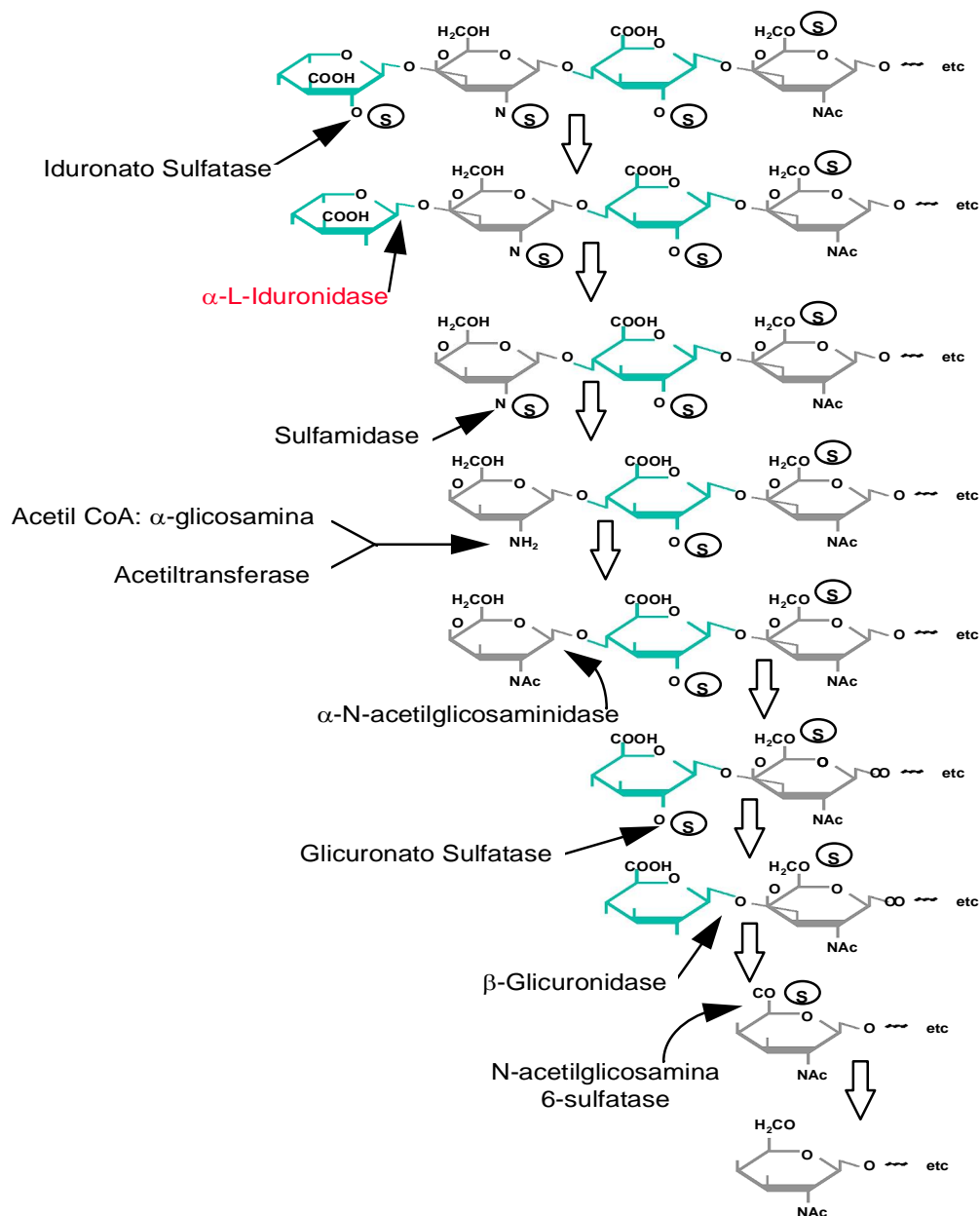


Figura 1: Rota de degradação do heparan sulfato nos lisossomos (adaptado de Winchester, 1996)

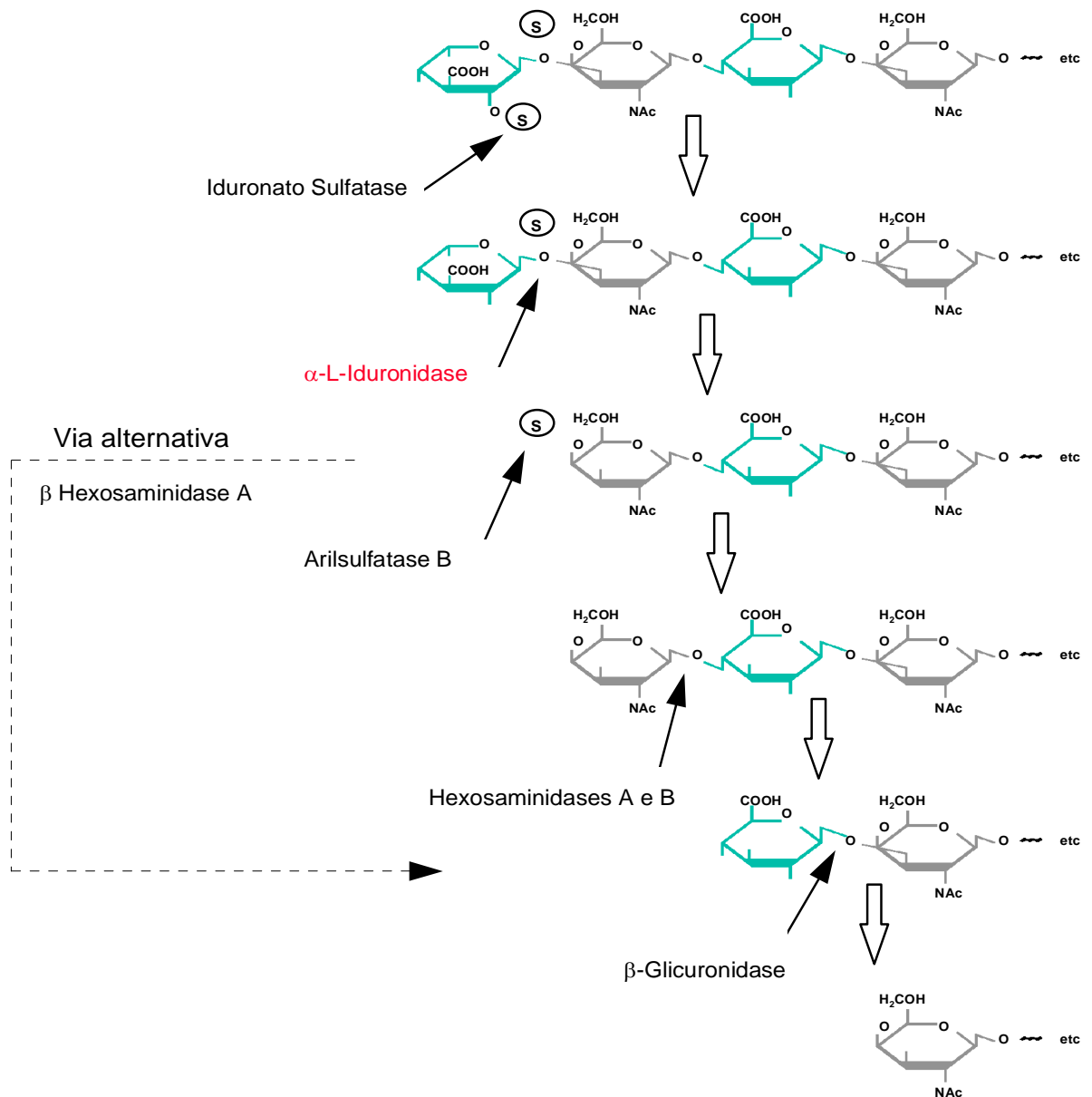


Figura 2: Rota de degradação do dermatan sulfato nos lisossomos (adaptado de Winchester, 1996)

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

O acúmulo de GAGs nas células provoca inúmeras e variadas manifestações clínicas, como baixa estatura, aumento do fígado e do baço e retardo mental. Devido aos diferentes graus de gravidade dessa doença, ela é classificada em três tipos: Síndrome de Hurler (MPS IH), Síndrome de Hurler-Scheie (MPS IHS) e Síndrome de Scheie (MPS IS).

A Síndrome de Hurler é a forma mais grave, com envolvimento de múltiplos órgãos, promovendo a morte ainda na infância. As manifestações mais comuns são deformações ósseas, infecções nasais recorrentes, presença de hérnias tanto inguinais quanto umbilicais, face grosseira, aumento do fígado e baço (hepatoesplenomegalia). De acordo com Neufeld *and* Muenzer (2001) pode ocorrer uma aceleração no crescimento no início da infância, porém entre os 6 e 18 meses inicia-se a desaceleração e a estatura estabiliza em torno de 1,1m. Ainda é bastante comum nesse tipo de MPS retardo mental e problemas neurológicos em geral, os quais costumam aparecer entre os 12 e 24 meses, além de deformidades cardíacas, o que é uma importante causa de morte para esses pacientes, juntamente com as infecções respiratórias recorrentes.

A Síndrome de Hurler-Scheie é a forma intermediária da doença, apresentando seus sintomas por volta dos 3 a 8 anos de vida. Inclui em sua sintomatologia, disostose múltipla, opacificação de córnea, perda de audição, enrijecimento articular, problemas cardíacos e pouca ou nenhuma disfunção intelectual. Apesar de mais branda que a MPS IH, reduz a expectativa de vida dos pacientes a 20 ou 30 anos devido aos problemas somáticos que provoca. (Neufeld *and* Muenzer, 2001; Pastores *et al* 2007).

A Síndrome de Scheie é a forma mais branda da doença, apresentando seus sintomas mais tardiamente e com evolução mais lenta, propiciando uma expectativa de vida normal (Zheng *et al* 2003).

TRATAMENTO

Quando realizado precocemente, o Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas (TCTH) é indicado, apesar dos resultados contraditórios. Esse procedimento é usado desde o

início dos anos 80 para tratar os casos mais graves de MPS I (Síndrome de Hurler) (Hobbs *et al* 1981), com o intuito de que a enzima produzida pelas células transplantadas seja absorvida pelas células deficientes. Como é um procedimento que apresenta riscos associados é indicado para pacientes com a forma grave e apresenta melhores resultados se realizado até os 24 meses. Até essa idade o TCTH pode preservar a habilidade mental, embora não interfira nas deformidades ósseas (Malm *et al* 2008). Outros estudos mostram melhora nas alterações viscerais, com redução da hepatoesplenomegalia e opacidade da córnea (Peters *et al* 1996), diminuição das complicações cardíacas, regressão da hipertrofia ventricular (Braunlin *et al* 2003) e melhora na audição. No entanto, além da dificuldade de encontrar doadores HLA (*Human Leukocyte Antigen*) compatíveis, o aparecimento de quimerismo nos pacientes e a alta mortalidade (Bonfim *et al* 2007) além das várias comorbidades (problemas cardíacos e respiratórios) que interferem diretamente no procedimento, tornam-no arriscado (Whitley *et al* 1993). Apesar disso ainda é indicado e melhora a qualidade de vida dos pacientes (Muenzer *and* Fisher 2004).

Entretanto, atualmente o tratamento de escolha para MPS I é a Terapia de Reposição Enzimática (TRE), a qual deve ser administrada toda semana por toda a vida do paciente. A terapia visa fornecer uma enzima artificial, desenvolvida a partir da tecnologia do DNA recombinante, que seja captada pelas células deficientes e atue na degradação do heparan e dermatan sulfato, evitando assim, seu acúmulo nos lisossomos. Desde 2001, a TRE vem sendo testada clinicamente e demonstra uma melhora significativa nos pacientes, especialmente naqueles com a forma atenuada e intermediária. Além da redução dos níveis de GAGs, foi notada uma melhora no crescimento, na amplitude dos movimentos de cotovelos e joelhos e na apnéia do sono (Kakkis *et al* 2001). A TRE tem mostrado bons resultados em comorbidades não relacionadas ao sistema nervoso central, porém o comprometimento neurológico não apresenta melhora com esse tipo de tratamento, já que a enzima é uma cadeia

de aminoácidos bastante grande e não ultrapassa a barreira hematoencefálica, não chegando assim até as células nervosas (Grubb *et al* 2010).

De acordo com alguns autores (Giugliani *et al*, 2010; Hirth *et al* 2007) pode ser recomendada a administração de laronidase (Aldurazyme®) antes do TCTH para melhorar o estado geral dos pacientes graves (MPS IH). Tolar *et al* (2008) observaram resultados satisfatórios em sete pacientes nos quais a TRE foi administrada antes do transplante. Apesar disso, alguns centros são contrários a este procedimento por temerem que a TRE provoque a produção de anticorpos neutralizantes e torne os pacientes ainda mais sensibilizados, o que traria ainda mais riscos para o TCTH (Wynn *et al* 2009).

Inúmeros estudos, ainda em modelos animais, estão testando a construção e a administração de enzimas que utilizam a tecnologia do DNA recombinante, as quais possam se incorporar ao DNA do paciente e suprir a deficiência da enzima endógena. Em 2008, Osborn *et al* (2008) desenvolveram uma enzima recombinante de IDUA com transferrina para facilitar o acesso ao sistema nervoso central, já que as células do cérebro expressam altos níveis dessa proteína, e a injetaram em camundongos. Obtiveram como resultado uma diminuição no acúmulo de GAGs no cerebelo desses animais. Em 2009, Aronovich *et al* testaram o uso de *transposons* superexpressando a enzima IDUA em camundongos e também obtiveram resultados positivos, pois além de observar níveis normais da enzima em órgãos somáticos, o mesmo aconteceu no cérebro desses animais.

Entre as estratégias para o tratamento de MPS I e outras doenças estudadas no Centro de Terapia Gênica do HCPA (Hospital de Clínicas de Porto Alegre) está a produção de células recombinantes microencapsuladas superexpressando a enzima de interesse (Lagranha *et al* 2008), nesse caso para tratamento de leucodistrofia metacromática. No caso específico da MPS I, células recombinantes microencapsuladas superexpressando α -L-iduronidase foram produzidas em nosso laboratório (Mayer *et al* 2010). Essas células microencapsuladas foram

inicialmente utilizadas em co-cultivo com fibroblastos de pacientes com MPS I e restabeleceram a atividade enzimática de IDUA após duas semanas de tratamento (Baldo *et al* 2010, observações não publicadas). Quando aplicadas *in vivo*, elas se mostraram eficientes em reduzir o acúmulo tecidual de GAGs corados com Alcian Blue (Baldo *et al* 2010, observações não publicadas).

MUTAÇÕES DESCRITAS

O gene *IDUA* está localizado no braço curto do cromossomo 4, na região 4p16.3 (Scott *et al* 1990). Possui cerca de 19 kb entre regiões codificantes e não codificantes, sendo 14 éxons e um mRNA de 2,3 kb (Scott *et al* 1992a).

Scott *et al* (1992a) descreveram a primeira mutação no gene *IDUA*, a mutação p.W402X, a qual correspondia nesse estudo a 31% dos alelos de uma amostra de 64 pacientes. Em seguida, foram descritas as mutações p.Q70X e p.P533R correspondendo juntas a 28% dos alelos afetados no estudo realizado (Scott *et al* 1992b). Logo em seguida, em 1995, foram descritas as mutações p.R89Q (Scott *et al* 1995) e p.R383H (Bunge *et al* 1995), mutações comumente encontradas em pacientes brasileiros.

De acordo com *The Human Gene Mutation Database*, em outubro de 2010 haviam 119 mutações descritas para MPS I, sendo 65% do tipo sem sentido e com sentido trocado, 16% pequenas deleções, 9% em sítio de *splice* e 5% pequenas inserções. A Tabela 2 ilustra as mutações sem sentido e com sentido trocado já descritas para o gene *IDUA* e o seu fenótipo característico.

Tabela 2: Mutações sem sentido e com sentido trocado descritas para o gene IDUA.

Códon Mutado	Mutação	Fenótipo	Referência
ATGc-ATA	p.M1I	Hurler	Lee-Chen (1997) J Med Genet 34, 939
GGC-GAC	p.G51D	Hurler	Bunge (1994) Hum Mol Genet 3, 861
TGCc-TGA	p.C53X	Hurler	Venturi (2002) Hum Mutat 20, 231
cCAG-TAG	p.Q60X	Hurler	Beesley (2001) Hum Genet 109, 503
cCAG-TAG	p.Q63X	Hurler	Voskoboeva (1998) Mol Genet Metab 65, 174
TACg-TAA	p.Y64X	Hurler	Bach (1993) Am J Hum Genet 53, 330
cCAG-TAG	p.Q70X	Hurler	Clarke (1993) Hum Mol Genet 2, 1311
cGCC-ACC	p.A75T	Hurler	Clarke (1994) Hum Mutat 3, 275
cGCC-CCC	p.A75P	Hurler	Voskoboeva (1998) Mol Genet Metab 65, 174
GCC-GTC	p.A79V	Hurler-Scheie	Lee-Chen (2002) J Formos Med Assoc 101, 425
CAC-CCC	p.H82P	Hurler	Clarke (1993) Hum Mol Genet 2, 1311
cCGG-TGG	p.R89W	Hurler	Bunge (1995) Hum Mutat 6, 91
CGG-CAG	p.R89Q	Hurler	Scott (1995) Hum Mutat 6, 288
ATGg-ATC	p.M133I	Hurler	Matte (2003) Mol Genet Metab 78, 37
GCC-GAC	p.A160D	Hurler	Venturi (2002) Hum Mutat 20, 231
AGA-ATA	p.R162I	Hurler	Li (2002) Genet Med 4, 420
TACg-TAA	p.Y167X	Scheie	Beesley (2001) Hum Genet 109, 503
cGAG-AAG	p.E178K	Hurler	Venturi (2002) Hum Mutat 20, 231
tGAG-AAG	p.E182K	Hurler	Brooks (2001) Glycobiology 11, 741
CCA-CGA	p.P183R	Hurler	Venturi (2002) Hum Mutat 20, 231
GGC-GAC	p.G197D	Hurler	Venturi (2002) Hum Mutat 20, 231
TACg-TAA	p.Y202X	Hurler	Matte (2003) Mol Genet Metab 78, 37
cGAT-AAT	p.D203N	Hurler	Dou (2007) Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi 24, 136
TGC-TAC	p.C205Y	Scheie	Beesley (2001) Hum Genet 109, 503
GGT-GAT	p.G208D	Hurler	Li (2002) Genet Med 4, 420
GGT-GTT	p.G208V	Hurler	Beesley (2001) Hum Genet 109, 503
CTG-CCG	p.L218P	Hurler	Bunge (1994) Hum Mol Genet 3, 861
CTG-CAG	p.L238Q	Hurler	Yogalingam (2004) Hum Mutat 24, 199
CAC-CGC	p.H240R	Scheie	Beesley (2001) Hum Genet 109, 503
TCC-TTC	p.S260F	Hurler-Scheie	Matte (2003) Mol Genet Metab 78, 37
gGGT-CGT	p.G265R	Hurler	Yogalingam (2004) Hum Mutat 24, 199
gGAG-TAG	p.E274X	Hurler	Clarke (1994) Hum Mutat 3, 275
cGAG-TAG	p.E299X	Hurler	Ketudat Cairns (2005) Southeast Asian J Trop Med Public Health 36, 1308
gGCG-ACG	p.A300T	Pseudodeficiência	Aronovich (1996) Am J Hum Genet 58, 75
aCAG-TAG	p.Q310X	Hurler	Bach (1993) Am J Hum Genet 53, 330
gGAC-TAC	p.D315Y	Hurler	Scott (1995) Hum Mutat 6, 288
GCG-GTG	p.A319V	Scheie	Beesley (2001) Hum Genet 109, 503
cGCG-CCG	p.A327P	Hurler	Bunge (1995) Hum Mutat 6, 91
TACg-TAA	p.Y343X	Hurler	Voskoboeva (1998) Mol Genet Metab 65, 174
TACg-TAG	p.Y343X	Hurler	Tieu (1994) Hum Mutat 3, 333
CTG-CGG	p.L346R	Hurler-Scheie	Teng (2000) Clin Genet 57, 131
cGAC-AAC	p.D349N	Hurler	Scott (1995) Hum Mutat 6, 288
cGAC-TAC	p.D349Y	Hurler	Venturi (2002) Hum Mutat 20, 231
AAT-ATT	p.N350I	Hurler	Matte (2003) Mol Genet Metab 78, 37
gCGC-TGC	p.R363C	Hurler	Yogalingam (2004) Hum Mutat 24, 199
ACG-ATG	p.T364M	Hurler	Lee-Chen (1997) J Med Genet 34, 939
cACC-CCC	p.T366P	Hurler	Bach (1993) Am J Hum Genet 53, 330
CAG-CGG	p.Q380R	Hurler	Scott (1995) Hum Mutat 6, 288

CGC-CAC	p.R383H	Hurler	Bunge (1995) Hum Mutat 6, 91
ACG-AGG	p.T388R	Hurler	Bartholomew (1998) Hum Mutat 12 291
gCAG-TAG	p.Q400X	Scheie	Beesley (2001) Hum Genet 109, 503
TGG-TAG	p.W402X	Hurler	Scott (1992) Hum Mutat 1, 103
cGAA-TAA	p.E404X	Hurler	Bunge (1995) Hum Mutat 6, 91
cGGG-CGG	p.G409R	Hurler	Bach (1993) Am J Hum Genet 53, 330
AGCg-AGG	p.S423R	Hurler	Yogalingam (2004) Hum Mutat 24, 199
CGC-CCC	p.R489P	Hurler	Bunge (1994) Hum Mol Genet 3, 861
CTG-CCG	p.L490P	Hurler	Tieu (1995) Hum Mutat 6, 55
CGG-CCG	p.R492P	Hurler	Tieu (1995) Hum Mutat 6, 55
CCC-CGC	p.P496R	Hurler	Beesley (2001) Hum Genet 109, 503
CCC-CTC	p.P496L	Hurler	Tieu (1995) Hum Mutat 6, 55
ATG-ACG	p.M504T	Hurler	Bunge (1995) Hum Mutat 6, 91
CCG-CGG	p.P533R	Hurler	Scott (1992) Hum Mutat 1, 333
CCG-CTG	p.P533L	Hurler	Voskoboeva (1998) Mol Genet Metab 65, 174
cCAA-TAA	p.Q561X	Hurler	Matte (2003) Mol Genet Metab 78, 37
cCAG-TAG	p.Q584X	Hurler	Lee-Chen (2002) J Formos Med Assoc 101, 425
cTTC-ATC	p.F602I	Hurler	Yogalingam (2004) Hum Mutat 24, 199
cCGA-GGA	p.R619G	Hurler-Scheie	Lee-Chen (1999) Clin Genet 56, 66
cCGA-TGA	p.R619X	Hurler	Beesley (2001) Hum Genet 109, 503
tCGA-TGA	p.R621X	Hurler	Bunge (1994) Hum Mol Genet 3, 861
cTGG-CGG	p.W626R	Hurler	Bunge (1995) Hum Mutat 6, 91
cCGA-TGA	p.R628X	Hurler	Beesley (2001) Hum Genet 109, 503
CGA-CCA	p.R628P	Hurler	Matte (2003) Mol Genet Metab 78, 37
TCG-TTG	p.S633L	Scheie	Beesley (2001) Hum Genet 109, 503
aTGA-GGA	p.X654G	Hurler	Tieu (1995) Hum Mutat 6, 55
TGAg-TGT	p.X654C	Hurler	Bach (1993) Am J Hum Genet 53, 330

Fonte: HGMD (Human Gene Mutation Database) acesso em 28/10/2010

Estudos realizados com pacientes brasileiros revelam que as mutações mais comuns são p.W402X e p.P533R. Matte *et al* (2003) encontraram uma frequência de 37% dos alelos com a mutação p.W402X e 11,6% com p.P533R. Na mesma análise foram pesquisadas outras mutações, das quais p.Q70X e p.R89Q foram encontradas com baixa frequência no Brasil. Em outro estudo realizado por Pereira *et al* (2008) houve uma confirmação das altas frequências de p.P533R e p.W402X, porém representando 33,33% e 27,8% respectivamente, totalizando 60% dos alelos estudados. Ainda nessa mesma pesquisa a mutação p.Q70X, antes encontrada em baixa frequência, não apareceu em nenhum dos alelos analisados.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO

Vários estudos sugerem uma associação do genótipo com a gravidade da doença. A mutação p.W402X, por exemplo, foi relacionada ao fenótipo grave da doença (Síndrome de Hurler), pois a enzima alterada resultante da tradução do gene com essa alteração é degradada precocemente e não inicia sua atividade (Scott *et al* 1995). Outro exemplo seria a mutação p.P533R relacionada com a forma intermediária (Síndrome de Hurler-Scheie), pois, em estudos de expressão, a enzima com essa alteração apresentou baixa atividade quando comparada ao tipo selvagem (Matte *et al* 2003).

Essa associação genótipo-fenótipo foi estabelecida por Fuller *et al* (2005), os quais desenvolveram um estudo correlacionando substratos específicos, com proteínas mutantes, genótipo e atividade residual de IDUA. Nesse estudo foi estabelecido que uma estreita faixa de atividade enzimática é responsável por uma grande variedade de manifestações clínicas. Sendo assim a combinação da atividade residual da enzima e o substrato fornecem uma previsão satisfatória sobre o comprometimento neurológico. E a combinação de todos os fatores analisados fornece informações importantes para se estabelecer diferentes subtipos de MPS I.

DIAGNÓSTICO

Conforme mencionado anteriormente, a MPS I é caracterizada por diferentes sinais e sintomas, os quais indicam a presença da doença. A partir de uma suspeita clínica, são solicitados testes bioquímicos específicos, que incluem a análise de GAGs e a medida da atividade enzimática. Geralmente o ensaio enzimático é feito em plasma, leucócitos ou sangue

impregnado em papel filtro, enquanto as análises de GAGs são realizadas em urina por dosagem colorimétrica, cromatografia em camada delgada ou eletroforese (Neufeld *and* Muenzer, 2001).

O diagnóstico bioquímico, apesar de definitivo, é pouco informativo quanto à gravidade da doença, sendo necessária a análise molecular, que é feita a partir de DNA obtido geralmente de sangue periférico. A metodologia usualmente utilizada em nosso laboratório inicia com a extração de DNA pelo método de Miller *et al* (1988) e posterior amplificação de quatro éxons do gene *IDUA* (2, 8, 9 e 11), através de *primers* que anelam na região intrônica adjacente. Após verificação da amplificação, esses fragmentos são clivados por enzimas de restrição específicas, que permitem a identificação das mutações comuns na população brasileira p.Q70X e p.R89Q, p.R383H, p.W402X e p.P533R. Esta última mutação é analisada diretamente através da comparação da distância de migração em eletroforese vertical em gel de poliacrilamida após desnaturação, um procedimento denominado SSCP (*Single Strand Conformational Polymorphism*). São comparadas a amostra em teste, um homocigoto e um heterocigoto para a mutação, além de um controle normal.

Para aqueles pacientes que não tem o seu genótipo estabelecido após a triagem das mutações acima, é feita a amplificação dos demais éxons e análise de SSCP de cada um deles. A triagem por SSCP visa identificar fragmentos com padrão de mobilidade alterado que posteriormente serão purificados e submetidos à análise por seqüenciamento (Matte *et al* 2003). A triagem de mutações por SSCP visa reduzir os custos do seqüenciamento de um grande número de éxons, entretanto sua utilização adiciona um tempo significativo na análise de mutações.

Tendo em vista que o diagnóstico molecular é importante para a definição da correlação genótipo-fenótipo, para o aconselhamento genético e até mesmo para a escolha de abordagens terapêuticas, faz-se necessária a otimização de um método de análise rápido, confiável e acessível do ponto de vista econômico que possa ser utilizado na rotina de atendimento a esses pacientes.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Estabelecer um método de diagnóstico molecular para MPS I mais rápido e com menor custo do que a abordagem atualmente utilizada no SGM-HCPA.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Comparar o tempo e os custos das metodologias de análise por DNA e RNA.
2. Padronizar o método de diagnóstico molecular através da análise de RNA.
3. Validar o método de diagnóstico molecular através da análise de RNA utilizando amostras de pacientes com diagnóstico molecular já estabelecido.
4. Propor uma estratégia otimizada de análise de DNA para melhorar o processo de diagnóstico dos pacientes MPS I.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi composto por três etapas principais, as quais serão descritas em detalhe a seguir:

1. Análise de tempo e custo da detecção de mutações através do seqüenciamento direto do cDNA em comparação com a análise de DNA tradicional;
2. Padronização e validação de um método de seqüenciamento direto de cDNA;
3. Proposta de um protocolo mais eficiente para detecção de mutações em MPS I.

1 ANÁLISE DE TEMPO E CUSTO DA DETECÇÃO DE MUTAÇÕES ATRAVÉS DO SEQÜENCIAMENTO DIRETO DO cDNA EM COMPARAÇÃO COM A ANÁLISE DE DNA TRADICIONAL

A comparação entre as duas abordagens foi feita através de levantamentos do tempo gasto para o desenvolvimento de cada uma das técnicas e do custo médio de diagnóstico molecular por paciente. Para a análise tradicional foram considerados tanto o rastreamento de 5 mutações comuns distribuídas em 4 éxons, quanto a genotipagem completa, ou seja, a análise dos 14 éxons.

Para o levantamento do tempo, foi utilizado o tempo médio de cada etapa, conforme a Tabela 3, sendo que algumas etapas são comuns a ambas as técnicas enquanto outras apresentam variações. Em ambos os métodos a etapa inicial considerada foi a extração de DNA/cDNA e a etapa final o seqüenciamento. O tempo total calculado para cada etapa foi obtido multiplicando-se o valor médio pelo número de vezes em que essa etapa foi realizada para cada técnica.

Tabela 3: Tempo médio em horas de cada etapa da análise de DNA e RNA

Etapa	Tempo médio	DNA	RNA
Extração	12 horas/4 horas ¹	x 1	x 1
Conversão para cDNA	1,5 horas	Não usado	x 1
PCR	2,5 horas	x 13 ²	x 5
Verificação de PCR	1 hora ³	x 13	x 5
Digestão	6,5 horas	x 3	Não usado
Verificação de digestão	2,5 horas ³	x 3	Não usado
SSCP	2,5 horas ³	x 12	Não usado
Purificação de PCR	1 hora	x 13	x 5
Seqüenciamento	4,7 horas ⁴	x 1	x 1

Fonte: Dados da Pesquisa

¹O tempo de 12 horas é referente ao método de análise por DNA, enquanto o tempo de 4 horas corresponde à análise por RNA.

² Os éxons 11 e 12 são amplificados na mesma reação.

³ Incluído tempo de aplicação das amostras e eletroforese

⁴ Incluído tempo para reação de seqüenciamento, purificação e corrida em seqüenciador automatizado de 16 capilares.

Para a análise dos custos, foram utilizados os valores existentes em uma planilha financeira elaborada por um administrador (Anexo B), a qual contabiliza desde o custo com reagentes, quanto com materiais diversos (como luvas, tubos, etc) e pessoal para realização da tarefa (Schlatter RP, 2006). Os valores utilizados foram atualizados através de contato com fornecedores realizados entre julho e outubro de 2010.

As análises não levaram em consideração falhas de amplificação ou necessidade de repetição de experimentos em nenhuma das técnicas comparadas.

2 PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO DE SEQÜENCIAMENTO DIRETO DE cDNA

A análise por cDNA foi padronizada utilizando *primers* para amplificação do cDNA completo em 5 reações de PCR que originam fragmentos com extremidades sobreponíveis.

Os pares de *primers* sobrepostos foram desenhados utilizando os *softwares* Vector NTI e IDT, possibilitando montar na íntegra todo o cDNA. Conforme ilustra a Figura 3, o primeiro par de *primers* (5' CGCCAGACTCCGACCCG 3' e 5' CGGTAGGTACGGACTGGCG 3') se anela no início do éxon 1 e na junção dos éxons 4 e 5, produzindo um fragmento de 583pb (Genbank NM_000203.3). O segundo par (5' GCTTGTCACCACCAGGGGG 3' e 5' GGAGCAGGAGAAGGTCGTCGC 3') se anela na junção dos éxons 2 e 3 e no início do éxon 7, amplificando uma seqüência de 555pb. Os *primers* 5' GCGTGCGGCTGGACTACATC 3' e 5' GCGAGCGACGACACCCG 3' geram um fragmento de 583pb e são complementares ao final do éxon 6 e à região central do 9. O quarto par (5' CCTGGACAGCAACCACAC 3' e 5' GTTCTGGTCTGGTCGGATG 3') se anela no início do éxon 9 e no final do 12 amplificando um fragmento de 479pb. O último par de *primers* (5' CCGTCGCTTTTGCTGGTGC 3' e 5' CCTCCCATCACCCCCTTTGC 3') se anela na porção final dos éxons 11 e 14, produzindo um fragmento de 460pb. Foram testadas diferentes temperaturas de anelamento (de 50°C a 65°C), concentrações de MgCl₂ variando de 1 a 4 mM, dNTP (0,2 a 0,4 mM) e uso de DMSO (Dimetilsulfóxido). A padronização das condições de PCR foi realizada utilizando uma amostra de DNA plasmidial contendo o cDNA de *IDUA*.

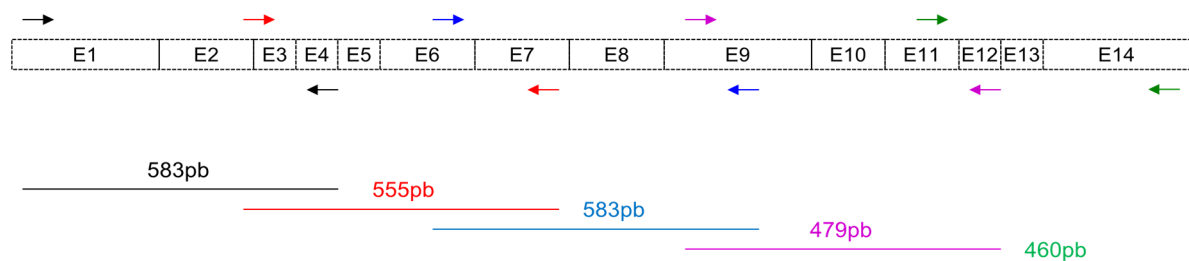


Figura 3: Desenho esquemático do gene *IDUA* com a localização dos *primers* e seus respectivos tamanhos de *amplicons*

A confirmação da correta amplificação dos *amplicons* foi realizada por eletroforese em gel de agarose de 1,5% corado com brometo de etídio e as amostras foram submetidas a um campo elétrico nas seguintes condições: 95voltage, 300mA por 30 min.

Para a validação da técnica em um grupo de pacientes foram coletadas novas amostras de sangue de dois pacientes com diagnóstico molecular realizado por análise de DNA. O sangue foi coletado em tubos especiais (*Pax tube* - Qiagen) para evitar a degradação da molécula de RNA, a qual foi extraída com o kit *PaxGene* (Qiagen). De outros três pacientes, o RNA foi obtido a partir de fibroblastos cultivados. Nesses casos, a extração foi feita com o kit RNeasy (Qiagen). Após, foi feita a conversão de 5µg de RNA total para cDNA, através da enzima *SuperScript II Reverse Transcriptase* e RNaseOUT (Invitrogen).

Os fragmentos de PCR foram amplificados conforme método padronizado e após a confirmação da amplificação foram purificados com EXO I (Exonuclease I) e SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*) e, enviados para seqüenciamento automatizado no SGM-HCPA. Os produtos seqüenciados foram analisados no *software* Chromas Lite.

3 PROPOSTA DE UM PROTOCOLO MAIS EFICIENTE PARA DETECÇÃO DE MUTAÇÕES EM MPS I.

O número de mutações encontradas em cada éxon do gene *IDUA* foi obtido no HGMD. A frequência absoluta das mutações foi calculada de acordo a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{N}^\circ \text{ de mutações no éxon}}{\text{N}^\circ \text{ total de mutações no gene}}$$

A frequência cumulativa foi calculada a partir da soma das frequências absolutas após o agrupamento dos éxons em quatro categorias: no grupo A éxons com 9 ou mais mutações descritas; no grupo B éxons com 4 a 8; o grupo C incluiu éxons com 2 ou 3 mutações; e o D aqueles com menos de 2 mutações descritas.

A frequência relativa das mutações em pacientes sul-americanos com MPS I foi obtida a partir de um banco de pacientes com MPS I já diagnosticados do Serviço de Genética Médica (SGM) entre 1996 e 2009 por análise de DNA. Este banco possui um total de 176 pacientes, dos quais 98 foram genotipados. Para cálculo da frequência foi usada a fórmula:

$$\frac{\text{N}^\circ \text{ de alelos mutados no éxon}}{\text{N}^\circ \text{ total de alelos mutados no gene}}$$

RESULTADOS

1 ANÁLISE DE TEMPO E CUSTO DA DETECÇÃO DE MUTAÇÕES ATRAVÉS DO SEQÜENCIAMENTO DIRETO DO cDNA EM COMPARAÇÃO COM A ANÁLISE DE DNA TRADICIONAL

A avaliação de tempo e custo da detecção de mutações através do seqüenciamento direto do cDNA em comparação com a análise de DNA tradicional revelou uma série de vantagens do método alternativo, tanto em termos de tempo despendido, quanto de custo.

Como a análise de cDNA compreende o seqüenciamento total de toda a região codificante, inicialmente foi feita a comparação com o seqüenciamento completo do gene *IDUA*. A análise do DNA de todo o gene *IDUA* leva 121,2 horas enquanto a análise de todo o mRNA do mesmo gene leva apenas 38,7 horas (Gráfico 1). Os valores e tempos de cada etapa estão detalhados na Tabela 4.

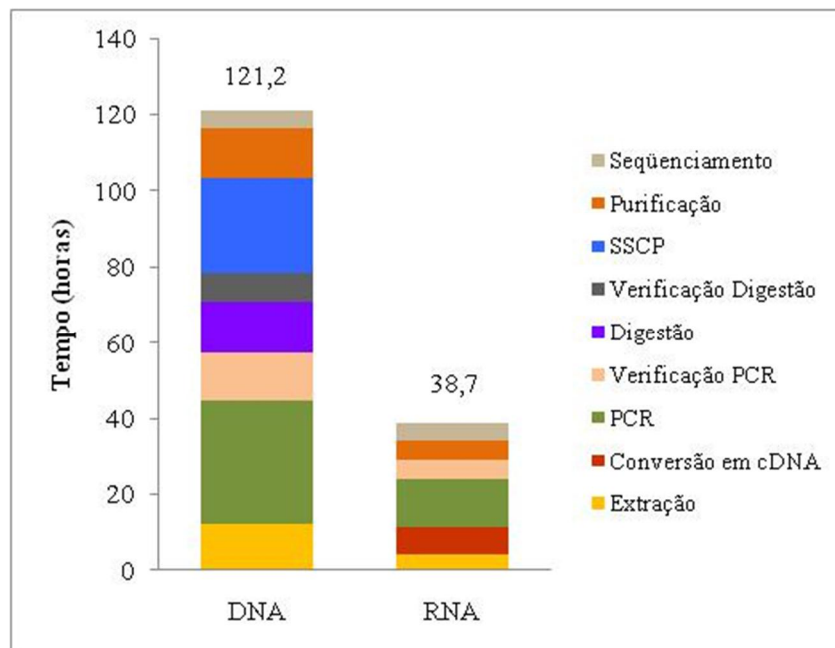


Gráfico 1: Tempo médio de análise de todo o gene *IDUA* através de análise por DNA e RNA, com destaque para o tempo de cada etapa em particular, por paciente

Tabela 4: Tempo e custo detalhados de cada etapa envolvida na análise por DNA e RNA por paciente

	Tempo (horas)		Custo (R\$)	
	DNA	RNA	DNA	RNA
Extração ⁵	12	4	R\$ 20,32	R\$ 98,07
Conversão em cDNA	0	7,5	R\$ 0,00	R\$ 45,02
PCR	32,5	12,5	R\$ 199,68	R\$ 76,80
Verificação PCR	13	5		
Digestão	19,5	0	R\$ 45,00	R\$ 0,00
Verificação Digestão	7,5	0		
SSCP	25	0	R\$ 147,50	R\$ 0,00
Purificação	13	5	R\$ 164,78	R\$ 58,85
Seqüenciamento	4,7	4,7	R\$ 350,00	R\$ 125,00
Totais	127,2	38,7	R\$ 927,28	R\$ 403,74

Fonte: Dados da Pesquisa

⁵Método de Miller *et al* 1988.

Entretanto, uma vez que para muitos pacientes é feito apenas o rastreio para as mutações comuns, ambas as metodologias foram comparadas apenas para a detecção dessas mutações (amplificação dos éxons 2, 8, 9 e 11-12 seguido por digestão enzimática ou SSCP no caso do DNA ou seqüenciamento no caso de cDNA). Neste caso, o uso de cDNA despenderia cerca de 50% menos tempo que a técnica tradicional (Gráfico 2).

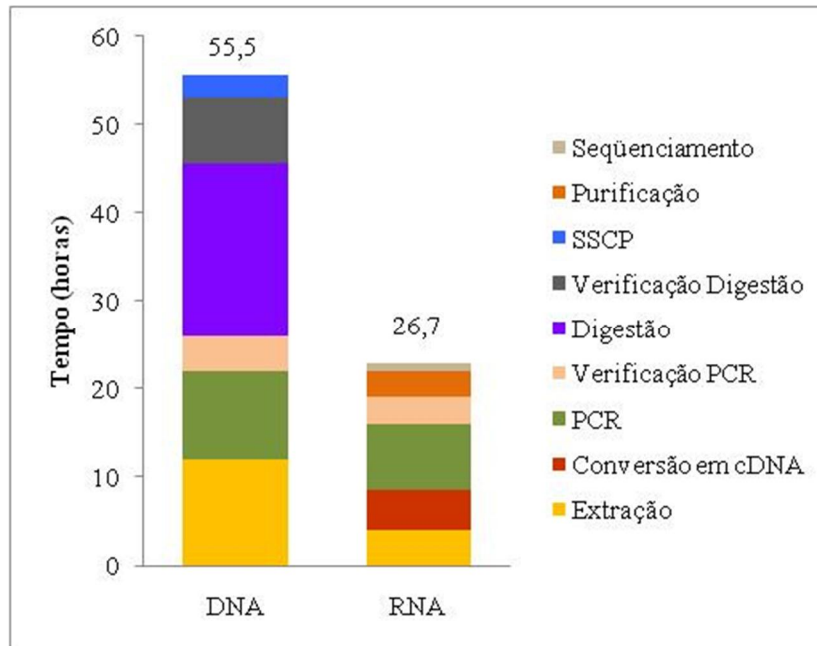


Gráfico 2: Tempo médio de rastreamento por mutações comuns no gene *IDUA* através de análise por DNA e RNA, com destaque para o tempo de cada etapa em particular, por paciente

O custo médio, em reais, para genotipagem completa de cada paciente usando DNA foi de R\$ 927,28, enquanto por RNA, esse custo baixa para R\$ 403,74 (Gráfico 3).

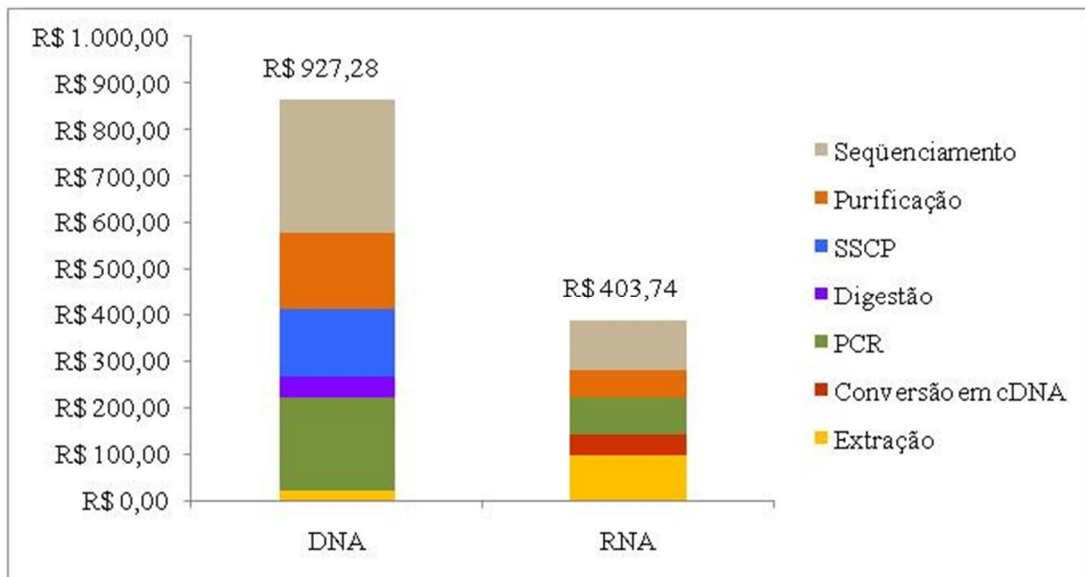


Gráfico 3: Custo médio de análise de todo o gene *IDUA* através de análise por DNA e RNA, com destaque para o custo de cada etapa em particular.

Os custos também foram comparados na situação em que apenas as mutações comuns fossem contempladas. Essa comparação evidenciou que a análise por cDNA nesse caso custaria mais que o dobro que o estudo por DNA (Gráfico 4).

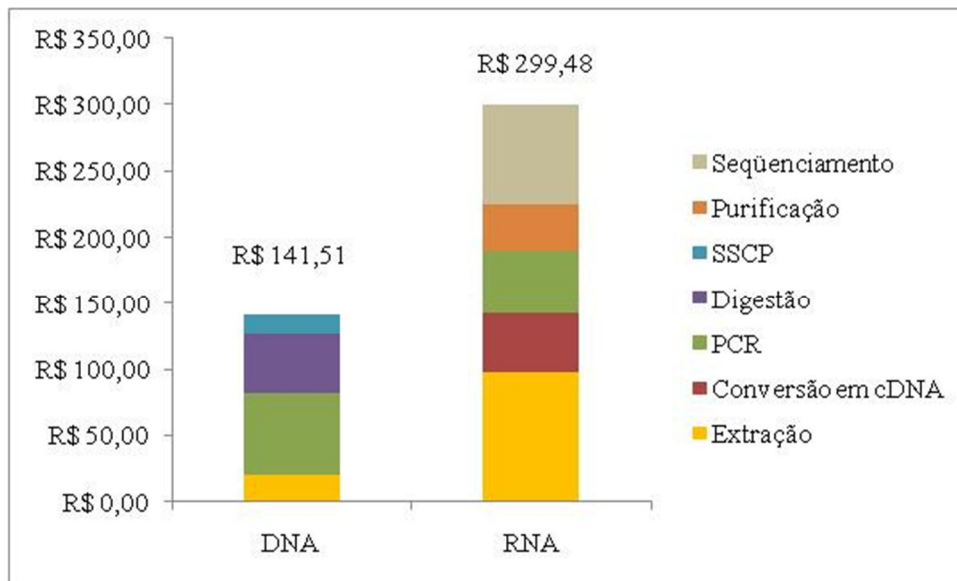


Gráfico 4: Custo médio para diagnóstico de mutações comuns no gene *IDUA* através de análise por DNA e RNA, com destaque para o tempo de cada etapa em particular, por paciente

2 PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO DE SEQUENCIAMENTO DIRETO DE cDNA

As condições de amplificação que obtiveram os melhores resultados utilizaram 5ng de cDNA, tampão de amônia 1X (160mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 670mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1% (v/v) e Tween 20), DMSO 10%, 1,5mM de MgCl_2 , 0,4mM dNTP, 20pmol de cada *primer* e 1U de Taq DNA-polimerase em um volume total de 25 μL . O *amplicon* 4 não necessitou adição de DMSO e utilizou 2mM de MgCl_2 , enquanto que o *amplicon* 5 foi padronizado com 1,76mM de MgCl_2 . As condições para as reações de amplificação foram desnaturação inicial de 5min a

94°C. Em seguida 1min de desnaturação na mesma temperatura, anelamento por 1min a diferentes temperaturas (Tabela 5), extensão de 1min e 30s a 72°C, sendo essas condições repetidas 35 vezes. Foi realizada uma extensão final de 10min a 72°C e os produtos amplificados foram conservados a 4°C até a revelação.

Tabela 5: Temperatura de anelamento dos *amplicons* na análise por cDNA.

<i>Amplicon</i>	Temperatura de anelamento
1	59°C
2	56°C
3	55°C
4	61°C
5	56°C

Fonte: Dados da Pesquisa

Quando submetidas à eletroforese em gel de agarose obteve-se uma banda única e definida, de tamanho adequado (Figura 4).

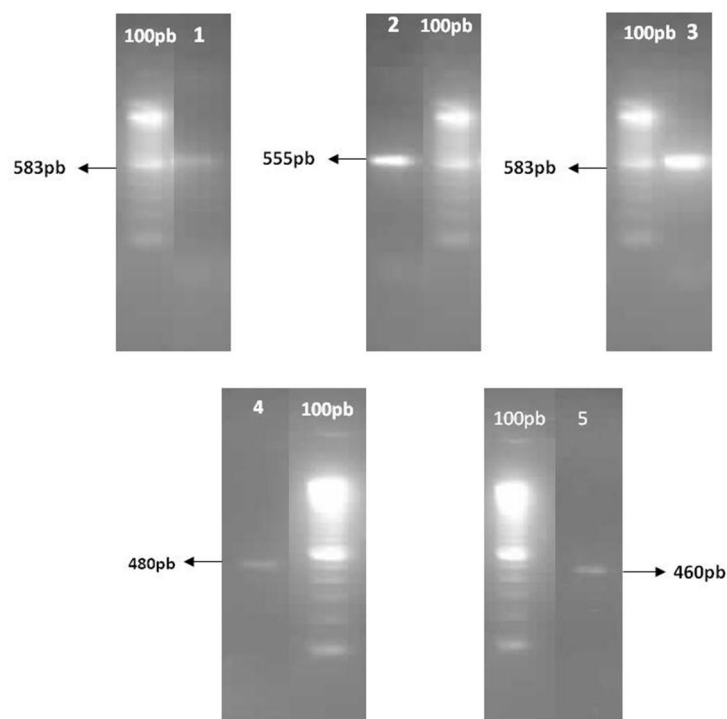


Figura 4: Fotos de eletroforeses em gel de agarose 1,5% com as bandas correspondentes aos 5 *amplicons*.

Para validar a metodologia proposta, foram analisados 5 pacientes com diagnóstico molecular de MPS I já descrito (Matte *et al* 2003), conforme mostra a Tabela 6.

Tabela 6: Genótipo dos cinco pacientes utilizados para validação da análise de cDNA

Pacientes	Alelo 1	Alelo 2
A	p.P533R	p.R383H
B	p.W402X	p.W402X
C	p.W402X	g.3308_3319del
D	p.Q70X	IVS11-1g>t
E	p.W402X	p.R89Q

Fonte: Matte *et al* 2003

A extração de RNA dos pacientes resultou em sua maioria em amostras com cerca de 80ng/μL.

Paciente A

A troca de uma guanina por uma adenina que caracteriza a mutação p.R383H pode ser claramente visualizada em heterozigose na Figura 5. Não foi possível obter um seqüenciamento de qualidade da mutação p.P533R, apesar da amplificação ter funcionado.

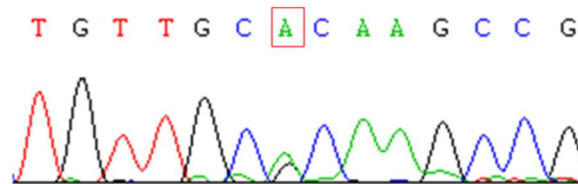


Figura 5: Mutação p.R383H em heterozigose no cDNA do paciente A

Paciente B

A mutação p.W402X, que acarreta um códon de terminação prematuro, está presente em homozigose nesse paciente. Apesar de inúmeras tentativas, não foi possível a amplificação de nenhum dos cinco *amplicons* desse indivíduo.

Paciente C

A substituição de uma guanina por uma adenina no códon 402, alteração que caracteriza a mutação p.W402X pode ser observada com dificuldade no seqüenciamento do cDNA abaixo (Figura 6). A heterozigose para essa mutação é notada devido a um pequeno sinal do aminoácido adenina (A).

A mutação g.3308_3319del é a deleção de 12pb do meio do íntron 11 que afeta o *splice* do mRNA. O *amplicon* 4, que compreende o fragmento entre os éxons 9 e 12, nunca foi obtido, apesar de inúmeras tentativas.

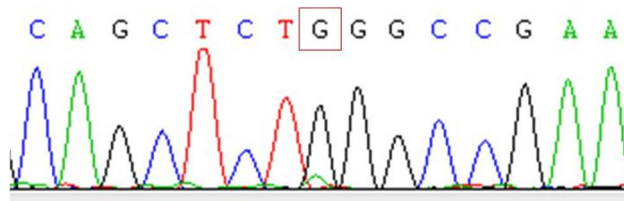


Figura 6: Mutação p.W402X em heterozigose no cDNA do paciente C

Paciente D

A mutação p.Q70X, decorrente da troca de uma citosina por uma timina no códon 70, leva a substituição de uma glutamina por um códon de terminação e o alelo com essa mutação não foi visível por seqüenciamento (Figura 7).

A mutação IVS11-1g>t é uma mutação no sítio de *splice*. O *amplicon* 4, que compreende o fragmento entre os éxons 9 e 12, nunca foi obtido, apesar de inúmeras tentativas.

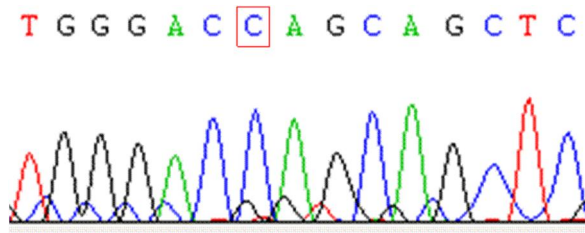


Figura 7: Mutação p.Q70X não visível no cDNA do paciente D

Paciente E

A mutação p.R89W ocorre pela substituição de uma citosina por uma timina, a qual pode ser observada em aparente homozigose na Figura 8.

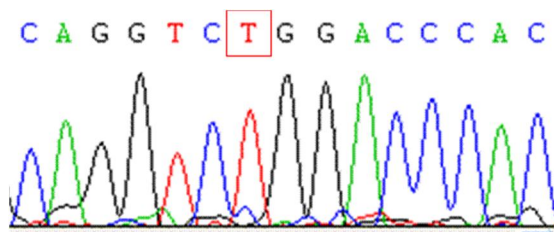


Figura 8: Mutação p.R89W em homozigose no cDNA do paciente E

A mutação p.W402X, decorrente da substituição de uma guanina por uma adenina no códon 402, não é visível no seqüenciamento do cDNA (Figura 9).

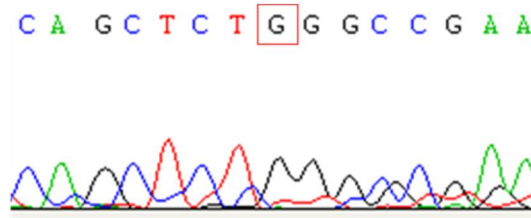


Figura 9: Mutação p.W402X não visível no cDNA do paciente E

Em resumo, os resultados obtidos através da análise de cDNA para os pacientes estudados, em comparação com o resultado obtido por DNA encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7: Comparativo dos diagnósticos por DNA e RNA dos pacientes analisados

Pacientes	DNA		cDNA	
	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
A	p.P533R	p.R383H		p.R383H
B	p.W402X	p.W402X	Não amplificou	
C	p.W402X	g.3308_3319del	p.W402X ?	Não amplificou 4 e 5
D	p.Q70X	IVS11-1g>t	<i>Amplicons</i>	Não amplificou 4 e 5
E	p.W402X	p.R89Q	p.R89W	p.R89W

Fonte: Dados da Pesquisa

3 PROPOSTA DE UM PROTOCOLO MAIS EFICIENTE PARA DETECÇÃO DE MUTAÇÕES EM MPS I.

O levantamento no HGMD totalizou 75 mutações sem sentido ou com sentido trocado, distribuídas entre os 14 éxons do gene *IDUA*, conforme demonstra o Gráfico 5. A Tabela 8 mostra o agrupamento desses éxons e a frequência cumulativa dessas mutações.

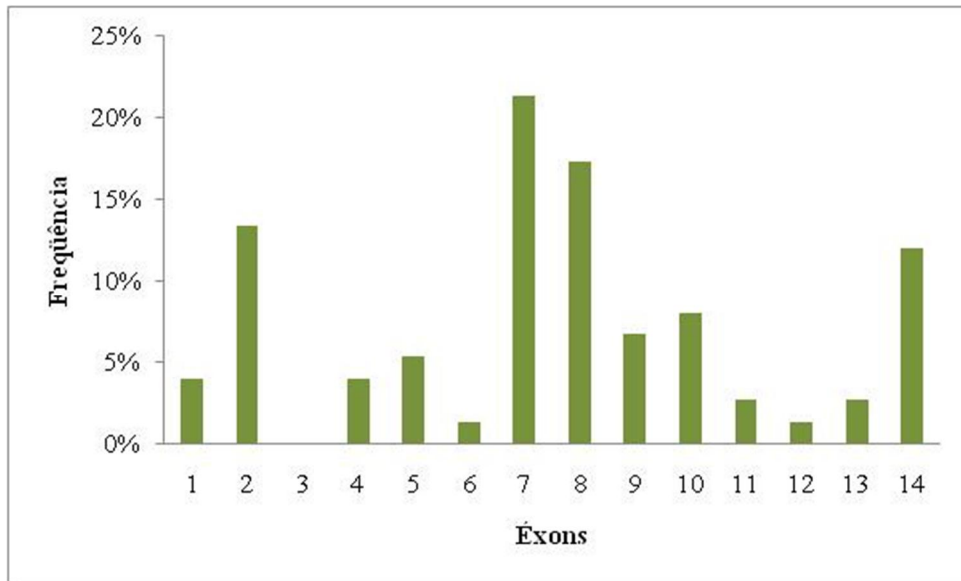


Gráfico 5: Frequência absoluta das mutações descritas para cada éxon do gene *IDUA*.

Tabela 8: Frequência Cumulativa das mutações descritas para o gene *IDUA*.

Grupos	Nº de Éxons	Freq.Cum.	Éxons
A	4	64%	2, 7, 8 e 14
B	3	84%	5, 9 e 10
C	4	97%	1, 4, 11 e 13
D	3	100%	3, 6 e 12

Fonte: Dados da Pesquisa

De acordo com esses dados, o estudo de apenas 4 éxons do grupo A seria suficiente para caracterizar 64% das mutações e com apenas mais 3 éxons (grupo B) teríamos 84% dos alelos identificados.

Entretanto, se usarmos como população amostral o banco de pacientes sul-americanos já diagnosticados no SGM o resultado é bastante diverso (Gráfico 6). Se fossem analisados os 4 éxons do grupo A, seriam encontradas apenas 23% das mutações e com a análise conjunta com o grupo B chegar-se-ia a 72%. Ou seja, uma redução de 12% em relação aos 84% previstos.

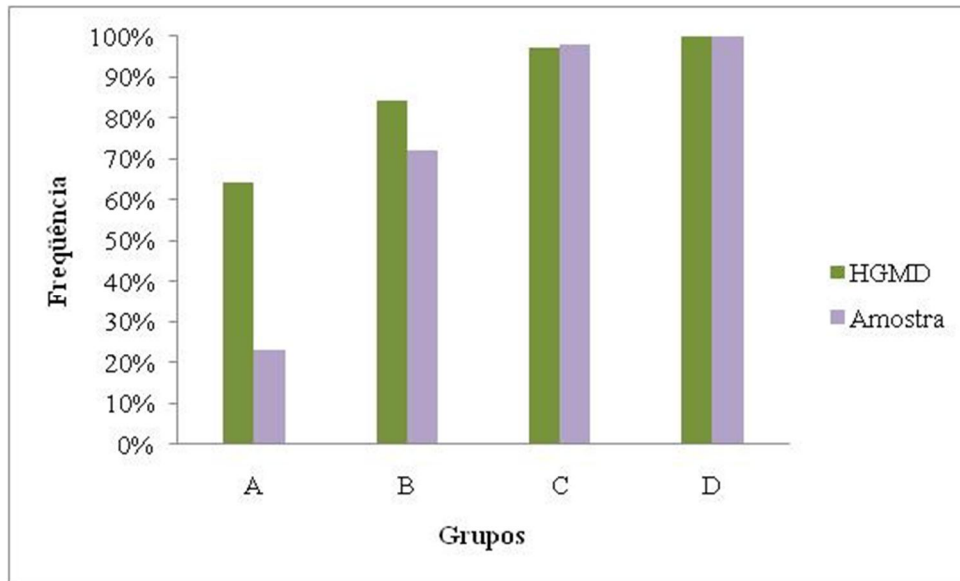


Gráfico 6: Comparativo entre a análise proposta pelo HGMD e a frequência cumulativa aplicada a nossa população amostral de 176 pacientes.

Redistribuindo os agrupamentos acima de acordo com a frequência de mutações encontrada em nosso meio (Gráfico 7), de forma que o grupo A contenha aqueles éxons com mutações mais frequentes em nossa população, os resultados tornam-se bem mais satisfatórios (Tabela 9).

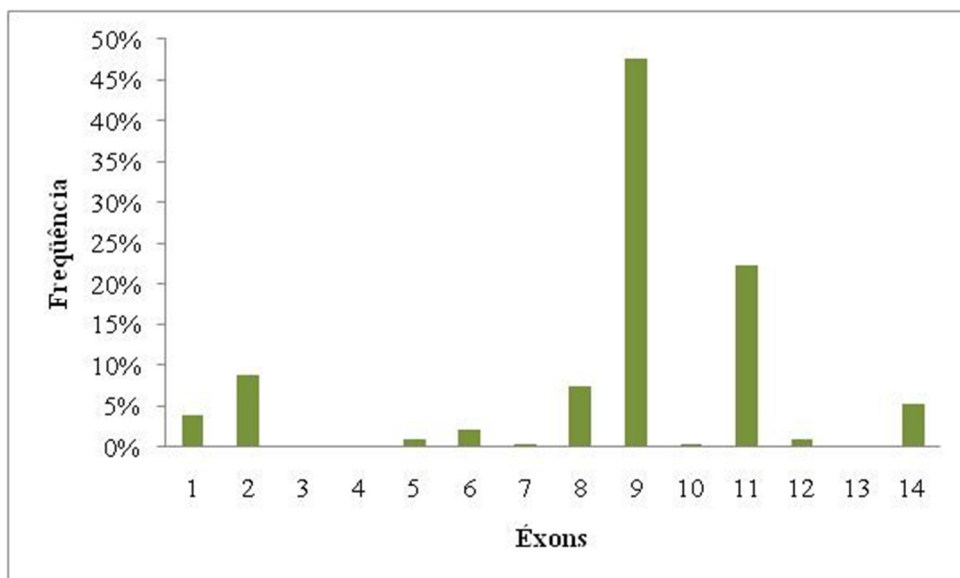


Gráfico 7: Frequência das mutações em 176 pacientes

Tabela 9: Agrupamento proposto baseado nas freqüências das mutações encontradas na população amostral

Grupos	Nº de Éxons	Éxons
A	2	9 e 11
B	2	2 e 8
C	4	1, 5, 6 e 14
D	6	3, 4, 7, 10, 12 e 13

Fonte: Dados da Pesquisa

Através dessa análise teríamos 70% dos alelos com o estudo de apenas 2 éxons e com mais 2 éxons encontraríamos as mutações de 86% dos alelos dos nossos pacientes (Gráfico 8).

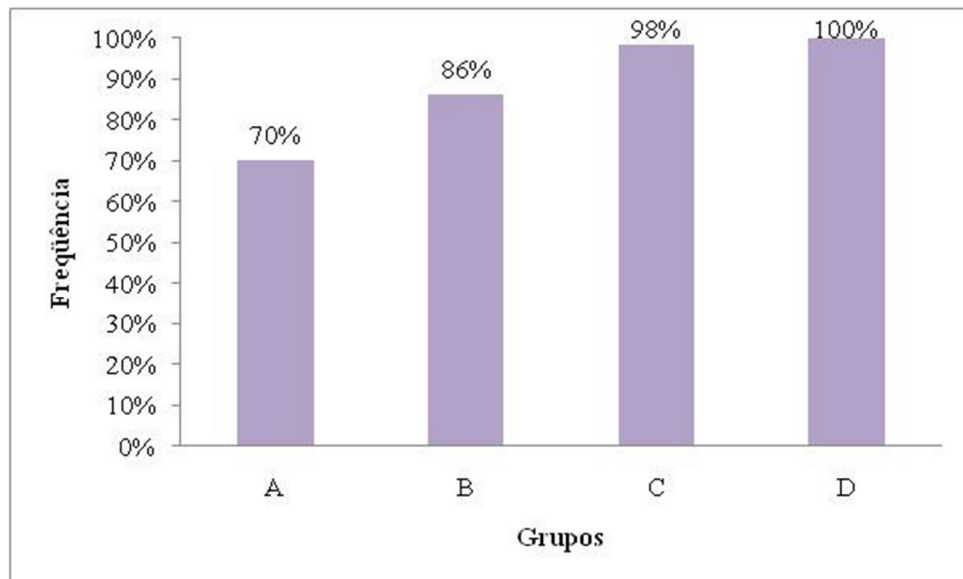


Gráfico 8: Frequência Cumulativa das mutações encontradas para o gene *IDUA* na nossa população amostral de 176 pacientes

DISCUSSÃO

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo principal de estabelecer uma metodologia mais eficiente para diagnosticar pacientes com mucopolissacaridose tipo I. Como a metodologia tradicional está focada na busca por mutações comuns, em alguns casos o genótipo dos pacientes não é estabelecido por completo. Caso esse ou outro método de análise fosse ampliado para varrer os 14 éxons do gene *IDUA*, ter-se-ia provavelmente, o genótipo completo da grande maioria dos pacientes.

Sendo assim, resolveu-se buscar uma metodologia que atendesse a essa necessidade de varredura completa ou, pelo menos, mais abrangente do gene, porém com baixo custo e tempo de análise reduzido. Inúmeras foram as possibilidades de abordagem, cada uma delas com suas vantagens e desvantagens. A técnica deveria ser viável em termos de tempo e financeiramente a fim de atender às necessidades estabelecidas.

Seqüenciar o gene inteiro pela metodologia tradicional levaria muito tempo e teria um custo relativamente elevado em função do número de éxons. A produção de *amplicons* longos que possam ser seqüenciados internamente (Matte *et al* 2010) reduziria o tempo porém não seria financeiramente vantajoso devido ao alto custo da *Taq* DNA-polimerase utilizada neste processo. A triagem por SSCP usada na abordagem tradicional e o seqüenciamento apenas dos éxons com mobilidade alterada é uma técnica com baixo custo e já padronizada para uso em pacientes MPS I. Essa técnica se baseia na aplicação de amostras desnaturadas à eletroforese em géis de poliacrilamida não-desnaturantes. A conformação secundária adotada pelas fitas simples durante a migração é dependente de seqüência primária de nucleotídeos, portanto alterações no padrão de migração entre duas amostras indicam uma diferença nas suas seqüências de bases. É uma técnica inadequada para fragmentos menores que 200pb ou

maiores que 400pb, possuindo sensibilidade limitada (Strachan *and* Read 2002), além de ser bastante trabalhosa e consumir muito tempo.

Técnicas como ensaios TaqMan e ARMS-PCR (*Amplification Refractory Mutation System*), são mais apropriadas para mutações conhecidas e poderiam ser usados nas etapas de triagem. A técnica de ARMS baseia-se na utilização de dois pares de *primers*, cada um específico para um tipo de região, ou seja, um específico para a região mutante e outro para a mesma região sem a mutação. O método de análise por TaqMan parte do mesmo princípio, porém são usados *primers* e uma sonda marcada com fluoróforo, a qual vai emitir fluorescência quando degradada pela atividade exonucleásica da *Taq* DNA-polimerase (Strachan *and* Read, 2002). A técnica de TaqMan já foi usada em doenças lisossômicas de depósito, gangliosidose GM1, em modelo animal para testar a eficiência no diagnóstico e foi obtido resultado semelhante ao uso de enzimas de restrição (RFLP ó *Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Chang *et al* 2010). Apesar de que não se encontra tantas mutações novas para o gene *IDUA*, o desenvolvimento de inúmeras sondas ou *primers* específicos para cada uma dessas mutações tornaria o experimento inviável financeiramente.

Metodologias de triagem por dHPLC (*Denaturing High-Performance Liquid Chromatography*) ou HRM (*High Resolution Melting*) também podem ser interessantes. O dHPLC está baseado na análise da mobilidade de fitas homo e heteroduplex de DNA em uma coluna cromatográfica (Strachan *and* Read, 2002). Esse método já foi testado para diagnosticar pacientes com MPS I e apresentou eficiência e sensibilidade satisfatórias (Kasper *et al* 2010). O HRM se baseia no aquecimento da dupla fita de uma seqüência amplificada de DNA e a posterior análise da temperatura e do nível de fluorescência emitida (Wittwer *et al* 2003). A desvantagem nesses casos é o longo tempo do processo de padronização e a necessidade de equipamentos especializados e de alto custo.

Pensou-se então na análise por cDNA, a qual faria a varredura de todo o mRNA em apenas cinco reações de amplificação, ao invés das treze reações propostas pelo método tradicional. Foram feitos levantamentos comparativos de tempo e custo de todas as etapas envolvidas em ambas as metodologias para se estabelecer as vantagens e desvantagens de cada uma delas. Os levantamentos demonstraram uma grande vantagem da análise por cDNA, visto que essa estratégia mostrou-se mais rápida (redução de 70% no tempo gasto para pesquisa de todo o gene) e menos onerosa (cerca de 55% menos) que a metodologia tradicional. Mesmo se utilizada apenas para o diagnóstico de mutações comuns, a pesquisa através do cDNA ainda levaria vantagem com relação ao tempo, apesar de ter um custo mais alto. A metodologia proposta previa a busca por mutações comuns em 50% menos tempo que a tradicional. Decidiu-se então apostar nessa estratégia, que parecia bastante vantajosa, e passou-se para a etapa de padronização da técnica.

Foram desenhados *primers* específicos para cDNA e as padronizações dos *amplicons* foram estabelecidas após inúmeras tentativas. Apesar de os *softwares* específicos para desenhos de *primers* indicarem a temperatura ideal de anelamento, essa pode variar, tanto que em nenhuma das amplificações foi mantida a temperatura original indicada, visto que em condições específicas de certos reagentes os *primers* podem variar um pouco sua temperatura de anelamento (Burpo 2001). Além disso, a concentração dos reagentes também variou bastante da estabelecida originalmente. Foi realizada uma curva de magnésio, que é um cofator da enzima que faz a extensão da fita amplificada, e adição de tampões específicos para facilitarem o anelamento dos *primers*, como o tampão de amônia, que facilita essa reação em regiões ricas em GC (caso do gene *IDUA*) e DMSO, o qual aumenta a eficiência e a especificidade dos *primers*. (Chakrabarti and Schutt, 2001).

Após a padronização das amplificações, passou-se para a etapa de aplicação da técnica nas amostras dos pacientes. Foram selecionados pacientes com tipos diversos de mutações a fim de validar a nova metodologia de forma mais abrangente.

Na padronização do método de análise por cDNA, as tentativas de amplificação foram feitas em controles normais, portanto todos amplificavam com a mesma eficiência. Já nas amostras de pacientes com mutações do tipo *stop-codon* esses produtos não amplificaram ou amplificaram com grande dificuldade, apresentando uma banda bem fraca quando revelada em gel de agarose. Assim sendo, mesmo nos pacientes em que foi possível visualizar algum sinal desse tipo de mutação, o pico no seqüenciamento ficou bastante baixo, praticamente impossível de se inferir um diagnóstico preciso. Provavelmente a razão para esse insucesso da amplificação tenha sido a degradação do mRNA de *IDUA* pelo complexo NMD (*Nonsense-Mediated mRNA Decay*). A degradação do mRNA mediada por mutações sem sentido (NMD) é um sistema de vigilância que degrada mRNAs com códons de terminação prematuros. São considerados códons de terminação prematuros, para mamíferos, aqueles localizados de 50 a 54 nucleotídeos da porção 5' da junção éxon-éxon (Inácio *et al* 2004). Esse sistema evita, com algumas exceções (Asselta *et al* 2001), que moléculas com essa característica originem proteínas malformadas, impedindo assim traduções desnecessárias. Especificamente em MPS I esse sistema foi descrito por Menon *and* Neufeld (1994) evidenciando a instabilidade do mRNA de pacientes homozigotos para mutações sem sentido, os quais não possuíam essa molécula em níveis suficientes para serem detectadas. Anos depois, Hein *et al* (2004) fizeram um estudo de expressão introduzindo as mutações sem sentido p.W402X e p.Q70X em cultivo celular e confirmaram a hipótese anterior de redução dos níveis de mRNA. Inclusive nesse estudo foi obtida uma redução significativa de mRNAs nas células que foram mutadas para p.W402X.

Essa é uma limitação importante da técnica, especialmente visto que mais de 60% (Matte, comunicação pessoal) dos pacientes sul-americanos com MPS I apresentam mutações sem sentido. No paciente homozigoto para p.W402X, por exemplo, não se obteve sucesso nem mesmo nas amplificações, pois provavelmente seu mRNA havia sido totalmente degradado. Além disso, alguns pacientes heterozigotos para uma mutação sem sentido e outra mutação de sentido trocado podem ser falsamente identificados como homozigotos para a mutação de sentido trocado, como ocorreu com o paciente E.

Além disso, também houve dificuldade em amplificar fragmentos com mutações nos íntrons, descritas como possíveis de alterarem o sítio de *splice* nessas moléculas. Novamente, os fragmentos que compreendiam essas mutações não foram amplificados e, quando amplificados, os seqüenciamentos não ficaram definidos o suficiente para inferir um diagnóstico. Provavelmente, afetando o sítio de *splice*, o mRNA desses pacientes não apresentava as regiões próximas nas quais os *primers* desenhados se anelariam, já que alguns deles se anelavam na junção éxon-éxon. Foi o caso da mutação g.3308_3319del, por exemplo, possível de afetar o sítio de *splice* (Matte *et al*, 2003). O *amplicon* desse paciente que compreende essa mutação não amplificou apesar de inúmeras tentativas.

As mutações de sentido trocado, por outro lado, foram facilmente visualizadas por seqüenciamento. Inclusive, ao seqüenciar um paciente anteriormente genotipado como heterozigoto para a mutação p.R89Q (paciente E) viu-se que a mutação existente era a p.R89W (Bunge *et al* 1995). A análise dessa mutação pela metodologia tradicional é feita através da clivagem de fragmentos com a enzima de restrição *MspI*, que reconhece o sítio 5' C_CGG 3' e cliva o DNA sem alteração. Portanto, independente da troca do nucleotídeo, a enzima reconhecerá o sítio alterado e não clivará. Essa é uma limitação da técnica de análise de DNA por enzimas de restrição, já que os fragmentos não são seqüenciados rotineiramente.

Existe uma correlação genótipo-fenótipo bem estabelecida para MPS I (Fuller *et al* 2005) e a identificação precisa da substituição de aminoácidos pode ter repercussões para a classificação e manejo correto dos pacientes. Nesse caso, a mutação p.R89Q está associada a um fenótipo leve da doença (Scott *et al* 1993; 1995) e p.R89W também foi descrita como associada a formas leves (Hein *et al* 2003), apesar de alguns autores indicarem outro tipo de associação (Bunge *et al* 1995). No entanto, especificamente para este paciente, como o segundo alelo era p.W402X, o resultado do seqüenciamento do cDNA foi homozigose para a mutação p.R89W, o que também não está correto.

Em resumo, o diagnóstico por cDNA é muito sujeito a erros e imprecisões. Talvez por isso na literatura não seja comum a descrição de mutações utilizando essa estratégia, e sim, o uso de cDNA para outras análises, como estudos de expressão (Scott *et al* 1991), de atividade enzimática (Lee-Chen *et al* 1999) ou terapia gênica (Herati *et al* 2008). Por esse motivo torna-se necessário aperfeiçoar a abordagem de análise por DNA tradicional para se obter um resultado satisfatório em menos tempo e com custo menor. Para tanto, foi proposta a pesquisa por mutações iniciando-se com o seqüenciamento direto dos éxons 9 e 11, os quais possuem o maior número de mutações nos pacientes já analisados. Com apenas essa análise, seria possível estabelecer cerca de 70% dos alelos e, juntamente com o seqüenciamento de mais 2 éxons, ou seja, 4 éxons do total de 14, sendo eles o 2 e o 8, seriam determinados 86% dos alelos pesquisados. Contudo, esta estratégia deve ser validada em um número maior de pacientes para que seja possível aperfeiçoar o processo de diagnóstico, sem que haja diminuição na sua eficiência.

CONCLUSÕES

Foram feitas comparações de tempo e custo entre as metodologias de análise por DNA e RNA considerando-se cada etapa envolvida no processo de genotipagem dos pacientes, sendo que a análise de RNA mostrou-se vantajosa, tanto do ponto de vista econômico quanto em relação ao tempo despendido.

A padronização do método de diagnóstico molecular através da análise de RNA foi realizada com sucesso utilizando um plasmídeo contendo o cDNA do gene *IDUA* humano.

Foi realizada a validação da técnica de análise por RNA, utilizando-se amostras de pacientes já diagnosticados. Essa abordagem apresentou falhas, relacionadas principalmente à amplificação de mutações sem sentido ou em sítio de *splice*.

Como a análise por RNA não atendeu às necessidades propostas, foi sugerida uma nova estratégia de abordagem para a técnica de análise por DNA, privilegiando o seqüenciamento direto dos éxons com maior frequência de mutações, a qual deve ser validada num número maior de pacientes.

REFERÊNCIAS

1. Aronovich EL, Bell JB, Khan SA, Belur LR, Gunther R, Koniar B *et al.* Systemic Correction of Storage Disease in MPS I NOD/SCID Mice Using the Sleeping Beauty Transposon System. *Molecular Therapy*. 2009; 17:1136644.
2. Asselta R, Duga S, Spena S, Santagostino E, Peyvandi F, Piseddu G *et al.* Congenital afibrinogenemia: mutations leading to premature termination codons in fibrinogen A alpha-chain gene are not associated with the decay of the mutant mRNAs. *Blood*. 2001; 98:3685692.
3. Baldo G, Mayer FQ, Burin M, Carrillo-Farga J, Matte U, Giugliani R. Recombinant encapsulated cells overexpressing alpha-L-iduronidase correct enzyme deficiency in human MPS I cells. *Cells Tissues Organs*. Forthcoming 2010. Cedido pelo autor.
4. Bonfim C, Koliski A, Bitencourt M, Setubal D, Funke V, Ruiz J *et al.* Stem cell Transplantation for inborn errors of metabolism: a single center experience in 20 patients. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 2007; Suppl 1:52.
5. Braunlin EA, Stauffer NR, Peters CH, Bass JL, Berry JM, Hopwood JJ *et al.* Usefulness of Bone Marrow Transplantation in the Hurler Syndrome. *Am J Cardiol*. 2003; 92:882-88.

6. Bunge S, Kleijer WJ, Steglich C, Beck M, Schwinger E, Gal A. Mucopolysaccharidosis type I: identification of 13 novel mutations of the alpha-L-iduronidase gene. *Hum Mutat.* 1995; 6(1):91-4.
7. Burpo, FJ. A critical review of PCR primer design algorithms and crosshybridization case study. *Biochemistry.* 2001; 218.
8. Chakrabarti R, Schutt CE. The enhancement of PCR amplification by low molecular-weight sulfones. *Gene.* 2001; 274(1-2): 293-68.
9. Chang HS, Arai T, Yabuki A, Hossain MA, Rahman MM, Mizukami K *et al.* Rapid and reliable genotyping technique for GM1 gangliosidosis in Shiba dogs by real-time polymerase chain reaction with TaqMan minor groove binder probes. *J Vet Diagn Invest.* 2010; 22(2):234-7.
10. Clarke LA. The mucopolysaccharidoses: a success of molecular medicine. *Expert Rev Mol Med.* 2008; 10:e 1.
11. Fuller M, Brooks DA, Evangelista M, Hein LK, Hopwood JJ, Meikle PJ. Prediction of neuropathology in mucopolysaccharidosis I patients. *Molecular Genetics and Metabolism.* 2005; 84:18-24.
12. Giugliani R, Federhen A, Carvalho CG, Artigalás O. Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis I: laronidase. *Pediatric Health.* 2010; 4(2):133-145.

13. Grubb JH, Vogler C, Sly WS. New Strategies for Enzyme Replacement Therapy for Lysosomal Storage Diseases. *Rejuvenation Reserch*. 2010; 13(2-3) 229-33.
14. Hein LK, Hopwood JJ, Clements PR, Brooks DA. The alpha-L-iduronidase mutations R89Q and R89W result in an attenuated mucopolysaccharidosis type I clinical presentation. *Biochim Biophys Acta*. 2003; 1639(2):95-103.
15. Hein LK, Bawden M, Muller VJ, Sillence D, Hopwood JJ, Brooks DA. -L-Iduronidase Premature Stop Codons and Potential Read-Through in Mucopolysaccharidosis Type I Patients. *Journal of Molecular Biology*. 2004; 338(3):453-62.
16. Herati RS, Ma X, Tittiger M, Ohlemiller KK, Kovacs A, Ponder KP. Improved retroviral vector design results in sustained expression after adult gene therapy in mucopolysaccharidosis I mice. *J Gene Med*. 2008; 10(9):972-82.
17. Hirth A, Berg A, Greve G. Successful treatment of severe heart failure in an infant with Hurler syndrome. *J Inherit Metab Dis*. 2007; 30(5):820.
18. Hobbs JR, Barret AJ, Chambers D, James D, Hugh-Jones K, Byrom N *et al*. Reversal of clinical features of Hurler's disease and biochemical improvement after treatment by bone-marrow transplantation. *Lancet*. 1981; 2:709-12.

19. Human Gene Mutation Database (HGMD) [Internet]. [update 2010 Oct 28]. Available from: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>
20. Inácio A, Silva AL, Pinto J, Ji X, Morgado A, Almeida F *et al.* Nonsense Mutations in Close Proximity to the Initiation Codon Fail to Trigger Full Nonsense-mediated mRNA Decay. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004; 279(31): 32170-680.
21. Kakkis ED, Muenzer J, Tiller GE, Waber L, Belmont J, Passage M *et al.* Enzyme-replacement therapy in mucopolysaccharidosis I. *N Engl J Med*. 2001; 344:182-68.
22. Kasper DC, Iqbal F, Dvorakova L, Zeman J, Magner M, Bodamer O *et al.* Rapid and accurate denaturing high performance liquid chromatography protocol for the detection of alpha-L-iduronidase mutations causing mucopolysaccharidosis type I. *Clin Chim Acta*. 2010; 411(5-6):345-50.
23. Lagranha VL, Baldo G, de Carvalho TG, Burin M, Saraiva-Pereira ML, Matte U *et al.* In vitro correction of ARSA deficiency in human skin fibroblasts from metachromatic leukodystrophy patients after treatment with microencapsulated recombinant cells. *Metab Brain Dis*. 2008; 23(4):469-84.
24. Lee-Chen GJ, Lin SP, Tang YF, Chin YW. Mucopolysaccharidosis type I: Characterization of novel mutations affecting a-L-iduronidase activity. *Clin Genet*. 1999; 56: 666-70.

25. Malm G, Gustafsson B, Berglund G, Lindström M, Naess K, Borgström B *et al.* Outcome in six children with mucopolysaccharidosis type IH, hurler syndrome, after haematopoietic stem cell transplantation (HSCT). *Acta Paediatr.* 2008; 97(8):1108-12.
26. Matte U, Yogalingam G, Brooks D, Leistner S, Schwartz I, Lima L *et al.* Identification and characterization of 13 new mutations in mucopolysaccharidosis type I patients. *Mol Genet Metab.* 2003; 78(1):37-43.
27. Matte U, Mourya R, Miethke A, Liu C, Kauffmann G, Moyer K *et al.* Analysis of gene mutations in children with cholestasis of undefined etiology. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2010; 51(4):488-93.
28. Mayer FQ, Baldo G, de Carvalho TG, Lagranha VL, Giugliani R, Matte U. Effects of cryopreservation and hypothermic storage on cell viability and enzyme activity in recombinant encapsulated cells overexpressing alpha-L-iduronidase. *Artif Organs.* 2010; 34(5):434-9.
29. Menon KP *and* Neufeld EF. Evidence for degradation of mRNA encoding α -L-iduronidase in Hurler fibroblasts with premature termination alleles. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 1994; 40:999-1005.
30. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988; 16:1215.

31. Muenzer J, Fisher A. Advances in the treatment of mucopolysaccharidosis type I. *N Engl J Med.* 2004; 350(19):1932-4.
32. Neufeld EF *and* Muenzer J. The Mucopolysaccharidoses. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease.* New York: McGraw-Hill; 2001. 3421-52.
33. Osborn, MJ, McElmurry RT, Peacock B, Tolar J, Blazar BR. Targeting of the CNS in MPS-IH Using a Nonviral Transferrin- α -L-iduronidase Fusion Gene Product. *Mol Ther.* 2008; 16(8):1459-66.
34. Pastores GM, Arn P, Beck M, Clarke JTR, Guffon N, Kaplan P *et al.* The MPS I registry: Design, methodology, and early findings of a global disease registry for monitoring patients with Mucopolysaccharidosis Type I. *Mol Gen Metab.* 2007; 91:37647.
35. Pereira VG, Martins AM, Micheletti C, D'Almeida V. Mutational and oxidative stress analysis in patients with mucopolysaccharidosis type I undergoing enzyme replacement therapy. *Clin Chim Acta.* 2008; 387(1-2):75-9.
36. Peters C, Balthazor M, Shapiro E, King R, Kollman C, Hegland JC *et al.* Outcome of unrelated donor bone marrow transplantation in 40 children with Hurler syndrome. *Blood.* 1996; 87(11):4894-902.

37. Schlatter RP. A Perspectiva Estratégica na Gestão de um Laboratório de Pesquisa da Área da Saúde (dissertation). Brasil (BR): Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2006.
38. Scott HS, Aston LJ, Eyre HJ, Baker E, Brooks DA, Callen DF *et al.* Chromosomal localization of the human α -L-iduronidase gene (IDUA) to 4p16.3. *Am J Hum Genet.* 1990; 47:802-7.
39. Scott HS, Anson DS, Orsborn AM, Nelson PV, Clements PR, Morris CP *et al.* Human α -L-iduronidase: cDNA isolation and expression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991; 88:9695-99.
40. Scott HS, Guo XH, Hopwood JJ, Morris CP. Structure and sequence of the human α -L-iduronidase gene. *Genomics.* 1992a; 13:1311-13.
41. Scott HS, Litjens T, Nelson PV, Brooks DA, Hopwood JJ, Morris CP. α -L-iduronidase mutations (Q70X and P533R) associated with a severe Hurler phenotype. *Hum Mutat.* 1992b; 1:333-9.
42. Scott HS, Litjens T, Nelson PV, Thompson PR, Brooks DA, Hopwood JJ *et al.* Identification of mutations in the α -L-iduronidase gene (IDUA) that cause Hurler and Scheie syndromes. *Am J Hum Genet.* 1993; 53:973-686.

43. Scott HS, Bunge S, Gal A, Clarke LA, Morris CP, Hopwood JJ. Molecular genetics of mucopolysaccharidosis type I: diagnostic, clinical, and biological implications. *Hum Mutat.* 1995; 6(4):288-302.
44. Strachan T *and* Read AP. Testes genéticos em indivíduos e em populações. In: *Genética Molecular Humana* 2nd Ed. Artmed; 2002. p. 576
45. Tolar J, Grewal SS, Bjoraker KJ, Whitley CB, Shapiro EG, Charnas L *et al.* Combination of enzyme replacement and hematopoietic stem cell transplantation as therapy for Hurler syndrome. *Bone Marrow Transpl.* 2008; 41:531-65.
46. Whitley CB, Belani KG, Chang PN, Summers CG, Blazar BR, Tsai MY *et al.* Long-term outcome of Hurler syndrome following bone marrow transplantation. *Am J Med Genet.* 1993; 46:209-18.
47. Winchester, B. Lysosomal metabolism of glycoconjugates. In: Lloyd, Mason, editors. *Subcellular Biochemistry* 27th ed. *Biology of the Lysosome.* New York: Plenum Press; 1996. p. 191-238.
48. Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem.* 2003; 49(6):853-860.

49. Wynn RF, Mercer J, Page J, Carr TF, Jones S, Wraith JE. Use of enzyme replacement therapy (laronidase) before hematopoietic stem cell transplantation for mucopolysaccharidosis I: experience in 18 patients. *J. Pediatr.* 2009; 154:13569.

50. Zheng Y, Rozengurt N, Ryazantsev S, Kohn DB, Satake N, Neufeld, EF. Treatment of the mouse model of mucopolyusaccharidosis I with retrovirally transduced bone marrow. *Mol Gen Metab.* 2003; 79:233-44.

ANEXO A

Artigo enviado para publicação no periódico *Cellular & Molecular Biology Letters*.

Analysis of cDNA molecules is not suitable for the molecular diagnosis of Mucopolysaccharidosis type I

ALMEIDA ANDRESA^{1,2}, PASQUALIM GABRIELA¹, SCHWARTZ IDA VANESSA DOEDERLEIN^{3,4}, SOUZA CAROLINA FISCHINGER³, GIUGLIANI ROBERTO^{1,2,3,4} AND MATTE URSULA^{1,2,4}.

1. Gene Therapy Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil
2. Post-Graduation Program in Child and Adolescent Health, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil
3. Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil
4. Post-Graduation Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Corresponding Author:

Ursula Matte
Gene Therapy Center
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Rua Ramiro Barcelos, 2350
Porto Alegre, RS
90035-903
Brazil
Phone: + 55 51 3359 8838
Fax: + 55 51 3359 8011

ABSTRACT

Mucopolisaccharidosis type I (MPS I) is an autosomal recessive disorder caused by the deficiency of α -L-iduronidase (IDUA). A whole spectrum of severity is observed, ranging from the severely affected Hurler patients that usually die within the first decade of life, to the attenuated form of Scheie patients, with preserved intelligence and normal lifespan. Genotype-phenotype correlations have been established, hence emphasizing the importance of mutation detection. Aiming to minimize the time consuming process of sequencing the 14 exons of *IDUA* gene, we standardized the sequencing from cDNA molecules and validated this process for a group of patients whose mutations had been previously identified by DNA analysis. Although we were able to standardize a method of whole gene analysis using 5 PCR amplifications, cDNA proved to be unsuitable for the analysis as patients bearing splice site and nonsense mutations were not correctly genotyped.

Keywords: Mucopolisaccharidosis Type I, cDNA, Mutation Detection.

INTRODUCTION

Mucopolisaccharidosis type I (MPS I, OMIM 252800) is an autosomal recessive disorder caused by the deficiency of α -L-iduronidase (IDUA, E.C. 3.2.1.76). Undegraded or partially degraded dermatan and heparan sulfate accumulate in the lysosomal compartment and trigger a not fully understood cascade of events that lead to the clinical manifestations of the disease [1]. A whole spectrum of severity is observed, ranging from the severely affected Hurler patients that usually die within the first decade of life, to the attenuated form of Scheie patients, with preserved intelligence and normal lifespan [2]. Genotype-phenotype correlations have been established [3], hence emphasizing the importance of mutation detection.

Although p.W402X is the most prevalent mutation in most populations worldwide, mutation frequency varies and in Brazil 37% of the patients bear private mutations [4]. In order to minimize costs, several centers perform a screening for the most prevalent mutations by restriction fragment length polymorphism. For those patients not genotyped at this stage, complete gene sequencing is performed. Aiming to minimize the time consuming process of sequencing the 14 exons of *IDUA* gene, we standardized the sequencing from cDNA molecules and validated this process for a group of patients whose mutations had been previously identified by DNA analysis.

PATIENTS AND METHODS

Four patients with mutations previously identified [4] were invited to participate in this study. Peripheral blood was collected in PAXgene Blood RNA tubes (PreAnalytix, BD) and RNA was extracted using PAXgene Blood RNA Kit (Qiagen). Three patients had his RNA extracted from cultured fibroblasts using RNeasy (Qiagen). Then, 5 μ g of RNA were converted to cDNA using *SuperScript II Reverse Transcriptase* e RNaseOUT (Invitrogen). As a positive control it was used a plasmid containing *IDUA* cDNA [5].

Five pair of primers were designed to cover the whole gene (Tab. 1) with overlapping extremities. Amplification conditions used 5ng cDNA, 1X Ammonium Buffer (160mM (NH₄)₂SO₄, 670mM Tris-HCl pH 8.8, 0.1% (v/v), Tween 20), DMSO 10% (except for amplicon 4), 1.5mM de MgCl₂ (except for amplicon 5, that used 1.75mM), 0.4mM dNTP,

20pmol of each primer and 1U Taq DNA polymerase (Invitrogen), in a total volume of 25µL. Thirty-four cycles of amplification were performed in Verity Thermocycler (Applied Biosystems) at the indicated annealing temperatures. Amplified fragments were purified with Exo-SAP (GE Healthcare) and submitted to automated sequencing on ABI 3100 using BigDye v3.1 (Applied Biosystems).

RESULTS

Amplification conditions were standardized using plasmid cDNA. RNA extraction and cDNA conversion of patient's samples were performed without remarks. However, cDNA amplification of particular patient's amplicons proved difficult, especially those bearing splice site or nonsense mutations. Tab. 2 summarizes the results found from cDNA analysis compared to mutations reported after DNA analysis.

Mutation IVS11-1g>t in patient A is a splice site mutation located on intron 11, whereas mutation g.3308_3319del in patient B is a deletion of 12 bp in the middle of exon 11, that potentially interferes with splice by affecting the branching. Amplicons 4 and 5 that comprise the fragment between exons 9 and 14 were never obtained for these two patients, despite numerous attempts.

Moreover, nonsense mutations also failed to amplify, as observed by patient D who is homozygous for p.W402X. In this patient, to exclude the possibility of RNA/cDNA problems, the amplification of *GAPDH* cDNA was performed successfully (data not shown). In addition, patients who are compound heterozygous for nonsense mutation (as patients A, B and C) seem to amplify only the other allele, therefore seeming either normal (as in patient A) or homozygous for a missense mutation (as seen in patient C). The only exception was patient B, in which a very faint signal for p.W402X can be seen in the electropherogram (Fig. 1). Finally, patient C illustrates that conventional methods also have pitfalls. This patient had been previously diagnosed as p.R89Q compound heterozygous based on a restriction fragment length polymorphism, with an enzyme that recognizes the normal sequence. However, upon sequencing a different nucleotide change was detected, that would also abolish the restriction site, but with a different aminoacid change: p.R89W.

DISCUSSION

The aim of this study was to establish a direct method for the analysis of the whole IDUA gene for a faster molecular diagnosis of MPS I patients. Although we were able to standardize a method of whole gene analysis using 5 PCR amplifications, cDNA proved to be unsuitable for the analysis. Patients bearing splice site and nonsense mutations were not correctly genotyped.

The amplification failure observed in patients with p.Q70X and p.W402X is probably due to the degradation of mRNA with premature stop codons by the complex NMD (Nonsense-Mediated mRNA Decay), which recognizes and degrades premature stop codons, thus avoiding the production of truncated proteins [6]. This phenomenon had already been described in MPS I by Menon [7] that showed mRNA instability in patients with mutation p.Q70X. Hein [8] confirmed these observations in cells expressing the mutations p.W402X and p.Q70X.

This is a very important limitation, especially considering that about 60% of South American patients with MPS I present nonsense mutations (Matte, unpublished data). It means that homozygous patients probably will fail to amplify, as seen in patient D, but also

that compound heterozygous with missense mutations may be wrongly assigned as homozygous for the other allele, as seen in patient C.

Another limitation was the difficulty for analyzing splice site mutations. The reason for that is probably related to abnormal mRNA processing that may abrogate the site for primer annealing. In studies designed specifically to characterize splice alterations, different sets of primers may be used accordingly to the predicted effect of the mutation [9]. However, in a general protocol for molecular diagnosis, such specificities may not be accounted for.

Since cDNA analysis seems not suitable for molecular diagnosis, a different strategy must be envisaged to optimize genotyping of MPS I patients in a cost-effective manner. The direct sequencing of the exons with the higher percentage of mutations may prove a feasible approach, easily adaptable for different populations.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by a grant from FIPE and CAPES.

REFERENCES

- [1] Tomatsu, S., Montaña, A.M., Oguma, T., Dung, V.C., Oikawa, H., de Carvalho, T.G., Gutiérrez, M.L., Yamaguchi, S., Suzuki, Y., Fukushi, M. Sakura, N., Barrera, L., Kida, K., Kubota, M. and Orii, T. Dermatan sulfate and heparan sulfate as a biomarker for mucopolysaccharidosis I. **J Inherit Metab Dis.** 33 (2010) 1416150.
- [2] Pastores G.M. Laronidase (Aldurazyme): enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis type I. **Expert Opin Biol Ther.** 8(7) (2008) 1003-1009.
- [3] Fuller M., Brooks D.A., Evangelista M., Hein L.K., Hopwood J.J. and Meikle P.J. Prediction of neuropathology in mucopolysaccharidosis I patients. **Mol Genet and Metab.** 84 (2005) 18624.
- [4] Matte U., Yogalingam G., Brooks D., Leistner S., Schwartz I., Lima L., Norato D.Y., Brum J.M., Beesley C., Winchester B., Giugliani R., Hopwood J.J. Identification and characterization of 13 new mutations in mucopolysaccharidosis type I patients. **Mol Genet Metab.** 78(1) (2003) 37-43.

- [5] Mayer F.Q., Baldo G., de Carvalho T.G., Lagranha V.L., Giugliani R. and Matte U. Effects of cryopreservation and hypothermic storage on cell viability and enzyme activity in recombinant encapsulated cells overexpressing alpha-L-iduronidase. **Artif Organs.** 34(5) (2010) 434-439.
- [6] Inácio A., Silva A.L., Pinto J., Ji X., Morgado A., Almeida F., Faustino P., Lavinha J., Liebhaber S.A. and Romão L. Nonsense Mutations in Close Proximity to the Initiation Codon Fail to Trigger Full Nonsense-mediated mRNA Decay. **The Jour of Biol Chem.** 279(31) (2004) 32170632180.
- [7] Menon K.P. and Neufeld E.F. Evidence for degradation of mRNA encoding α -L-iduronidase in Hurler fibroblasts with premature termination alleles. **Cell Mol Biol.** 40 (1994) 99961005.
- [8] Hein L.K., Bawden M., Muller V.J., Sillence D., Hopwood J.J. and Brooks D.A. α -L-Iduronidase Premature Stop Codons and Potential Read-Through in Mucopolysaccharidosis Type I Patients. **Jour Mol Biol.** 338 (3) (2004) 453-462.
- [9] Oesterreich, F.C., Preibisch, S. and Neugebauer, K.M. Global Analysis of Nascent RNA Reveals Transcriptional Pausing in Terminal Exons. **Mol Cell.** 40(4) (2010) 571-581.

Tab. 1: Primers used to amplify *IDUA* cDNA, with amplicon size and annealing temperature.

<i>Amplicon</i>	<i>Foward Primer</i>	<i>Reverse Primer</i>	Fragment	Annealing Temperature
1	CGCCCAGACTCCGACCCG	CGGTAGGTACGGACTGGCG	583pb	59°C
2	GCTTGTCACCACCAGGGGG	GGAGCAGGAGAAGGTCGTCGC	555pb	56°C
3	GCGTGCGGCTGGACTACATC	GCGAGCGACGACACCCG	583pb	55°C
4	CCTGGACAGCAACCACAC	GTTCTGGTCTGGTCGGATG	479pb	61°C
5	CCGTCGCTTTTGCTGGTGC	CCTCCCATCACCCCCTTGC	460pb	56°C

Tab. 2: Gentoypes assigned for MPS I patients based on DNA or cDNA analysis. DNA analysis includes restriction fragment length polymorphism allele and sequencing.

Patients	DNA		cDNA	
	Allele 1	Allele 2	Allele 1	Allele 2
A	p.Q70X	IVS11-1g>t	Normal *	
B	p.W402X	g.3308_3319del	p.W402X ? *	Normal
C	p.W402X	p.R89Q	p.R89W	p.R89W
D	p.W402X	p.W402X	Amplification failure	

*Amplicons 4 and 5 failed to amplify.

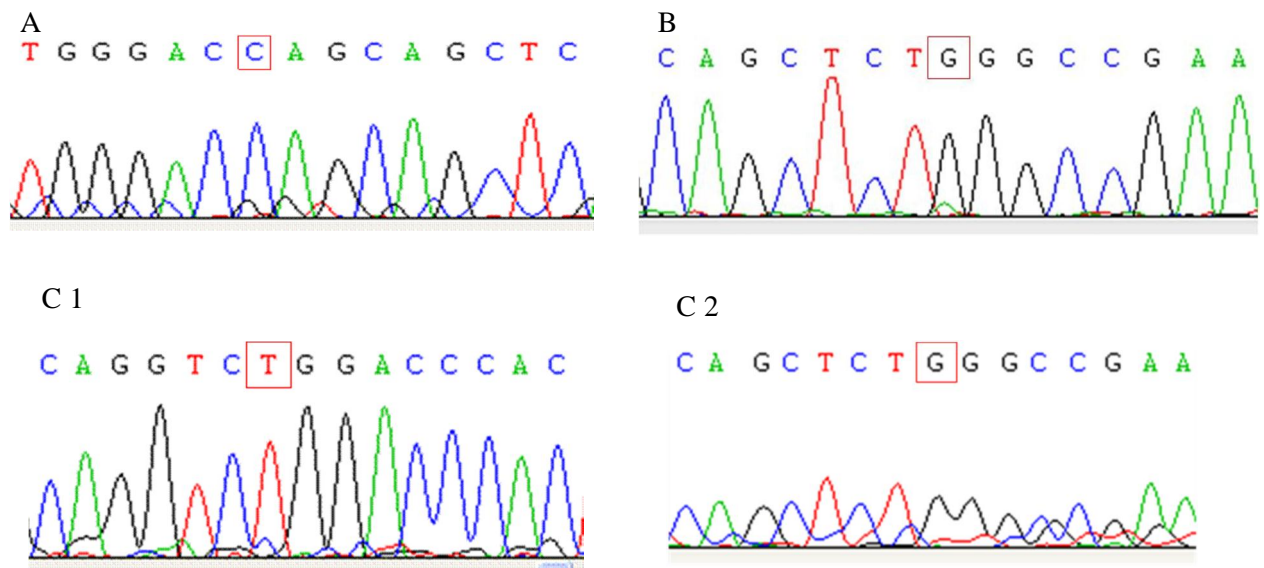


Fig. 1. Electropherograms of patients A-C showing lack of p.Q70X pattern in patient A; faint heterozygous pattern in patient B, and p.R89W homozygous pattern with normal p.W402X profile in patient C (C1 and C2, respectively).

