

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**PADRONIZAÇÃO DE UM PROTOCOLO PARA IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES
NO GENE DA GALNS EM PACIENTES COM MPS IVA ATRAVÉS DAS TÉCNICAS
DE PCR-ARMS (*AMPLIFICATION REFRACTORY MUTATION SYSTEM*) E
SEQUENCIAMENTO**

FRANCYNE KUBASKI

Porto Alegre

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**PADRONIZAÇÃO DE UM PROTOCOLO PARA IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES
NO GENE DA *GALNS* EM PACIENTES COM MPS IVA ATRAVÉS DAS TÉCNICAS
DE PCR-ARMS (*AMPLIFICATION REFRACTORY MUTATION SYSTEM*) E
SEQUENCIAMENTO**

FRANCYNE KUBASKI

Orientador: Prof. Dra. Sandra Leistner-Segal

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, UFRGS, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre
2012

CIP - Catalogação na Publicação

Kubaski, Francyne

Padronização de um protocolo para identificação de mutações no gene da GALNS em pacientes com MPS IVA através das técnicas de PCR-ARMS (Amplification Refractory Mutation System) e sequenciamento / Francyne Kubaski. -- 2012.

75 f.

Orientadora: Sandra Leistner-Segal.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Mucopolissacaridose IVA. 2. Síndrome de Morquio A. 3. Mutações. 4. PCR-ARMS. 5. Sequenciamento. I. Leistner-Segal, Sandra, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Devo agradecimentos para muitos que participaram no desenvolvimento desse projeto direta e indiretamente e em especial:

A toda minha família em especial: meu pai pelo incentivo, carinho, força em todos os momentos sempre acreditando no meu potencial, por ser minha base, meu melhor amigo. Minha mãe por todo carinho e ajuda. A vó Carmen por tudo que fez e faz por mim, por estar sempre ao meu lado e me ajudando em tudo, sempre com carinho.

Aos meus avós Francisco, Sonia e Mauro.

Aos meus parentes que residem em Porto Alegre e me acolheram em todos os momentos (Queca, tio Jacob, Nathi e Juju; Tio Flávio, Bruna, Igor; tio Fábio e Vag).

A Sandra, por ter me aceito como aluna mesmo sem me conhecer, por ser essa mãezona, pela confiança depositada sempre acreditando na minha capacidade, parceira de todas as horas sempre a ensinar com toda paciência e pelo incentivo para alcançar meus objetivos.

À Ana Carolina Brusius-Facchin, pela acolhida, amizade, companheirismo, pelo apoio, incentivo, por ter me ensinado tudo com a maior calma e paciência.

Ao Dr Tor Onsten por todo apoio, incentivo, orientações em pesquisas.

Aos meus colegas e amigos do laboratório: Fernanda, Isabel, Andressa, Soraia, Leise, Eduarda, Fabiana, Jéssica, Ágata, Aline, Thaís, Kristiane, Juarez, Giórgia, Letícia, Luiza, pela amizade que fizemos dando ótimos momentos de convívio com muitas boas lembranças.

Ao Dr Roberto, pelo apoio e incentivo.

As colegas do Pensionato: Leise, Victória, Micheli, Ana Carolina, Camila, Elisa, Lorena, Mariele, Larissa, Luiza pela amizade, apoio, carinho, ajuda em todos os momentos.

As gurias da Rede MPS Brasil em especial a Karlla, Adri, Camila que sempre me deram todo suporte.

À equipe da secretaria do Serviço de Genética Médica do HCPA, em especial à Cléa, Zeni, Vanessa e Dener pelo auxílio.

Ao Célio, por auxiliar na resolução de assuntos burocráticos e por sempre conseguir uma bolsa.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela oportunidade em obter este título.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Medicina:
Ciências Médicas.

À equipe do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) e ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA), pelo auxílio financeiro.

A CAPES pela bolsa.

“Os covardes nunca começam, os fracassados nunca terminam, os exitosos nunca desistem” (Norman Vincent Peal).

RESUMO

Introdução: Mucopolissacaridose IVA ou Síndrome de Morquio A é uma doença autossômica recessiva causada pela deficiência da enzima lisossomal N-acetilgalactosamina-6-sulfatase (*GALNS*), que resulta no acúmulo lisossomal dos glicosaminoglicanos: Queratan sulfato e Condroitin-6-sulfato nos tecidos causando as manifestações clínicas. Os fenótipos variam da forma clássica à forma atenuada, ambas sem comprometimento cognitivo. A prevalência de MPS IVA varia de 1/76.000 a 1/640.000 nascidos vivos. **Objetivos:** Analisar e caracterizar o genótipo de pacientes brasileiros com MPS IVA através de estudos de mutações no gene da *GALNS*, possibilitando a estimativa de frequência de mutações recorrentes e o estabelecimento um protocolo de rotina para *triagem* dessas mutações. **Métodos:** Análise molecular do gene da *GALNS* foi realizada em 26 pacientes brasileiros inicialmente através de PCR-ARMS para detecção de seis mutações recorrentes (p.G116S/ p.G139S/ p.L307P/ p.N164T/ p.R386C e p.S341R) seguidas pela amplificação de regiões codificantes por PCR e sequenciamento. **Resultados:** Essas mutações foram encontradas em 61,5% da nossa amostra, com uma frequência alélica de 55,8%. Destas, a mutação mais frequente foi p.S341R (26,9%), seguida de p.R386C (21,1%) e p.G116S (7,7%). As mutações p.N164T, p.G139S, p.L307P não foram encontradas em nossa amostra. Além destas, foi encontrada por sequenciamento do éxon 5 uma mutação nova p.C165Y. **Conclusão:** O protocolo usado para detecção de mutações comuns mostrou-se adequado como um *screening* inicial de mutações no gene da *GALNS*, identificando mutações em 61,5% dos pacientes e permitiu a caracterização de 55,8% dos alelos. A mutação p.S341R foi encontrada apenas em pacientes do Nordeste. A identificação de indivíduos heterozigotos nessas famílias será importante para aconselhamento genético e para estimar a prevalência da doença nessa região. Estudos adicionais para identificação da origem dessa mutação, incluindo análises de segregação e haplótipo estão em andamento, e serão avaliadas em conjunto com dados epidemiológicos.

PALAVRAS-CHAVE: Mucopolissacaridose IVA, Síndrome de Morquio A, Doença lisossômica, mutações, PCR-ARMS.

ABSTRACT

Background: Mucopolysaccharidosis IVA or Morquio A syndrome, is an autosomal recessive disorder caused by deficiency of lysosomal enzyme N-acetylgalactosamine-6-sulfatase (GALNS), which results in lysosomal storage of glycosaminoglycans: Keratan sulfate and Chondroitin-6-sulfate in tissues causing clinical manifestations. The phenotypes vary from the classical to attenuated form, both without cognitive impairment. The prevalence of MPS IVA ranges from 1/76.000 to 1/640.000 live births. **Objective:** To analyze and characterize the genotype of Brazilian patients with MPS IVA, through molecular study of mutations in the *GALNS* gene, enabling the estimative of frequency of recurrent mutations and the establishment of a protocol for routine screening of these mutations. **Methods:** Molecular analysis of *GALNS* gene was performed in 26 Brazilian patients initially by ARMS-PCR to detect six recurrent mutations (p.G116S/ p.G139S/ p.L307P/ p.N164T/ p.R386C and p.S341R) followed by amplification of coding regions by PCR and sequencing. **Results:** These mutations were found in 61.5% of our sample, which were present in 55.8% of the alleles. The most frequent mutation was p.RS341R (26.9%), followed by p.R386C (21.1%) and p.G116S (7.7%). Mutations p.N164T, p.G139S, p.L307P were not found in our sample. A novel mutation p.C165Y was found after sequencing of exon 5. **Conclusion:** The protocol used for detection of common mutations was shown to be adequate for a first screening of mutations at the *GALNS* gene, once it identified the genotype in 61.5% of patients and allowed the characterization of 55.8% of alleles. The p.S341R was found only in patients from the Northeast. The identification of heterozygous individuals within these families will be important for genetic counseling and for estimating the disease prevalence in this region. Further studies to identify the origin of this mutation, including haplotype and segregation analyses are in progress, and will be evaluated in conjunction with epidemiological data.

KEYWORDS: Mucopolysaccharidosis IVA, Morquio A Syndrome, Lysosomal disease, mutations, ARMS PCR.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos tipos de MPS.....	24
Tabela 2. Mutações recorrentes.....	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Síntese de enzimas lisossomais.....	18
Figura 2. Glicosaminoglicanos.....	23
Figura 3. Estrutura do Condroitin-6-sulfato.....	25
Figura 4. Catabolismo do Queratan Sulfato.....	25
Figura 5. Representação da estrutura da GALNS humana.....	26
Figura 6. Mutações na <i>GALNS</i> em MPS IVA.....	27
Figura 7. Espectro clínico de pacientes com MPS IVA.....	29
Figura 8. Localização cromossômica e estrutura do gene da <i>GALNS</i>	31
Figura 9. Localização dos primers e tamanho dos fragmentos.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARMS	<i>Amplification Refractory Mutation System</i>
C6S	Condroitin-6-Sulfato
cDNA	DNA complementar
DL	Doença Lisossômica
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EIM	Erros Inatos do Metabolismo
EXO I	Exonuclease I
GAGs	Glicosaminoglicanos
GALNS	N-acetilgalactosamina-6-sulfatase
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HGMD	<i>Human Gene Mutation Database</i>
HS	Heparan Sulfato
KDa	Kilodalton
Kb	Kilobases
LEIM	Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo
M6P	Manose-6-Fosfato
MPS	Mucopolissacaridoses
MPS IVA	Mucopolissacaridose IVA
MS-HRM	<i>Methylation-sensitive high-resolution melting</i>
pb	par de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PKU	Fenilcetonúria
QS	Queratan Sulfato
RER	Retículo Endoplasmático Rugoso
RNA	Ácido Ribonucléico
SAP I	Fosfatase Alcalina de Camarão
SGM	Serviço de Genética Médica

SSCP	<i>Single Strand Conformation Polymorphism</i>
TCTH	Transplante de Células tronco hematopoiéticas
TER	Terapia de Enriquecimento Enzimático
TG	Terapia Gênica
TRE	Terapia de Reposição Enzimática
4-UM-S	4-metilumbeliferil sulfato

SUMÁRIO

ABSTRACT	7
SUMÁRIO	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO	14
2.2 LISSOSSOMOS	16
2.3 ENZIMAS LISSOSSOMAIS.....	17
2.4 DOENÇAS LISSOSSÔMICAS (DLs).....	19
2.5 MUCOPOLISSACARIDOSES.....	22
2.5.1 MUCOPOLISSACARIDOSE IVA (MPS IVA).....	24
3 JUSTIFICATIVAS	33
4 OBJETIVOS	34
4.1 OBJETIVO PRIMÁRIO.....	34
4.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS	34
5 METODOLOGIA	34
5.1 POPULAÇÃO EM ESTUDO	34
5.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	35
5.2.1 PACIENTES.....	35
5.2.2 POSSÍVEIS PORTADORES.....	35
5.3 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	35
5.4 DESCRIÇÃO DAS TÉCNICAS UTILIZADAS	35
5.4.1 GENÓTIPO	36
5.5 ASPECTOS ÉTICOS	39
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
7. ARTIGOS	48
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	70
9 PERSPECTIVAS	70
10 ANEXOS	71

1 INTRODUÇÃO

A Mucopolissacaridose IVA (MPS IVA) ou Síndrome de Morquio A é uma doença de herança autossômica recessiva (OMIM 253000), causada pela deficiência da enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatase (*GALNS*) (Dorfman *et al.*, 1974), necessária para degradação dos glicosaminoglicanos (GAGs): Queratano sulfato (QS) e Condroitina-6-sulfato (C6S) (Khedhiri *et al.*, 2011).

Os pacientes parecem normais ao nascimento com progressão da doença em poucos anos. As principais manifestações clínicas variam de uma forma grave caracterizada por displasia esquelética significativa, envolvimento cardíaco, opacidade de córnea, tronco curto e expectativa de vida de 20 a 30 anos, a uma forma atenuada com expectativa de vida normal, com leve envolvimento ósseo e de vísceras (Tomatsu *et al.*, 2011; Khedhiri *et al.*, 2011).

O gene da *GALNS* compreende 50kb, contém 14 éxons e 13 íntrons, e foi mapeado no cromossomo 16q24.3 sendo transcrito em um cDNA de 1566pb codificando 522 aminoácidos (Baker *et al.*, 1993; Hendriksz *et al.*, 2011; Tomatsu *et al.*, 1992).

Até o momento 184 diferentes mutações foram descritas no *Human Gene Mutation Database* (HGMD, 2012; <http://www.hgmd.org/>) incluindo mutações do tipo missense, nonsense, em sítio de splicing, pequenas e grandes deleções, além de inserções.

As mutações p.G116S, p.G139S, p.L307P, p.N164T, p.R386C e p.S341R são recorrentes em pacientes brasileiros não relacionados segundo estudos de Tomatsu *et al.*, 2004; 2005. Por este motivo, pela necessidade de caracterização do genótipo desses pacientes e pela escassez de estudos deste gênero, principalmente na América do Sul, o presente projeto foi desenvolvido.

A padronização desse protocolo para investigação das mutações irá propiciar a caracterização genotípica, sendo importante para estabelecimento da correlação de genótipo-fenótipo, identificação de portadores e aconselhamento genético.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO

Os dinâmicos padrões do metabolismo representam contínuas movimentações através de produtos intermediários, mas a falência de um único passo afeta o fluxo, causando acúmulo de substrato ou deficiência de um produto levando a um Erro Inato do Metabolismo (EIM) (Dherai AJ., 2012)

O conceito de EIM foi estabelecido por Archibald Garrod, no século XX através de seus relatos sobre quatro condições: albinismo, alcaptonúria, cistinúria e pentosúria; devido à deficiência enzimática herdada de forma autossômica recessiva (Garrod AE, 1902). Posteriormente, em 1934 Asbjörn Fölling descreve a oligofrenia fenilpirúvica, logo após, nomeada de Fenilcetonúria (PKU) devido ao produto metabólico incomum (Fölling A, 1934; Penrose *et al.*, 1937).

A descoberta da PKU foi importante para Garrod, que recebeu correspondências de Fölling e Penrose, sobre a nova doença, corroborando evidências da química humana individual, e da existência de padrões metabólicos, o que já era sugerido por seus conceitos formulados anteriormente em 1902 (Scriver, 2007).

Após tais descobertas, juntamente com os avanços da medicina e das técnicas diagnósticas, mais de 500 EIM foram descritos. Atualmente, os EIM são conhecidos como desordens resultantes de anormalidades na síntese, transporte e *turnover* da dieta e componentes celulares envolvendo grande complexidade subjacente à patofisiologia e bioquímica com complicadas opções de manejo terapêutico (Dherai AJ, 2012).

Apesar de serem individualmente raros, sua frequência conjunta é alta, aproximadamente 1:1000 nascidos vivos, resultando ao redor de 20% das mortes por doenças genéticas e ao redor de 38% de doenças neurológicas hereditárias ou doenças de depósito (Dherai AJ, 2012).

A apresentação clínica dos EIM é altamente variável de formas atenuada a letal com características sobrepondo aquelas de infecção e intoxicação. A avaliação laboratorial é imprescindível para o diagnóstico, uma vez que uma criança com EIM pode ser normal ao nascimento e tornar-se sintomática ao longo da vida. Na

presença de morte neonatal não explicada ou histórico de consanguinidade nos pais, deve ser levantada suspeita de EIM. No entanto, o estabelecimento de uma correlação genótipo-fenótipo é difícil devido à alta variabilidade de mutações e mesmo indivíduos com a mesma mutação exibem amplo espectro de manifestações clínicas (Pastores *et al.*, 2008; Dherai AJ, 2012).

Os defeitos das vias metabólicas causam doença ambos pelo acúmulo de um metabólito tóxico ou depleção de um subproduto requerido para manutenção da função celular normal. Os defeitos enzimáticos podem ser causados por mutações em genes codificadores de proteínas com perda de atividade, processamento anormal de RNA mensageiro, ou mesmo localização intracelular errada da proteína.

Conforme a patofisiologia, os EIM podem ser classificados em três grupos (Saudubray *et al.*, 2011):

1)Desordens do metabolismo intermediário: levam a intoxicação aguda ou progressiva devido a acúmulo de componentes tóxicos proximais às vias metabólicas. A apresentação inicial pode ser devido à inserção de certo componente na dieta. Tais desordens incluem aminoacidopatias, acidemias orgânicas, defeitos congênitos do ciclo da ureia, intolerâncias a açúcares. A apresentação clínica pode ser no período neonatal ou de início tardio, geralmente caracterizada por sinais de intoxicação que podem ser agudos (vômito, letargia, coma, falência hepática, complicações tromboembólicas) ou crônicos (atraso progressivo no desenvolvimento, subluxação de cristalino, cardiomiopatia).

2)Desordens do metabolismo energético: são EIM do metabolismo intermediário, com sintomas decorrentes da deficiência na produção energética ou utilização resultante de defeito no fígado, miocárdio, músculo ou cérebro. Quanto à sintomatologia os pacientes apresentam crescimento insuficiente, hipoglicemia, hiperlactacidemia, hipotonia severa e generalizada, miopatia, cardiomiopatia, falência cardíaca. Fazem parte desse grupo defeitos na glicogênese, gliconeogênese, acidemias lácticas congênitas, defeitos na oxidação de ácidos graxos, defeitos no ciclo de Krebs e desordens da cadeia respiratória mitocondrial.

3)Desordens de moléculas complexas: incluem as doenças com defeito na síntese ou catabolismo de moléculas complexas. Os sintomas são permanentes, progressivos e independentes de eventos intercorrentes, e não são relacionados à dieta. Nesse grupo são incluídas todas as doenças lisossômicas, desordens peroxissomais, doenças de tráfico intracelular e processamento, tais como:

deficiência de α -1-antitripsina, defeitos congênitos da glicosilação e erros inatos da síntese do colesterol.

As manifestações clínicas dos EIM surgem no período neonatal, na infância, ou na vida adulta sendo geralmente multissistêmicas ou com envolvimento de único órgão, sendo que a maioria pode ser enquadrada em categorias, tais como: neurológicas, hepáticas, cardíacas, síndromes de depósito e distúrbio (Saudubray *et al.*, 2011).

O diagnóstico é complexo e inclui suspeita clínica seguido de métodos analíticos e moleculares. Entre os métodos analíticos é feita estimativa dos metabólitos usando cromatografia, espectrometria de massas e ensaios enzimáticos com substratos cromogênicos artificiais ou fluorogênicos, métodos imunométricos e radioimunoensaios. Quanto às análises moleculares, há diversas técnicas que podem ser empregadas tais como Reação em cadeia da Polimerase (PCR) e sequenciamento (Dherai AJ., 2012).

O manejo terapêutico desses pacientes tem objetivo de reduzir metabólitos tóxicos, assegurar fluídos adequados, cofatores de infusão e ajuste de cofatores coexistentes. As opções terapêuticas são privação de substrato (no caso de doenças de moléculas pequenas, como algumas DLs); Terapia de enriquecimento enzimático (TER) (fornece um cofator para ativar atividade enzimática residual, tratando com chaperonas- moléculas de baixo peso molecular- ajudam a desdobrar proteínas e conseqüentemente alcançam atividade residual de enzimas lisossômicas); estimulação de padrões alternativos; Terapia de Reposição Enzimática (TRE) (fornece a enzima); Transplante de órgãos; Terapia Gênica (TG), dentre outras medidas de suporte para comorbidades associadas (Dherai AJ., 2012; Giugliani R., 2012; Moini *et al.*, 2010; Vormoor *et al.*, 2004; Neri *et al.*, 2011).

2.2 LISOSSOMOS

O lisossomo foi descoberto em 1955, por Christian de Duve (De Duve *et al.*, 1955), estando presente em todas as células nucleadas (Wraith JE, 2002). A primeira demonstração de deficiência enzimática e doença de depósito (Doença de Pompe) foi feita por Hers em 1963, abrindo caminho para uma série de descobertas sobre a biologia celular dessas organelas e seus substratos (Vellodi A, 2004).

Tais organelas são responsáveis pela reciclagem dos constituintes celulares que contenham catabólitos enzimáticos operando em meio ácido (Valayannopoulos *et al.*, 2011). Esse processo é alcançado pela remoção de resíduos terminais por uma série de enzimas lisossomais, geralmente exohidrolases. Aproximadamente 75 enzimas lisossomais diferentes são envolvidas nesse processo (Wraith JE, 2002).

O lisossomo é apenas um componente de uma série de organelas intracelulares aparentemente sem conexão, coletivamente conhecidas como sistema lisossomal-endossomal ou aparato vacuolar, termo descrito primariamente por De Duve e Wattiaux (1966). Os diversos componentes do sistema foram descritos 30 anos após por Novikoff AB (1973), atualmente são aceitos os termos: endossomo precoce, situado na periferia das células; endossomo tardio, que tende a ser perinuclear, e o lisossomo. Eles formam uma cadeia responsável pelo tráfego e digestão intracelular de moléculas endocitadas. O compartimento final desse sistema é o lisossomo (Vellodi A, 2004).

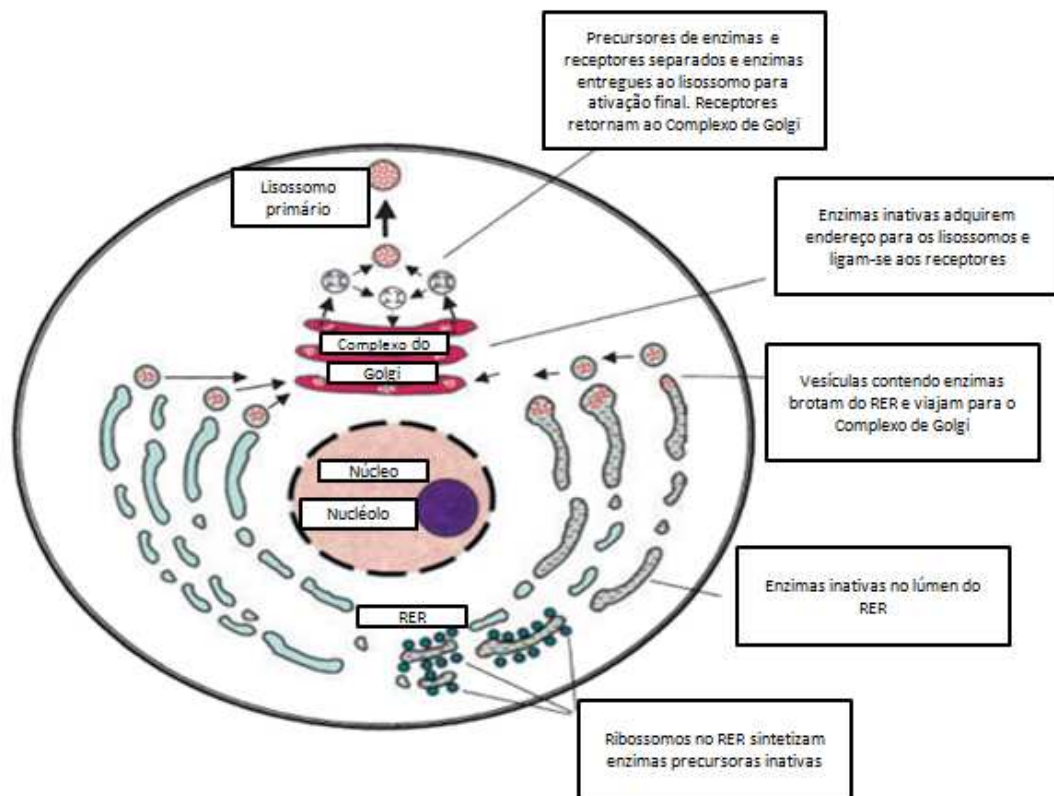
Essa organela é caracterizada pela presença de uma membrana, pH interno baixo, e vesículas contendo enzimas hidrolíticas. A membrana contém sistemas transportadores de moléculas que carregam partículas entre o lúmen e o citosol (Arai *et al.*, 1993). É no lisossomo que ocorre a quebra dos substratos, no entanto, não é um compartimento “beco sem saída”, por exemplo: os lisossomos são capazes de secretar seus conteúdos após fusão com a membrana plasmática (Luzio *et al.*, 2000). Assim, são organelas hidrolíticas intracelulares capazes de degradar uma ampla variedade de macromoléculas bem como organelas danificadas, e ainda exercem papel na exocitose regulada por cálcio, importante para reparo da membrana (Reddy *et al.*, 2001).

2.3 ENZIMAS LISSOSSOMAIS

As enzimas lisossomais são glicoproteínas sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso (RER), no estágio inicial são inativas, assim são translocadas através da membrana do RER com ajuda das sequências de sinais N-terminal. Uma vez no lúmen do RER, elas sofrem N-glicosilação e perdem a sequência de sinal movendo-se até o Complexo de Golgi, e nesse estágio adquirem o ligante de Manose-6-Fosfato (M6P), tal processo requer a ação sequencial de

duas enzimas, uma fosfotransferase e uma diesterase. Os vários passos envolvidos na síntese de enzimas lisossômicas estão resumidos na figura 1 (Vellodi A, 2004).

FIGURA 1: Síntese de enzimas lisossômicas



(Fonte: Adaptado de Vellodi A, 2004)

O entendimento desses dois passos é importante em função da aquisição dos receptores de M6P que separam glicoproteínas que estão destinadas para o lisossomo das de secreção de glicoproteínas. A falência na aquisição desses receptores resulta em marcação errada das enzimas, que não irão entrar na rota de degradação de substratos (Vellodi A, 2004).

Muitas enzimas lisossomais são exohidrolases que agem de maneira sequencial no catabolismo de substratos passo a passo na remoção de resíduos terminais. Assim a deficiência de uma única enzima causa o bloqueio de toda uma rota metabólica, desde que a falência na remoção de um resíduo terminal faz a inacessibilidade do substrato para hidrólise adicional de outra enzima lisossomal (Gieselmann V, 1995).

Algumas enzimas lisossomais requerem cofatores para seu funcionamento, tais como: ativadores de proteínas (proteínas ativadoras de esfingolipídeos ou saposinas), catepsinas (algumas necessitam coexistir em complexos a fim do funcionamento adequado). É importante destacar também que uma proporção de novas enzimas secretadas não é ligada a receptores M6P, ao invés disso, são secretadas e endocitadas por células vizinhas via receptor M6P da membrana plasmática (Vladutiu *et al.*, 1979).

As enzimas lisossomais tem máxima atividade em pH ácido, que é mantido por uma bomba de prótons dependente de energia. Uma propriedade útil dessas enzimas é o fato de elas serem altamente específicas para a estrutura e ligação da metade terminal em uma macromolécula (Wraith JE, 2002).

Geralmente, as sulfatases catalisam a hidrólise das pontes de éster sulfato de diversos substratos. *In vitro*, muitas sulfatases podem hidrolisar substratos sintéticos como 4-metilumbeliferil sulfato (4-MU-S), que compartilham apenas um grupo sulfato com substratos nativos (Rivera-Cólon *et al.*, 2012).

Em muitos casos, pelo potencial dessas enzimas de ação em vários substratos diferentes que compartilham o mesmo resíduo terminal, um padrão de depósito complexo pode ser originado (Wraith JE, 2002).

Devido às diversas etapas na síntese e processamento das hidrolases lisossomais, não é surpreendente que existam diversas vias que possam levar a uma disfunção (Vellodi A, 2004). Tais enzimas são responsáveis pelo catabolismo de biomoléculas, a deficiência dessas resulta em acúmulo de substratos não degradados nos tecidos, levando às doenças lisossômicas (DLs) (Rivera-Colón *et al.*, 2012).

2.4 DOENÇAS LISOSSÔMICAS (DLs)

Desde a primeira descrição da Doença de Pompe, como DL, em 1936 por Hers, aproximadamente 50 DLs tem sido descritas, sendo classificadas conforme o substrato acumulado em: Mucopolissacaridoses, Glicoproteinoses, Mucolipidoses e Esfingolipidoses (Ruivo *et al.*, 2009; Vellodi A, 2004; Parkinson-Lawrence *et al.*, 2010) (lista 1). Este grupo faz parte dos EIM e resulta da deficiência de determinada enzima, ativador protéico ou proteína de transporte, acarretando acúmulo de

substratos no lisossomo, ocasionando alterações bioquímicas e sintomas característicos (Targer *et al.*, 1984).

Lista 1: Doenças Lisossômicas

Mucopolissacaridoses

MPS I

MPS II

MPS IIIA

MPS IIIB

MPS IIIC

MPS IIID

MPS IVA

MPS IVB

MPS VI

MPS VII

MPS IX

Glicoproteinoses

Aspartilglicosaminúria

Fucosidose

α -Manosidose

β -Manosidose

Mucopolidose I

Doença de Schindler

Esfingolipidoses

Doença de Fabry

Doença de Farber

Doença de Gaucher

Gangliosidose GM1
Doença de Tay-Sachs
Doença de Sandhoff
Doença de Krabbe
Leucodistrofia metacromática
Doença de Niemann-Pick tipo A
Doença de Niemann-Pick tipo B

Outras lipidoses

Doença de Niemann-Pick tipo C
Doença de Wolman
Lipofuscinose Ceróide-Neuronal

(Fonte: Adaptado de Vellodi A, 2004)

Todas são doenças monogênicas, autossômicas recessivas, com três exceções de herança ligada ao cromossomo X: MPS II, Doença de Fabry e Doença de Danon (Sugie *et al.*, 2003).

Embora a deficiência enzimática resulte no acúmulo de substratos patológicos, os mecanismos subjacentes responsáveis pela patofisiologia da doença não são totalmente conhecidos. No entanto, a distribuição do material acumulado determina quais órgãos serão afetados, particularmente, as células neuronais são frequentemente afetadas por causa de sua incapacidade de renovação, bem como as células da rede de fagócitos mononucleares por serem ricas em lisossomos (Parkinson-Lawrence *et al.*, 2010).

Algumas vezes indivíduos aparentemente normais apresentam baixas taxas de atividade enzimática *in vitro*, indistinguíveis dos pacientes. Entretanto, a atividade enzimática é normal *in vivo*, tal fato é referido como pseudodeficiência. As proteínas mutantes causadoras desse fenótipo são codificadas em genes separados. No entanto, a distribuição do material acumulado determinará os órgãos a serem afetados (Dubois *et al.*, 1975).

As DLs podem conduzir a um fenótipo neurodegenerativo, onde manifestações atenuadas ou de início tardio, podem associar-se a presença de atividade enzimática residual (Bellettato *et al.*, 2010). Dessa forma a gravidade da doença pode ser associada à atividade enzimática (Vellodi A, 2004).

O diagnóstico destas doenças é baseado em técnicas imunoenzimáticas e de biologia molecular. Alguns deles podem ser acessíveis para triagem neonatal (Giugliani R, 2012). A identificação dos genes que codificam hidrolases lisossomais específicas tem melhorado muito o entendimento dessas doenças (Vellodi A, 2004).

2.5 MUCOPOLISSACARIDOSES

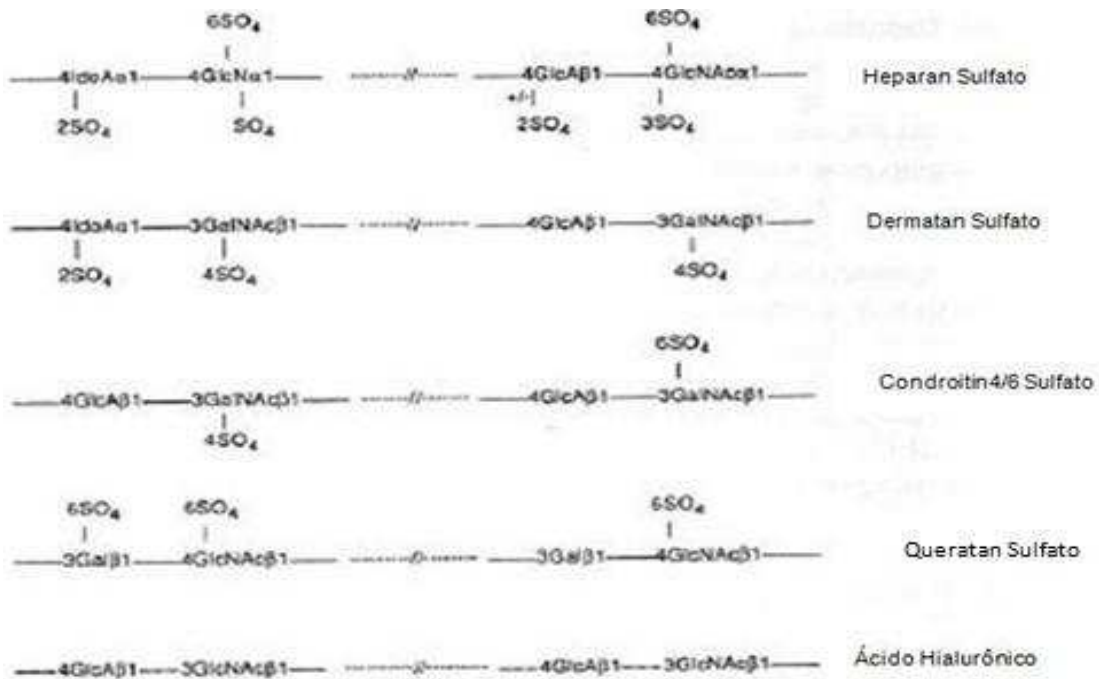
As mucopolissacaridoses (MPS) são um grupo de DLs causadas pela deficiência de enzimas lisossomais específicas (hidrolases ácidas) envolvidas no processamento de carboidratos complexos chamados de glicosaminoglicanos (GAGs). Ao total, há registro de 11 tipos de MPS no banco de dados OMIM (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>), e suas manifestações clínicas variam conforme os diferentes tipos de enzimas responsáveis pela degradação de GAGs específicos (Wei *et al.*, 2011; Ouesletti *et al.*, 2011).

A história natural de todos os tipos caracteriza-se por apresentação clínica multissistêmica progressivas e crônicas, com gravidade e expectativa de vida variáveis. O comprometimento cognitivo e desenvolvimento do Sistema Nervoso Central (SNC) está presente em muitas formas (Fesslova *et al.*, 2009).

Essas síndromes são resultantes de GAGs não degradados ou parcialmente degradados acumulados nos lisossomos resultando em dano irreversível multissistêmico (Duffey *et al.*, 2010). Quando não degradados ou parcialmente degradados são acumulados e ou excretados na urina (Neufeld *et al.*, 2001).

Conforme o resíduo de açúcar, o tipo de ligação existente entre eles e o número e localização dos grupos sulfatos, podemos classificá-los em cinco diferentes grupos: Condroitin-6-Sulfato (C6S), Dermatan Sulfato (DS), Heparan Sulfato (HS), Ácido hialurônico e Queratan sulfato (QS) (figura 2) (Byers *et al.*, 1998).

FIGURA 2: Glicosaminoglicanos



(Fonte: Adaptado de Winchester BG, 1996)

Dentre as MPS I a IX há deficiência de 11 enzimas lisossomais necessárias para a degradação sequencial de: DS, HS, QS, C6S, Ácido Hialurônico; sozinhos ou em combinação (Neufeld et al, 2001) (tabela 1).

A atividade deficiente de qualquer uma das onze enzimas envolvidas na rota de degradação causa acúmulo de substrato parcialmente degradado no interior dos lisossômos e aumento da excreção urinária dos GAGs, levando aos diferentes tipos de MPS (Neufeld et al., 2001).

Tabela 1: Classificação dos tipos de MPS

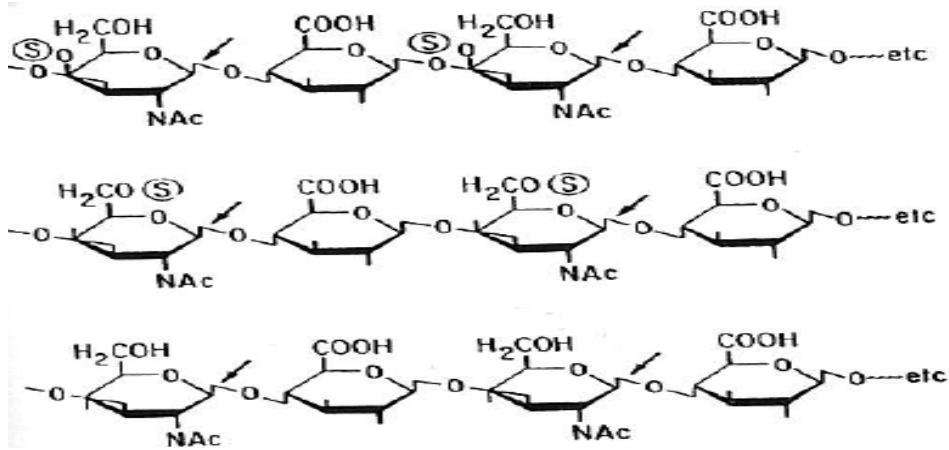
MPS	Enzima deficiente	Sigla	Epônimo	GAGs na urina	Localização do gene
I	α -L-iduronidase	IDUA	Hurler	DS+HS	4p16.3
II	Idorunato-2-sulfatase	IDS	Hunter	DS+HS	Xq28
IIIA	Heparan-N-sulfatase	SGSH	Sanfilipo A	HS	17q25.3
IIIB	α -N-acetilglicosaminidase	NAGLU	Sanfilipo B	HS	17q21
IIIC	AcetilCoA: α -glicosamina acetiltransferase	GNAT	Sanfilipo C	HS	8q11-8p11
IIID	N-acetilglicosamina-6-sulfatase	G6S	Sanfilipo D	HS	12q14
IVA	N-acetilgalactosamina-6-sulfatase	GALNS	Morquio A	QS	16q24.3
IVB	β -galactosidase	GLB1	Morquio B	QS	3p21.33
VI	N-acetilgalactosamina-4-sulfatase	ARSB	Maroteaux-Lamy	DS	5q13-q14
VII	β -glicuronidase	GUSB	Sly	DS+HS	7q21.11
IX	Hialuronidase	HYAL1	Natowicz	CS	3p21.1-p.21.3

(Fonte: Adaptado Neufeld *et al.*, 2001)

2.5.1 MUCOPOLISSACARIDOSE IVA (MPS IVA)

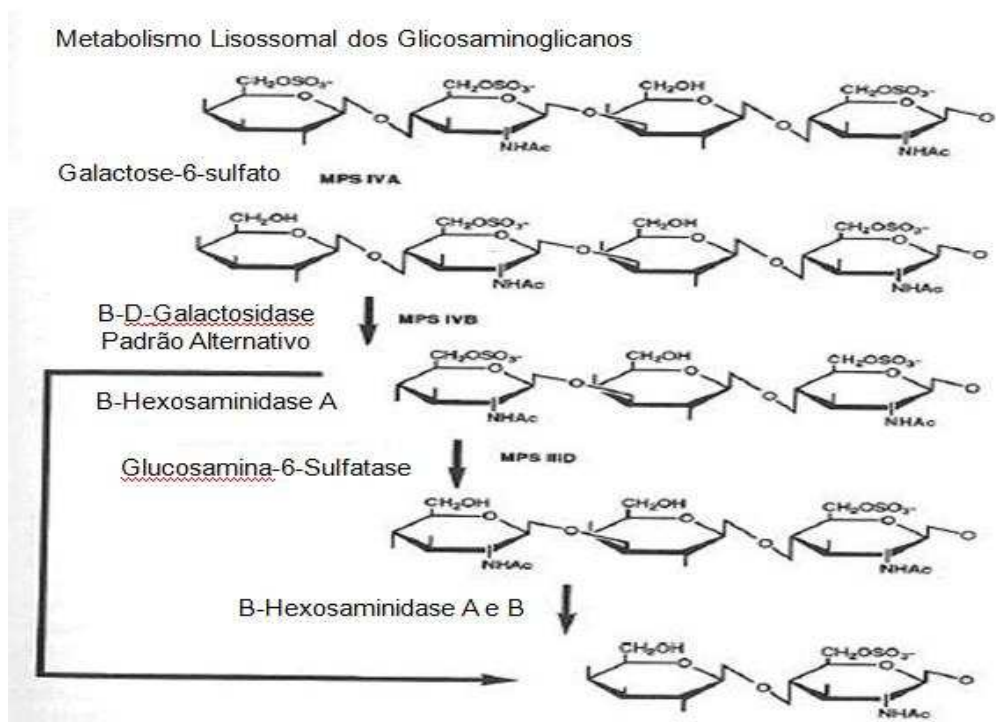
MPS IVA, também conhecida como Síndrome de Morquio A, (OMIM#25300) é uma DLs, com herança autossômica recessiva, causada pela deficiência da enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatase (*GALNS*), responsável pela degradação dos GAGs: Queratan sulfato (QS) e Condroitin-6-sulfato (C6S) (Pajares *et al.*, 2012). A *GALNS* hidrolisa o grupo sulfato de éster do final não reduzido do C6S, e a galactose-6-sulfato do final não reduzido do QS (Orii T, 1997) (figura 3, 4).

FIGURA 3: Estrutura do Condroitin-6-Sulfato



(Fonte: Adaptado de Neufeld *et al.*, 2001)

FIGURA 4: Catabolismo do Queratan Sulfato



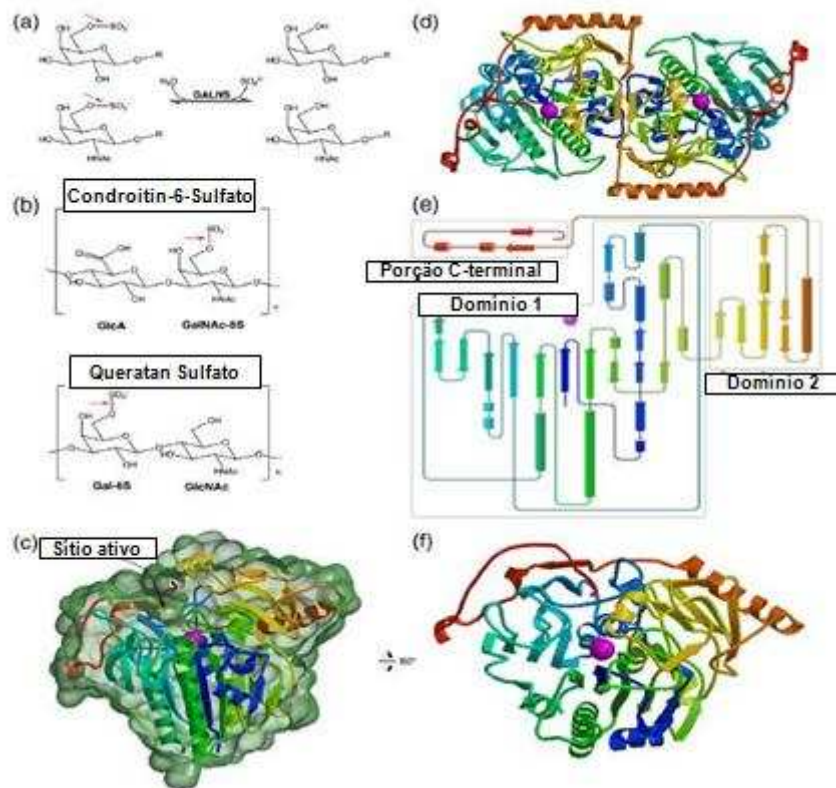
(Fonte: Adaptado de Winchester BG, 1996)

2.5.1.1 N-ACETILGALACTOSAMINA-6-SULFATASE (GALNS)

A *GALNS* foi primeiramente purificada de placenta humana em 1979 (Glössl *et al.*, 1979), como um oligômero com massa molecular de 120kDa, consistindo de polipeptídeos de 40 e 15kDa, ligados por pontes dissulfeto (Masue *et al.*, 1991; Sukegawa *et al.*, 2000) e posteriormente isolada de células hepáticas (Bielicki *et al.*, 1991) e fibroblastos (Glössl *et al.*, 1981; Glössl *et al.*, 1982).

A enzima cliva os grupos sulfato da porção terminal dos GAGs: Queratan sulfato (QS) e Condroitin-6-sulfato (C6S) (figura 5). Defeitos na *GALNS* levam a acúmulo desses substratos, resultando na MPS IVA (Rivera-Cólon *et al.*, 2012; Neufeld *et al.*, 2001).

FIGURA 5: Representação da estrutura da *GALNS* humana

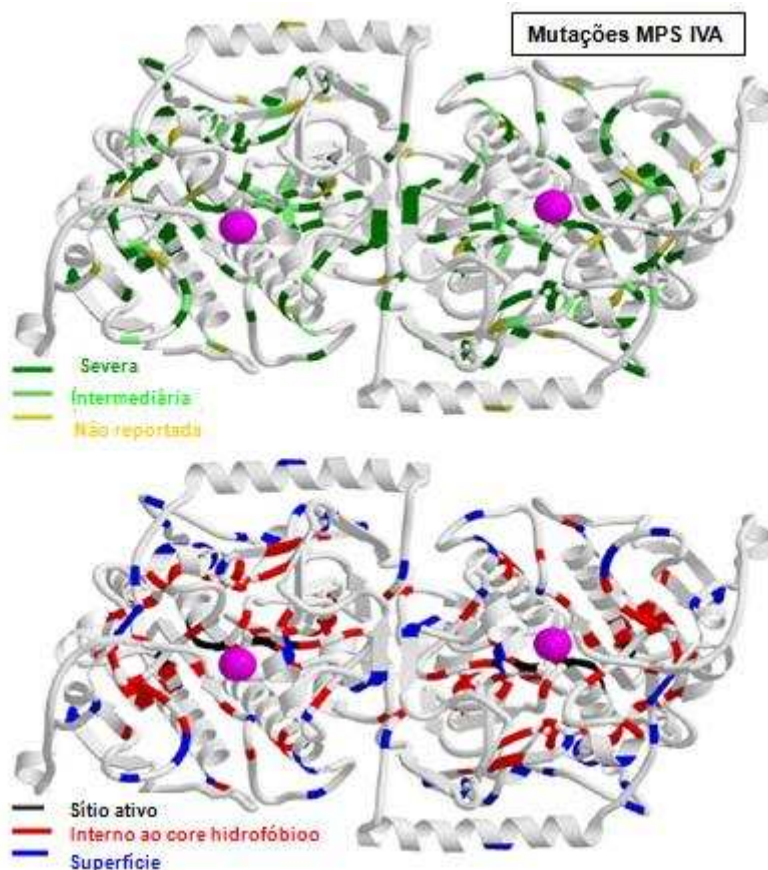


a) *GALNS* cliva porção 6-sulfato dos dissacarídeos de Gal e GalNAc. b) Substratos *GALNS* incluem o Condroitin-6-sulfato e Queratan Sulfato, as setas indicam as pontes de clivagem pela *GALNS*. c) Estrutura monomérica da *GALNS*. d) Estrutura

de dímeros da *GALNS*. e) Diagrama da topologia de monômeros mostrando os domínios. f) Visão ortogonal dos monômeros da *GALNS* vistos abaixo da cadeia β do domínio 1. (Fonte: Adaptado de Rivera-Colón et al., 2012)

Um mapeamento de mutações causadoras da doença foi determinado com base na estrutura tridimensional da enzima. As mutações encontradas seguem três categorias: ruptura do sítio ativo, enovelamento anormal da proteína, e exposição da superfície, sugerindo que tratamentos potenciais dependeriam do genótipo do paciente (figura 6) (Rivera-colón et al., 2012).

FIGURA 6: Mutações na *GALNS* em MPS IVA



(Fonte: Adaptado de Rivera-Cólon et al., 2012)

A estrutura da *GALNS* sugere que a especificidade das sulfatases lisossomais deriva de um grande número de interações com o substrato, através de monossacarídeos sulfatados próximos ao nucleófilo catalítico. Os sintomas

desenvolvidos em decorrência da perda da atividade enzimática não são compensados pela presença de outras sulfatases funcionais (Rivera-Cólon *et al.*, 2012).

MPS IVA é uma doença primariamente decorrente de enovelamento protéico incorreto porque a maioria das mutações resultam na interrupção do core hidrofóbico da proteína. O domínio 1 aparece sendo um suporte (*scaffold*) crítico para toda estrutura da GALNS (Rivera-Cólon *et al.*, 2012).

2.5.1.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

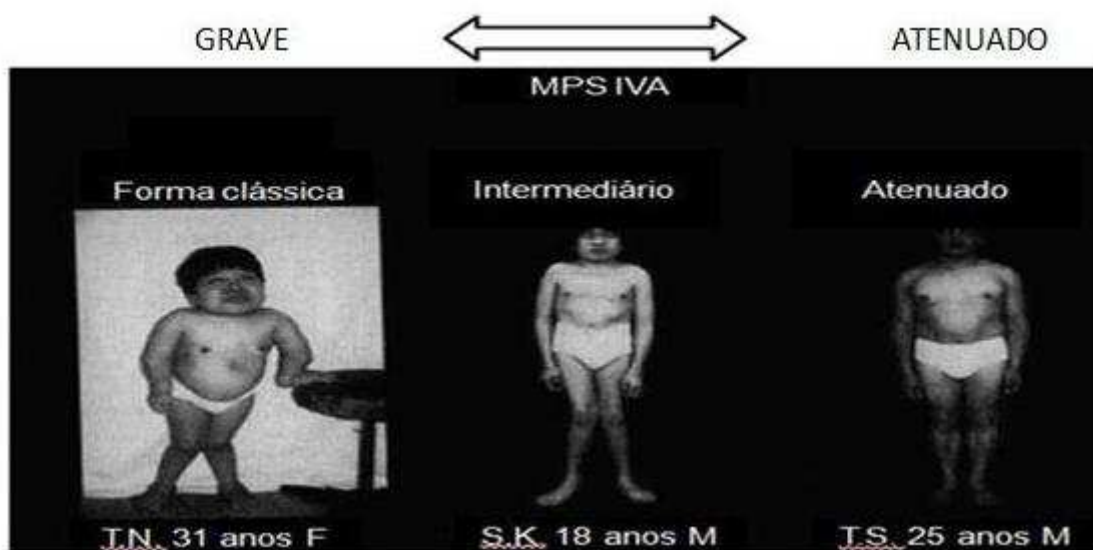
Na ausência dessa enzima os tecidos ricos nesses GAGs são afetados incluindo cartilagem, córnea e válvulas cardíacas, explicando as principais características fenotípicas (Shing *et al.*, 1976; Dvorak-Ewell *et al.*, 2011).

O acúmulo lisossomal desses substratos, e conseqüentemente, disfunção celular levam a manifestações clínicas tais como: displasia esquelética levando a baixa estatura, platispondilia, cifose torácica, escoliose, displasia epifisal e de articulações, deformidade valga de membros inferiores, pés planos, esterno proeminente (*pectus carinatum*), deformidade no crânio e escafocefalia, hipoplasia de odontóide (Zustin *et al.*, 2010; Geetha *et al.*, 2010; Visochi *et al.*, 2009; Montañó *et al.*, 2008; Montañó *et al.*, 2007; Bank *et al.*, 2009).

As crianças parecem normais ao nascimento com progressão para estágio avançado da doença em poucos anos, mais de 70% dos pacientes tem manifestações clínicas iniciais a partir dos primeiros anos de vida (Tomatsu *et al.*, 2011).

Os fenótipos são variáveis entre a forma clássica (expectativa de vida de 20 a 30 anos) onde há grave envolvimento esquelético, anormalidades dentárias, opacidade da córnea, alto risco de instabilidade atlanto-axial levando a compressão medular e falência respiratória (Davison *et al.*, 2012). Por outro lado, a forma atenuada apresenta envolvimento esquelético leve e expectativa de vida normal (Khedhiri *et al.*, 2011; Tomatsu *et al.*, 1997). Os diferentes espectros fenotípicos (grave, intermediário, atenuado) são exemplificados na figura 7.

FIGURA 7: Espectro clínico de pacientes com MPS IVA



(Copyright da Universidade de Gifu) Paciente com forma clássica: 90cm; forma intermediária: 135cm; forma atenuada 157cm.

(Fonte: Adaptado de Tomatsu et al., 2011)

Outras complicações potenciais incluem comprometimento pulmonar, cardiopatia, perda de audição condutiva e neurossensorial, dentre outras. A inteligência é normal ou pouco comprometida neste tipo de MPS (Montaño *et al.*, 2007; Pagel *et al.*, 2009).

2.5.1.3 INCIDÊNCIA

A incidência de MPS IVA difere entre as diferentes populações, com relatos de 1:76.000 nascidos vivos na Irlanda do Norte, 1:200.000 Reino Unido, 1:201.000 Austrália, 1:450.000 Holanda e Portugal, 1:625.000 Japão para 1:640.000 no Oeste da Austrália (Tomatsu *et al.*, 2011).

2.5.1.4 DIAGNÓSTICO

Análise dos GAGs na urina foi o primeiro método diagnóstico disponível para MPS e permanece útil como teste diagnóstico preliminar (Neufeld *et al.*, 2001).

Os pacientes com MPS IVA excretam QS em quantidade aumentada na urina, tal mucopolissacaridúria pode ser detectada por testes quantitativos, semiquantitativos, e qualitativos. Estes testes são rápidos, baratos e úteis para a avaliação laboratorial inicial do paciente, mas estão associados a resultados falso-positivos e falso-negativos (Barth *et al.*, 1990). O diagnóstico definitivo da MPS IVA depende, portanto, da demonstração da deficiência enzimática, preferencialmente em leucócitos (Neufeld *et al.*, 2001). O diagnóstico diferencial através da dosagem de outras sulfatases deve ser realizado para exclusão de deficiência múltipla de sulfatases (Artigalás *et al.*, 2009).

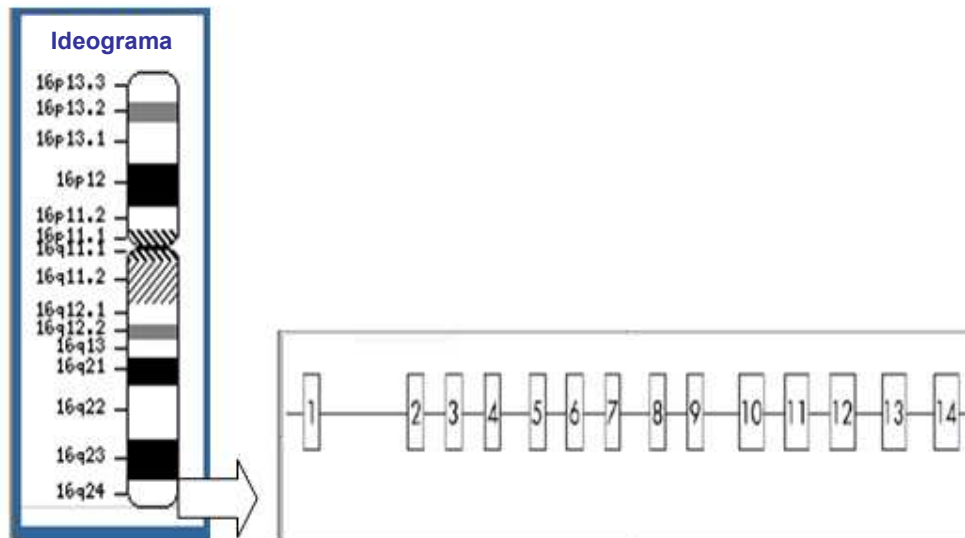
Entretanto, ensaios enzimáticos não diferenciam a forma leve da forma grave. Além disso, a detecção enzimática de portadores é menos confiável devido à sobreposição da atividade da *GALNS* em leucócitos ou fibroblastos de heterozigotos obrigatórios e controles normais (Orie T., 1997).

O diagnóstico precoce é extremamente importante, uma vez que os indivíduos parecem normais ao nascimento, e permite a detecção antecipada de complicações tais como lesões cardíacas por meio de ecocardiograma, problemas respiratórios, entre outras medidas de suporte (Fesslova *et al.*, 2009; Leboulanger *et al.*, 2011).

2.5.1.5 ASPECTOS MOLECULARES

O cDNA (DNA complementar) da *GALNS* foi isolado e caracterizado por Tomatsu *et al.*, 1991, o gene foi mapeado no cromossomo 16q24.3, é composto por 14 éxons e 13 íntrons (figura 8), com tamanho aproximado de 50kb (Tomatsu *et al.*, 1991; Tomatsu *et al.*, 1992; Baker *et al.*, 1993; Masuno *et al.*, 1993; Nakashima *et al.*, 1994).

FIGURA 8: Localização cromossômica e estrutura do gene *GALNS*



(Fonte: Adaptado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)

O gene é membro da família das sulfatases, das quais 13 genes em humanos já foram clonados. Todos os produtos gênicos das sulfatases são relacionados, mostrando 20-35% de similaridade em nível de aminoácidos (Dierks *et al.*, 2003).

Até o momento 184 diferentes mutações foram descritas (HGMD), 138 missense-nonsense, 14 em sítios de splicing, 19 pequenas deleções, 3 pequenas inserções, 1 pequena indel, 5 grandes deleções, 2 grandes inserções e 2 mutações complexas (<http://www.hgmd.org>, acesso em Novembro, 2012). Tal heterogeneidade leva a ampla variabilidade clínica (Montaño *et al.*, 2007). As mutações p.G116S, p.G139S, p.L307P, p.N164T, p.R386C e p.S341R são recorrentes em pacientes brasileiros não relacionados, conforme estudos de Tomatsu *et al.*, 2004; 2005).

2.5.1.6 CORRELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO

Estudos com modelos terciários da *GALNS* demonstraram que as mutações graves estão relacionadas com peptídeos localizados na estrutura do core levando a destruição do domínio hidrofóbico, modificação do empacotamento, ou modificação do sítio ativo. Em contraste, mutações atenuadas são mais associadas com

peptídeos anormais localizados na superfície da proteína nativa (Tomatsu *et al.*, 2006; Sukegawa *et al.*, 2000; Yan *et al.*, 2009).

No entanto, a frequência e localização das mutações missense não é randomizada, o espectro de mutações e o fenótipo correspondente são provavelmente determinados pela combinação de: mutação a nível de DNA (sequência primária), nível de conservação evolucionária entre as famílias de proteínas, nível de conservação da mudança de aminoácidos, ambiente da proteína que afeta funcionamento e estrutura da proteína terciária (Tomatsu *et al.*, 2006).

Para elucidar a correlação entre genótipo-fenótipo foram analisados fibroblastos de pacientes com MPS IVA, mostrando que nos pacientes com fenótipo grave a atividade da *GALNS* é menor que 1%, enquanto em muitos pacientes com fenótipo atenuado há alta atividade residual (2,2-11,4% *GALNS* selvagem). Esses achados indicam boa relação entre nível de atividade enzimática e fenótipo clínico para pacientes com fenótipo grave.

Entretanto, tal correlação em pacientes com mutações atenuadas não está bem documentada devido à atividade enzimática residual de alguns pacientes (Montaño *et al.*, 2007). Uma possível explicação seria a localização dessas mutações em regiões específicas fora das regiões altamente conservadas entre as sulfatases (Montaño *et al.*, 2007).

Há também relação entre o status da mutação (homozigose x heterozigose), uma vez que, pacientes heterozigotos (por exemplo: combinação de mutação atenuada e severa) manifestam sintomas clinicamente mais atenuados que pacientes com mutações severas em homozigose, corroborando a hipótese de que atividade da *GALNS* pode proteger contra fenótipo grave (Tomatsu *et al.*, 2005).

Contudo, análises de mutação no gene da *GALNS* mostram grande heterogeneidade alélica, o que dificulta o estabelecimento de correlação genótipo-fenótipo (Pajares *et al.*, 2012).

2.5.1.7 TRATAMENTO

Até o momento não há cura para a doença, os tratamentos propostos são: Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas (TCTH), no entanto não é muito

descrito em pacientes com MPS IVA por não fornecer melhora imediata nas manifestações esqueléticas (Tomatsu *et al.*, 2011). Estudos com Terapia Gênica (TG), em desenvolvimento (Alméciga-Díaz *et al.*, 2010), juntamente com ensaios clínicos em Fase III de Terapia de Reposição Enzimática (TRE), nos quais os pacientes recebem semanalmente enzima recombinante (Martell *et al.*, 2011). Alguns estudos propõem uma variante da enzima com 6 resíduos de glutamato adicionais na porção *N-terminal* para melhora da absorção nos ossos dos pacientes (Tomatsu *et al.*, 2010).

Podem ser realizadas medidas paliativas e de suporte para tratamento das comorbidades associadas, através de: cirurgias ortopédicas, respiratórias, procedimentos odontológicos, acompanhamento oftalmológico, cardíaco, fisioterapia (Tomatsu *et al.*, 2011).

Na América do Sul, o centro escolhido para participar do estudo de TRE foi o Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SGM/HCPA).

3 JUSTIFICATIVAS

1) O Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SGM-HCPA) é conhecido como Centro de Referência Nacional e Sul-Americano para Doenças Lisossômicas, principalmente para as Mucopolissacaridoses.

2) O SGM conta também com a Rede MPS Brasil uma parceria envolvendo diversos serviços que atendem pacientes com Mucopolissacaridoses, tendo como objetivos principais facilitar o acesso ao diagnóstico, tratamento e prevenção dessas doenças, bem como apoiar o desenvolvimento de pesquisas na área.

3) A necessidade da caracterização genotípica dos pacientes, sendo este um critério de inclusão em estudos para terapias em desenvolvimento.

4) A escassez de estudos deste gênero, principalmente na América do Sul.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

O objetivo primário deste projeto foi:

a) Analisar e caracterizar o genótipo de pacientes com MPS IVA, através do estudo molecular de mutações no gene *GALNS*.

4.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

a) Calcular a frequência das mutações encontradas nos pacientes brasileiros, comparando com outras populações mundiais.

b) Estabelecer um protocolo de rotina para triagem de mutações comuns com base na frequência e na localização exônica observada.

5 METODOLOGIA

5.1 POPULAÇÃO EM ESTUDO

Foram estudados os pacientes com MPS IVA diagnosticados no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo- LEIM/HCPA e nos vários serviços ou laboratórios de Genética Medica existentes no país e na América Latina, através de um estudo de casos.

Os pacientes foram convocados por carta, telefone ou e-mail a comparecer a um serviço associado, onde o investigador (ou médico responsável) procedeu à explicação do estudo e convidou formalmente o paciente e os possíveis portadores a participarem do mesmo. Após a aceitação do convite, o Termo de Consentimento livre-esclarecido (TCLE) foi preenchido pelos pacientes ou pais/ responsáveis (caso

o paciente fosse menor de idade) e pelos possíveis portadores (Anexo I). Além dos pacientes, familiares maiores de 16 anos (mãe, pai, e irmãos) também foram convidados a participarem do estudo.

5.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

5.2.1 PACIENTES

Foram incluídos na amostra todos os pacientes cujo diagnóstico de MPS IVA foi confirmado através: da redução da atividade da *GALNS* em plasma, leucócitos ou fibroblastos; da existência de acúmulo de GAGs (dosagem urinária de GAGs aumentada ou cromatografia/eletroforese de GAGs com Queratan e Condroitin-6-sulfato ou de um quadro clínico compatível).

5.2.2 POSSÍVEIS PORTADORES

Foram considerados possíveis portadores: as mães, os pais e irmãos (os) dos pacientes previamente incluídos na amostra, devendo estes ser maiores de 16 anos.

5.3 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram coletados 5 ml de sangue total com anticoagulante EDTA (Ácido etilenodiamino tetra-acético), para análise molecular;

5.4 DESCRIÇÃO DAS TÉCNICAS UTILIZADAS

A análise bioquímica foi realizada pelo LEIM como parte da rotina assistencial para pacientes com suspeita de MPS. O estudo do genótipo dos pacientes e dos possíveis portadores foi realizado em três passos: extração de DNA, identificação de mutações comuns através de PCR-ARMS (*Amplification Refractory Mutation*

System), amplificação da região codificante e junções éxon/intron do gene *GALNS* seguido de sequenciamento automatizado do gene para identificação de mutações novas e/ou polimorfismos.

5.4.1 GENÓTIPO

- *Passo 1: Extração de DNA*

O DNA genômico foi extraído a partir de 5 ml de sangue total com EDTA, coletado através de punção venosa periférica, de acordo com o método de precipitação com sais, descrito por Miller *et al* (1988). O DNA obtido por esta técnica, livre de RNA, proteínas e enzimas degradantes, é considerado de boa qualidade para utilização em diversas análises por biologia molecular.

- *Passo 2: Identificação de mutações comuns*

Para a identificação de mutações recorrentes na população brasileira (tabela 2), foi utilizada a técnica de PCR-ARMS, onde dois *primers* senso são desenhados com extremidades 3' complementares ao alelo normal ou mutado (alelo específicos) e um *primer* anti-senso complementar a ambos alelos, amplificando assim sequências distintas (Duta-Cornescu *et al.*, 2009).

A técnica é baseada no princípio de que a Taq DNA polimerase não apresenta atividade 3'-5' exonuclease, de modo que o mau pareamento entre a extremidade 3' do *primer* e o DNA molde resulta na impossibilidade de amplificação. A escolha das mutações recorrentes baseia-se em estudos prévios que identificaram estas mutações na população Brasileira (Tabela 2) (Tomatsu *et al.*, 2004; 2005).

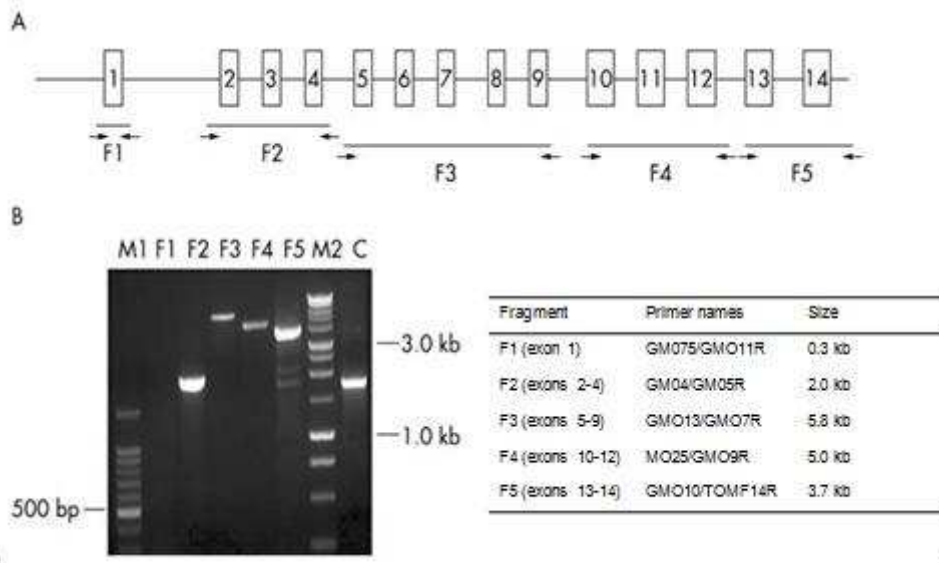
Tabela 2: Mutações recorrentes

Mutação patogênica	Éxon
p.G116S	IV
p.G139S	IV
p.N164T	V
p.L307P	IX
p.S341R	X
p.R386C	XI

-Passo 3: Amplificação da região codificante e junções éxon/intron do gene GALNS e sequenciamento

Os éxons que compõem o gene da *GALNS* foram amplificados através do método da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (figura 9). A PCR é um método *in vitro* que permite a síntese enzimática de seqüências específicas de DNA, usando dois iniciadores (*primers*) de oligonucleotídeos que hibridizam a fitas opostas e flanqueiam a região de interesse no DNA a ser analisado.

Uma série repetida de ciclos envolvendo desnaturação do DNA, anelamento (hibridização) com o *primer* e extensão dos *primers* hibridizados pela DNA polimerase resulta no acúmulo exponencial de um fragmento específico cujas extremidades são definidas pelas terminações 5' dos *primers* (Erlich HA, 1989). Os primers utilizados são os mesmos descritos por Tomatsu *et al.*, 2004 e amplificam 5 regiões sobrepostas que incluem os 14 éxons do gene *GALNS*.

FIGURA 9: Localização dos primers e tamanho dos fragmentos

(Fonte: Adaptado de Tomatsu *et al.*, 2004)

Após amplificação dos fragmentos citados acima, foi feito o sequenciamento de todos os éxons do gene *GALNS*, através de primers internos específicos, desenhados pela equipe de investigadores, a fim de caracterizar o genótipo de cada paciente.

As amostras foram enviadas para o Laboratório de Análise de Metabolitos e Proteínas (UAMP) do Centro de Pesquisas do HCPA, devidamente preparadas, conforme protocolo do prestador de serviço, após a purificação do produto da PCR através de reação com Exonuclease I (EXO I) que degrada as fitas simples de DNA na direção 3' → 5', liberando assim os desoxirribonucleosídeos 5'-monofosfatos em um único passo e deixando os dinucleotídeos 5'-terminal intactos.

Além da EXO I, o uso da Fosfatase Alcalina de Camarão (SAP I) catalisa a liberação dos grupos 5' e 3'-fosfato do DNA, RNA, desoxirribonucleotídeos, ribonucleotídeos, mono-, di- e trifosfatos. Dessa maneira, a combinação dessas duas enzimas pode "limpar" os produtos de PCR, dos restos dNTPs (Desoxirribonucleotídeos fosfatados) e de oligonucleotídeos não incorporados na reação.

5.5 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – Projeto 11-0214 (Anexo II).

Todos os pacientes incluídos neste estudo preencheram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo I), previamente aprovado. Foi oferecido para os indivíduos pesquisados e seus familiares um atendimento para esclarecimento de eventuais dúvidas quanto ao resultado e significado destes exames e dos possíveis impactos ou riscos que estejam envolvidos para os pacientes e suas famílias.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) ALMÉCIGA-DÍAZ CJ.; MONTAÑO AM.; TOMATSU S.; BARRERA LA. (2010) Adeno-associated virus gene transfer in Morquio A disease- effect of promoters and sulfatase-modifying factor 1. FEBS Journal, 277, 3608-3619.
- 2) ARTIGALÁS OA.; SILVA LR.; BURIN M.; PASTORES GM.; ZENG B.; MACEDO N.; SCHWARTZ IVD. (2009). Multiple sulfatase deficiency: clinical report and description of two novel mutations in a Brazilian patient. Met Brain Dis 24: 493-500.
- 3) BAKER E.; GUO XH.; ORSBORN AM.; SUTHERLAND GR.; CALLEN DF.; HOPWOOD JJ.; MORRIS CP. (1993). The Morquio A Syndrome (Mucopolysaccharidosis IVA) Gene Maps to 16q24.3. Am J Hum Genet 52: 96-98.
- 4) BANK RA.; GROENER JEM.; GEMUND JJV.; MAASWINKEL PD.; HOEBEN KA.; SCHUT HA.; EVERTS V. (2009). Deficiency in N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase results in collagen perturbations in cartilage of Morquio syndrome A patients. Molecular Genetics and Metabolism 97: 196-201.

- 5) BARTH P.G.; VRENSEN G.F.; UYLINGS H.B.; OORTHUYS J.W.; STAM F.C. (1990). Inherited syndrome of microcephaly, dyskinesia and pontocerebellar hypoplasia: a systemic atrophy with early onset. *J Neurol Sci* 97, 25-42.
- 6) BELLETTATO CM.; SCARPA M.; (2010) Pathophysiology of neuropathic lysosomal storage disorders. *J Inherit Metab Dis* 33:347–62.
- 7) BIELICKI J; HOPWOOD JJ.; (1991). Human liver N-acetylgalactosamine 6-sulphatase. Purification and characterization. *Biochem J* 279, 515–520.
DAVISON JE.; KEARNEY S.; HORTON J.; FOSTER K.; PEET AC.; HENDRIKSZ CJ. (2012) Intellectual and neurological functioning in Morquio syndrome (MPS IVa). *J Inherit Metab Dis*: 1-6.
- 8) DE DUVE C.; PRESSMAN B.C.; GIANETTO R.; WATTIAUX R.; APPELMANS F. (1955) Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochemical Journal*, 60, 604– 617.
- 9) DIERKS T; SCHMIDT B ; BORISSENKO LV; PENG J; PREUSSER A ; MARIAPPAN M ; von FIGURA K ; (2003). Multiple sulfatase deficiency is caused by mutations in the gene encoding the human α -formylglycine generating enzyme. *Cell* 113, 435–444.
- 10) DORFMAN A.; MATALON R. (1976) The Mucopolysaccharidosis (A Review). *Proc. Nat. Acad. Sci* 73:630-637.
- 11) DHERAI AJ. (2012) Inborn Error of Metabolism and Their Status in India. *Clin Lab Med* 32: 263-279.
- 12) DUBOIS G.; TURPIN JC.; BAUMANN N. (1975) Arylsulfatases isoenzymes in metachromatic leucodystrophy/detection of a new variant by electrophoresis improvement of quantitative assay. *Biomedicine* 23: 116-119.
- 13) DUTA-CORNESCU G.; SIMON-GRUITA A.; CONSTANTIN N.; STANCIU F.; DOBRE M.; BANICA D.; TUDUCE R.; CRISTEA P.; STOIAN V. (2009) A

comparative study of ARMS-PCR and RFLP-PCR as methods for rapid SNP identification. *Rom. Biotechnol. Lett* 14 (6): 4845-4850.

14) DUFFEY TA.; KHALIQ T.; SCOTT CR.; TURECEK F.; GELB MH. (2010) Design and synthesis of substrates for newborn screening of Maroteaux-Lamy and Morquio A Syndromes. *Bioorganic & Medical Chemistry Letters* 20: 5994-5996.

15) DVORAK-EWELL M.; WENDT D.; HAGUE C.; CHRISTIANSON T.; KOPPAKA V.; CRIPPEN D.; KAKKIS E.; VELLARD M. (2011) "Enzyme replacement in a human model of mucopolysaccharidosis IVA in vitro and its biodistribution in the cartilage of a wild type mice". *Plos one* 5 (8): 1-11.

16) ERLICH HA. (1989) Polymerase chain reaction. *J Clin Immunol* 9, 437-447.

17) FÖLLING A. 1934. Über Ausscheidung von Phenylbrenztraubensäure in den Harn als Stoffwechselanomalie in Verbindung mit Imbezillitat. *Hopp Seylers Z Physiol Chem* 277:169–176.

18) GARROD AE. (1902) The incidence of alkaptonuria: a study in chemical individuality. *Lancet* 2:1616–20.

19) GEETHA L.; RADHAKRISHANN M.; RAGHAVENDRA BS.; RAO GSU.; DEVI BI. (2010) Anesthetic management for foramen magnum decompression in a patient with Morquio syndrome: a case report. *J Anesth* 24: 594-597.

20) GIESELMANN V. (1995) Lysosomal storage diseases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1270: 103-136.

21) GIUGLIANI R. (2012) Newborn screening for lysosomal diseases: current status and potential interface with population medical genetics in Latin America. *J Inherit Metab Dis* 35: 871-877.

- 22) GLÖSSL J; TRUPPE W; KRESSE H; (1979). Purification and properties of N-acetylgalactosamine 6-sulphate sulphatase from human placenta. *Biochem J* 181, 37–46.
- 23) GLÖSSL J; MAROTEAUX P; Di NATALE P; KRESSE H; (1981). Different properties of residual N-acetylgalactosamine- 6-sulfate sulfatase in fibroblasts from patients with mild and severe forms of Morquio disease type A. *Pediatr Res* 15, 976–978.
- 24) GLÖSSEL J; KRESSE H; (1982). Impaired degradation of keratan sulphate by Morquio A fibroblasts. *Biochem J* 203, 335–338.
- 25) HENDRIKSZ CJ.; AL-JAWAD M.; BERGER KI.; HAWLEY SM.; LAWRENCE R.; ARDLE CM.; SUMMERS CG.; WRIGHT E.; BRAULIN E. (2012) Clinical overview and treatment options for non-skeletal manifestations of mucopolysaccharidosis type IVA. *J Inherit Metab Dis*: 1-14.
- 26) KHEDHIRI S.; CHKIOUA L.; FERCHICHI S.; MILED A.; LARADI S. (2011) Polymorphism in Tunisian patients with N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase gene deficiency: Implications in Morquio A disease. *Diagnostic Pathology* 6: 1-5.
- 27) LÉBOULANGER N.; LOUIS B.; VIALLE R.; HERON B.; FAUROUX B. (2011) Analysis of the Upper Airway by the Acoustic Reflection method in children with Mucopolysaccharidosis. *Pediatric Pulmonology* 46: 587-594.
- 28) LUZIO J.P.; ROUS B.A.; BRIGHT N.A.; PRYOR P.R.; MULLOCK B.M.; PIPER R.C. (2000) Lysosome-endosome fusion and lysosome bio- genesis. *Journal of Cell Science*, 113 (Part 9), 1515–1524.
- 29) MARTELL L; LAU K; MEI M; BURNETT V; DECKER C; FOEHR ED; (2011). Biomarker analysis of Morquio syndrome: identification of disease state and drug responsive markers. *Orphanet J Rare Dis* 6, 84.

- 30) MASUE M.; SUKEGAWA K.; ORII T.; HASHIMOTO T. (1991) N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase in human placenta: Purification and characterization. *J Biochem* 110: 965-970.
- 31) MASUNO M.; TOMATSU S.; NAKASHIMA Y.; HORI R.; FUKUDA S.; MASUE M.; SUKEGAWA K.; ORII T. (1993) Mucopolysaccharidosis IVA: assignment of the human N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase (GALNS) gene to the chromosome 16q24. *Genomics* 16: 777–778.
- 32) MILLER SA.; DYKES DD.; POLESKY H.F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16, 1215.
- 33) MOINI M.; MISTRY P.; SCHILSKY ML. (2010) Liver transplantation for inherited metabolic disorders of the liver. *Curr Opin Organ Transplant* 15(3):269 –76.
- 34) MONTAÑO AM.; TOMATSU S.; BRUSIUS A.; SMITH M.; ORII T. (2008) Growth charts for patients affected with Morquio A disease. *Am J Med Genet A* 146: 1286-1295.
- 35) MONTAÑO AM.; TOMATSU S.; GOTTESMAN GS.; SMITH M.; ORII T. (2007) International Morquio A Registry: clinical manifestation and natural course of Morquio A disease. *J Inherit Metab Dis* 30: 165-174.
- 36) NAKASHIMA Y.; TOMATSU S.; HORI T.; FUKUDA S.; SUKEGAWA K.; KONDO N.; SUZUKI Y.; SHIMOZAWA N.; ORII T. (1994) Mucopolysaccharidosis IVA: Molecular cloning of the human N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase gene (GALNS) and analysis of the 5' flanking region. *Genomics* 20: 99-104.
- 37) NERI M.; RICCA A.; GIROLAMO I.; ALCALA'-FRANCO B.; CAVAZZIN C.; ORLACCHIO A.; MARTINO S.; NALDINI L.; GRITTI A. (2011) Neural stem cell gene therapy ameliorates pathology and function in a mouse model of globoid cell leukodystrophy. *Stem Cells* 29(10):1559 –71.

38) NEUFELD E.; MUENZER J, (2001). The mucopolysaccharidoses In: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease (ed.: Scriver C. et. al.). McGraw Hill, New York, 8th ed., 2001, pp. 3421-3452.

39) NOVIKOFF AB. (1973) Lysosomes A personal account. In: Lysosomes and Storage Diseases (ed. By H.G. Hers & F. Van Hoof), pp.2-41. Academic Press, New York.

40) ORII T. (1997) Molecular basis of Zellweger Syndrome, β -Ketothiolase deficiency and Mucopolysaccharidoses. *Jnp J Human Genet* 42: 1-11.

41) OUESLETTI S.; BRUNEL V.; TURKIA HB.; DRANGUET H.; MILED A.; MILADI N.; DRIDI MFB.; LAVOINNE A.; SAUGIER-VEBER P.; BEKRI S. (2011) Molecular characterization of MPSIIIA, MPSIIIB and MPS IIIC in Tunisian Patients. *Clinica Chimica Acta*: 1-6.

42) PAGEL PS.; ALMASSI GH. (2009) Perioperative implications of Morquio Syndrome in a 31-Year-Old Woman undergoing aortic valve replacement. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia* 23 (6): 855-857.

43) PARKINSON-LAWRENCE EJ.; SHANDALA T.; PRODOEHL M.; PLEW R.; BORLACE GN.; BROOKS DA. (2010) Lysosomal storage disease: revealing lysosomal function and physiology. *Physiology (Bethesda)* 25:102–15.

44) PASTORES GM. (2008) Inborn errors of metabolism of the nervous system. In: Bradley WJ, editor. *Neurology in clinical practice*. 5th edition. Philadelphia: Elsevier; p. 1761–83.

45) PENROSE LS.; QUASTEL JH. (1937) Metabolic studies in phenylketonuria. *Biochem J* 31:266–271.

46) REDDY A.; CALER EV.; ANDREWS NW.; (2001) Plasma membrane repair is mediated by Ca(2+)-regulated exocytosis of lysosomes. *Cell*, 106, 157–169.

- 47) RIVERA-COLÓN Y.; SCHUTSKY EK.; KITA AZ.; GARMAN SC.; (2012) The Structure of Human GALNS reveals the molecular basis of Mucopolysaccharidosis IV A. *Journal of Molecular Biology*, 1-16.
- 48) RUIVO R.; ANNE C.; SAGNÉ C.; GASNIER B. (2009) Molecular and cellular basis of lysosomal transmembrane protein dysfunction. *Biochimica et Biophysica acta* 1793: 636-649.
- 49) SAUDUBRAY JM. Diagnosis and Treatment: General Principles. In: *Inborn Metabolic Diseases*. 5th ed. Berlin: Springer; p.3-55.
- 50) SCRIVER CR. (2007) The PAH Gene, Phenylketonuria, and a Paradigm Shift. *Hum Mutat* 28 (9): 831-845.
- 51) SUGIE K.; KOORI T.; YAMAMOTO A.; OGAWA H.; HIRANO M.; INOUE K.; NONAKA I.; NISHINO I. (2003) Characterization of Danon disease in a male patient and his affected mother. *Neuromuscular Disorders* 13: 708-711.
- 52) SUKEGAWA K.; NAKAMURA H.; KATO Z.; TOMATSU S.; MONTAÑO AM.; FUKAO T.; TOIETTA G.; TORTORA P.; ORII T.; KONDO N. (2000) Biochemical and structural analysis of missense mutations in N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase causing mucopolysaccharidosis IVA phenotypes. *Human Molecular Genetics* 9 (9): 1283-1290.
- 53) TOMATSU S.; FUKUDA S.; MASUE M.; SUKEGAWA K.; FUKAO T.; YAMAGISHI A.; HORI T.; IWATA H.; OGAWA T.; NAKASHIMA Y.; HANYU Y.; HASHIMOTO T.; TITANI K.; OYAMA R.; SUZUKI M.; YAGI K.; HAYASHI Y.; ORII T. (1991) Morquio Disease: Isolation, Characterization and expression of full-length cDNA for human N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase. *Biochemical and Biophysical research communications* 181 (2): 677-683.
- 54) TOMATSU S.; FUKUDA S.; COOPER A.; WRAITH JE.; FERREIRA P.; NATALE PD.; TORTORA P.; FUJIMOTO A.; KATO Z.; YAMADA N.; ISOGAI K.; YAMAGISHI

A.; SUKEGAWA K.; SUZUKI Y.; SHIMOZAWA N.; KONDO N.; SLY WS.; ORII T. (1997) Fourteen novel Mucopolysaccharidosis IVA producing mutations in *GALNS* gene. *Human Mutation* 10: 368-375.

55) TOMATSU S.; DIETER T.; SCHWARTZ IV.; SARMIENT P.; GIUGLIANI R.; BARRERA LA.; GUELBERT N.; KREMER R.; REPETTO GM.; GUTIERREZ MA.; NISHIOKA T.; SERRATO OP.; MONTAÑO AM.; YAMAGUCHI S.; NOGUCHI A. (2004) Identification of a common mutation in mucopolysaccharidosis IVA: correlation among genotype, phenotype, and keratan sulfate. *J Human Genet* 49: 490-494.

56) TOMATSU S.; NISHIOKA T.; MONTAÑO A.; GUTIERREZ MA.; PENA OS.; ORII KO.; SLY WS.; YAMAGUCHI S.; ORII T.; PASCHKE E.; NOGUCHI A. (2004). Mucopolysaccharidosis IVA: identification of mutations and Methylation study in *GALNS* gene. *J Med Genet* 41: 1-6.

57) TOMATSU S.; MONTAÑO A.; NISHIOKA T.; GUTIERREZ MA.; PEÑA OM.; TRANDAFIRESCU GG.; LOPEZ P.; YAMAGUCHI S.; NOGUCHI A.; ORII T. (2005). Mutation and polymorphism spectrum of the *GALNS* gene in Mucopolysaccharidosis IVA (Morquio A). *Human Mutation* 26 (6): 500-512.

58) TOMATSU S; MONTANO AM; DUNG VC; OHASHI A; OIKAWA H; OGUMA T; et al; (2010). Enhancement of drug delivery: enzyme-replacement therapy for murine Morquio A syndrome. *Mol Ther* 18, 1094–1102.

59) TOMATSU S.; MONTAÑO AM.; OIKAWA H.; ROWAN DJ.; SMITH RM.; BARRERA L.; CHINEN Y.; THACKER MM.; MACKENZIE WG.; SUZUKI Y.; ORII T. (2011) Mucopolysaccharidosis Type IVA (Morquio A Disease):Clinical Review and Current Treatment: A special Review. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 12: 931-945.

60) VALAYANNOPOULOS V.; BRASSIER A.; CHABLI A.; CAILLAUD C.; LEMOINE M.; ODENT T.; ARNOUX JB.; LONLAY P. (2011) Le traitement par enzymothérapie des maladies lysosomales. *Archives de pédiatrie*: 1-5.

- 61) VELLODI A. (2004) Lysosomal storage diseases. *British Journal of hematology* 128: 413-431.
- 62) VISOCHI M.; FERNANDEZ E.; CIAMPINI A.; ROCCO CD. (2009) Reducible and irreducible os odontoideum in childhood treated with posterior wiring, instrumentantion and fusion. Past or present? *Acta Neurochir* 151: 1265-1274.
- 63) VLADUTIU GD.; RATTAZZI MC. (1979) Excretion-reuptake route of beta-hexosaminidase in normal and I-cell disease cultured fibroblasts. *Journal of Clinical Investigations* 63: 595-601.
- 64) VORMOOR J.; MARQUARDT T. (2004) Hematopoietic cell transplantation in inborn errors of metabolism. *Curr Opin Organ Transplant* 9:43–8.
- 65) WEI X.; JIN F.; YINGHUI Y.; XU C.; QU N.; JU X.; YI X. (2011) A novel mutation of IDS gene in Chinese patient with Mucopolysaccharidosis II by next-generation sequencing. *Clinica Chimica Acta*: 1-3.
- 66) WINCHESTER BG. (1996) Lysosomal Metabolism of Glycoconjugates. (ed.: Subcellular Biochemistry). *Biology of the Lysosome*, 1th ed., 1996, pp.191-238.
- 67) WRHAITH JE. (2002) Lysosomal disorders. *Semin Neonatol* 7: 75-83.
- 68) YAN S.; WU G. (2009) Descriptively quantitative relationship between mutated N-Acetylgalactosamine-6-sulfatase and Mucopolysaccharidosis IVA. *Peptide Science* 92 (5): 399-404.
- 69) ZUSTIN J. (2010) Morquio disease: The role of cartilage canals in the pathogenesis of chondrogenic dwarfism. *Medical Hypotheses* 75: 642-644.

7. ARTIGOS

ARTIGO 1

A practical strategy for identification of common mutations in Mucopolysaccharidosis type IVA Brazilian patients

Francyne Kubaski^{a,b}, Ana Carolina Brusius-Facchin^{a,b}, Roberto Giugliani^{b,c}, Sandra Leistner-Segal^{a,b}

^a Post Graduation in Medicine: Medical Sciences: Federal University of Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

^b Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil.

^c Department of Genetics, Federal University of Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

Corresponding Author

Leistner-Segal S, Medical Genetics Service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua: Ramiro Barcelos 2350, Bairro: Rio Branco, Zip Code: 90035-000, Porto Alegre/RS Rio Grande do Sul, Brazil. Tel.: +5533598011; fax: +5533598011 email: ssegal@hcpa.ufrgs.br

Conflict of interest

The authors confirm no conflict of interest and approve the submission of this manuscript for publication.

Abstract

Background: Mucopolysaccharidosis IVA or Morquio A syndrome, is an autosomal recessive disorder caused by deficiency of lysosomal enzyme N-acetylgalactosamine-6-sulfatase (GALNS), which results in lysosomal storage of glycosaminoglycans: Keratan sulfate and Chondroitin-6-sulfate in tissues causing clinical manifestations. The phenotypes vary from the classical form with severe bone dysplasia, corneal opacity, short trunk dwarfism, heart involvement with a life span of

20 to 30 years to attenuated form with normal life span, mild bone involvement. Both forms of Morquio A patients have normal intelligence. The prevalence of MPS IVA ranges from 1/76.000 to 1/640.000 live births. **Objective:** To analyze and characterize the genotype of Brazilian patients with MPS IVA, through molecular study of recurrent mutations in *GALNS* gene, enabling the estimative of frequency the establishment of a protocol of routine screening for these mutations. **Methods:** Molecular analysis of *GALNS* gene was performed in 26 Brazilian patients by ARMS-PCR to detect six recurrent mutations (p.G116S/ p.G139S/ p.L307P/ p.N164T/ p.R386C and p.S341R) followed by amplification of coding regions by PCR of all exons and sequencing. **Results:** These mutations were found in 61.5% of our sample, which were present in 55.8% of the alleles. The most frequent mutation were p.S341R (26.9%), followed by p.R386C (21.1%) and p.G116S (7.7%). The mutations p.N164T, p.G139S, p.L307P were not found in our sample. **Discussion:** Mutation p.S341R was found only in patients from the Northeast. The identification of heterozygous individuals within these families will be important for genetic counseling and for estimating the disease prevalence in this region. Further studies to identify the origin of this mutation, including haplotype and segregation analyses are in progress, and will be evaluated in conjunction with epidemiological data.

Keywords: Mucopolysaccharidosis; Morquio A Syndrome; mutation.

INTRODUCTION

Mucopolysaccharidosis IVA (MPS IVA or Morquio Syndrome) (OMIM # 253000), was first described in 1929 by Morquio and Brailsford, in 1929 [Morquio, 1929; Brailsford, 1929]. MPS IVA is an autosomal recessive disorder caused by deficiency of lysosomal enzyme N-acetylgalactosamine-6-sulfatase (*GALNS*), required for the catabolism of glycosaminoglicans (GAGs) Keratan sulfate (KS) and Chondroitin-6-Sulfate (C6S) [Khedhiri et al., 2011; Tomatsu et al, 2006].

The deficiency of the enzyme leads to accumulation of undegraded GAGs into lysosomes and, therefore cell dysfunction and symptomatology. The classical phenotype includes skeletal dysplasia with short stature, dental abnormalities and

corneal clouding. Different from most of the other Mucopolysaccharidosis intelligence is reported to be normal [Davison et al, 2012; Montaña et al., 2007].

The incidence varies among different populations from 1:76.000 to 1:640.000 live births [Dhawale et al., 2012; Hendriksz et al., 2012]. Precise epidemiological data are scarce in Brazil.

MPS IVA is caused by mutation in the *GALNS* gene, mapped to 16q24.3 and spans 50kb in length, containing 14 exons and 13 introns. A 2.3kb mRNA translates into a protein of 522 residues [Pajares et al., 2012; Morris et al., 1994; Nakashima et al., 1994].

To date, around 184 different mutations associated with MPS IVA have been identified including point mutations, splice-site mutations, deletions and insertions [<http://www.hgmd.org/>, accessed in November 2012]. Missense mutations are the most common.

In the present study, we standardized a protocol for identification of six recurrent mutations previously identified in Brazilian patients, being p.G116S (Brazilian, American), p. G139S (Irish, Argentine, American and Brazilian), p.L307P (Brazilian), p.N164T (Brazilian), p.R386C (American-Caucasian, Argentine, Brazilian, British, Chilean, Colombian, German, Italian, Japanese, Mexican, Polish and Turkish), p.S341R (Brazilian) (Table 1) (Tomatsu et al., 2005). We used samples of seven patients previously genotyped by Tomatsu et al., 2004 as positive controls for the ARMS-PCR technique.

Table 1: Six recurrent mutations analyzed

Exon	Mutation	cDNA position	Sequence Change	Conserved codon among human and mouse <i>GALNS</i> (Montaña et al., 2000)
IV	p.G116S	116	GGC to AGC	Yes
IV	p.G139S	139	GGC to AGC	Yes
V	p.N164T	164	AAC to ACC	Yes
IX	p.L307P	307	CTG to CCG	Yes
X	p.S341R	341	AGC to AGA	Yes
XI	p.R386C	386	CGT to TGT	Yes

* cDNA position according GenBank under accession NM_0005123

** quantifying the degree of similarity between two amino acids is based on properties such as polarity, molecular volume and chemical composition, with large numbers signifying greater dissimilarity; numbers range from 5 to 202.

MATERIALS AND METHODS

Patients

A group of 26 unrelated patients recruited from all regions of Brazil by the MPS Brazilian Network at the Medical Genetics Service (SGM) of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil). Therefore, this group may be considered as representative of the Brazilian population. The protocol was approved by the Ethics Committee of the institution, and the families signed informed consent before blood collection.

The patients were diagnosed by determination of GALNS activity and in some cases also by the presence of increased amounts of KS in urine.

Analysis of genomic DNA

Genomic DNA was extracted from 5 ml peripheral blood collected in EDTA using salting out procedures. Primers for amplification were self-designed using the online software program Invitrogen™ (<http://www.invitrogen.com/content/site/config/regional/OligonucleotideDesign/Oligonucleotide-Design-br/oligos-for-my-application.html>) (Table 2).

Table 2: Primers for ARMS-PCR amplification of five recurrent mutations

Exon	Primers F=forward, R=reverse	Annealing temperature (°C)	Fragment size (bp)
IV (p.G116S)	F-N:GCAGGAGATTGTGGGCG F-M:GCAGGAGATTGTGGGCA R:AAGGCCAGGAAGTGGATGGA	65.5°C	149
IV (p.G139S)	F-N:TACGTCAGCAAGAATGTCTG F-M:TACGTCAGCAAGAATGTCA R:AAGGCCAGGAAGTGGATGGA	62°C	82
V (p.N164T)	F-N:GGTTTGGATCCCCAAC F-M:GGTTTGGATCCCCAC R:CGTGGGAGGGGAAGGGG	59°C	147
IX (p.L307P)	F-N:TGGCAGCAACGGCCCCTTTCT F-M:TGGCAGCAACGGCCCCTTTCC R:TGGCAGCAACGGCCCCTTTCC	68°C	170
X (p.S341R)	F-N:GAGCCACCAGCTGGGCAGC F-M:GAGCCACCAGCTGGGCAGG R:CCGGGGCAGGTCTAGCA	66°C	157
XI (p.R386C)	F-N:ACAGGCCTATCTTCTATTACC F-M:ACAGGCCTATCTTCTATTACT R:GGCCACGTCTGGATAGAGAT	61°C	167

ARMS PCR was carried out in a 25µl reaction volume containing 100ng of patient genomic DNA, 2.5 nmol dNTPs, 0.5 µM of each primer, 2.0µl MgCl₂ and 2.5 µl DMSO or 1.0 for p.G116S or without DMSO for p.G139S , 2.5µlx10 of Taq DNA polymerase buffer and 0,3 µl of Taq DNA polymerase (Superterm® or Invitrogen®). The reactions were performed in a thermocycler with a thermal profile consisting of initial desnaturation at 95°C for 1min, then 25 cycles for 95°C for 30s, annealing according the mutation (Table 2) for 30s, and final extension 72°C for 1min.

Results

Biochemical assay

Quantification of total urinary GAGs was measured together with electrophoresis and enzyme activity measurement (Table 3).

Mutation analysis

Mutational analyzes were performed in genomic DNA in all cases. The mutations were determined in 16 patients out of 26 recruited. The results and family history for the sixteen patients are summarized in table 3.

Table 3: Genotype of patients

Patient	Parents consanguinity	Age of diagnosis (yr)	Gender	Age (yr)	GAGs measure (µg/mg creat)	Electrophoresis of GAGs	GALNS assay (nmols/h/mg/creat)	Reference value (RV) ^{***}	Genotype
1	Unknown	8	Female	20	41 (RV<9yr: 5.2-12)	**	*	0.44-1.89	p.R386C/?
2	Unknown	2	Male	15	**	**	0.011	0.44-1.89	p.G116S/G116S
3	No	9	Male	11	187 (RV<14yr: 26-97)	Keratan sulfate	2.8	68-352	p.G116S/G116S
4	Yes	8	Male	17	19 (RV<9yr: 5.2-12)	**	0.01	0.44-1.89	p.S341R/S341R
5	Unknown	5	Female	10	214 (RV<14yr: 26-97)	Keratan sulfate	0.04	0.44-1.89	p.R386C/R386C
6	Unknown	10	Female	15	126 (RV<14yr: 26-97)	Keratan sulfate	0.004	0.44-1.89	p.S341R/?
7	Unknown	19	Male	25	280 (RV<9yr: 44-106)	normal	0.003	0.44-1.89	p.S341R/S341R
8	No	5	Male	5	170 (RV<5yr: 67-124)	normal	0.04	0.44-1.89	p.R386C/R386C
9	Unknown	6	Male	10	155 (RV<7yr: 53-115)	Keratan sulfate	0.002	0.44-1.89	p.R386C/R386C
10	Unknown	31	Female	31	149 (RV<18yr: 13-45)	**	2.2	68-352	p.S341R/S341R
11	Yes	1	Male	16	**	normal	0.097	0.11-0.32	p.S341R/R386C
12	No	31	Female	31	**	**	27	68-352	p.S341R/S341R
13	Unknown	22	Female	26	173 (RV>18yr: 13-45)	**	9.3	0.44-1.89	p.R386C/R386C
14	Unknown	5	Female	6	178 (RV<5yr: 67-124)	Keratan sulfate	1.7	68-352	p.S341R/S341R
15	No	2	Female	7	**	**	0.006	**	p.S341R/S341R
16	Unknown	**	Male	15	**	**	**	0.44-1.89	p.R386C/?

* Undetectable

** Not available

*** Reference values for *GALNS* assay vary according to the methodology used.

Discussion

Morquio A Syndrome is a rare disorder due to deficiency of *GALNS*, which results in a progressive accumulation of KS, leading to progressive and chronic course [Khedhiri et al., 2011]. Several studies have focused in the molecular characterization of this disease among different populations. However, to date, little is known about the mutational background in the Brazilian population.

For this reason, the purpose of this study was to detect the disease causing mutations in our patients with the aim of understanding the epidemiology of our population and offering genetic counseling for these families.

The molecular basis of *GALNS* deficiency leading to the clinical symptoms is of particular interest because of its allelic heterogeneity, clinical variability, and the presence of common mutations characteristic of several ethnic population.

In our study the mutations described here were found in 61.5% of our sample, which were present in 55.8% of the alleles.

The most frequent mutations were p.S341R (26.9%) - 6 homozygous and 2 heterozygous, followed by p.R386C (21.1%) - 4 homozygous and 3 heterozygous, and p.G116S (7.7%) - 2 homozygous. The mutations p.N164T, p.G139S, p.L307P were not found in our sample.

It is important to highlight that the mutation p.S341R was found only in patients from the Northeast. The presence of a specific mutation in a cluster was already observed in MPS VI in the northeast of Brazil (Costa-Mota, 2011). The identification of heterozygous individuals within these families will be important for genetic counseling and for estimating the disease prevalence in this region. Further studies to identify the origin of this mutation, including haplotype and segregation analyses are in progress, and will be evaluated in conjunction with epidemiological data.

REFERENCES

Brailsford JF. 1929. Chondro-osteo-dystrophy. Roentgenopgraphic & clinical features of a child with dislocation of vertebrae. *Am J Sur* 7: 404-410.

Davison JE, Kearney S, Horton J, Foster K, Peet AC, Hendriksz CJ. 2012. Intellectual and neurological functioning in Morquio Syndrome (MPS IVa). *J Inherit Metab Dis* 1-6.

Dhawale AA, Thacker MM, Belthur MV, Rogers K, Bober MB, Mackenzie WG. 2012. The Lower Extremity in Morquio Syndrome. *J Pediatr Orthop* 32 (5):534-540.

Hendriksz CJ, Al-Jawad M, Berger KL, Hawley SM, Lawrence R, Ardle CM, Summers CG, Wright E, Braunlin E. 2012. Clinical overview and treatment options for

non-skeletal manifestations of Mucopolysaccharidosis type IVA. *J Inherit Metab Dis* 1-14.

Khedhiri S, Chkioua L, Bouzidi H, Dandana A, Ferchichi S, Turkia HB, Miled A, Laradi S. 2011. Mucopolysaccharidosis IVA within Tunisian patients: Confirmation of the two novel GALNS gene mutations. *Pathologie Biologie* 1-3.

Montaño AM, Sukegawa K, Kato Z, Carrozzo R, Natale PD, Christensen E, Orii KO, Kondo N, Tomatsu S. 2007. Effect of PF 'attenuated' mutations in mucopolysaccharidosis IVA on molecular phenotypes of N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase. *J Inherit Metab Dis* 30: 758-767.

Morquio L. 1929. Sur une forme de dystrophie osseuse familiale. *Archives de médecine des enfants, Paris*, 32: 129-135.

Morris CP, Guo XH, Apotolou S, Hopwood JJ, Scott HS. 1994. Morquio A Syndrome: cloning, sequence, and structure of the human N-acetylgalactosamine 6-sulfatase (GALNS) gene. *Genomics* 22: 652-654.

Nakashima Y, Tomatsu T, Hori S, Fukuda K, Sukegawa N, Kondo N, Suzuki Y, Shimozawa N, Orii T. 1994. Mucopolysaccharidosis IV A: molecular cloning of the human N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase gene (GALNS) and analysis of the 5'flanking region. *Genomics* 20: 99-104.

Pajares S, Alcalde C, Couce ML, Toro MD, Gonzàles-Meneses A, Guillén E, Pineda M, Pintos G, Gort L, Coll MJ. 2012. Molecular analysis of mucopolysaccharidosis IVA (Morquio A) in Spain. *Molecular Genetics and Metabolism* 106: 196-201.

Tomatsu S, Montaño AM, Nishioka T, Gutierrez MA, Peña OM, Trandafirescu GG, Lopez P, Yamaguchi S, Noguchi A, Orii T. 2005. Mutation and polymorphism spectrum of the GALNS gene in Mucopolysaccharidosis IVA (Morquio A). *Human Mutation* 26 (6): 500-512.

Tomatsu S, Montaña AM, Lopez P, Trandafirescu G, Gutierrez MA, Oikawa H, Nishioka T, Vieira MB, Orii T, Noguchi A. 2006. Determinant factors of spectrum of missense variants in Mucopolysaccharidosis IVA gene. *Mol Genet Metabol* 89: 139-149.

Costa-Motta FM, Acosta AX, Abé-Sandes K, Bender F, Schwartz IVD, Giugliani R, Leistner-Segal S. 2011. Genetic studies in a cluster of Mucopolysaccharidosis type VI patients in Northeast Brazil. *Molecular Genetics and Metabolism* 104:603-607.

ARTIGO 2

SHORT COMMUNICATION (Accepted for publication at Gene, doi: 10.1016/j.gene.2012.12.100)

Identification of a novel missense mutation in Brazilian patient with a severe form of Mucopolysaccharidosis type IVA

Francyne Kubaski^{a,b}, Ana Carolina Brusius-Facchin^{a,b}, Heloísa M.C. Palhares^c, Marly Aparecida Spadotto Balarin^d, Marli Viapiana-Camelier^b, Regis Guidobono^b, Maira Graeff Burin^b, Roberto Giugliani^{a,b,e}, Sandra Leistner-Segal^{a,b}.

^a Post Graduation Program in Medicine: Medical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

^b Medical Genetics Service, Hospital de Clinicas de Porto Alegre, RS, Brazil.

^c Endocrinology and Genetics Services, Federal University of Triângulo Mineiro (UFTM), MG, Brazil.

^d Biological and Natural Sciences Institute (ICBN), Federal University of Triângulo Mineiro (UFTM), MG, Brazil.

^e Department of Genetics, UFRGS, RS, Brazil

Corresponding Author

Leistner-Segal S, Medical Genetics Service, Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Ramiro Barcelos 2350, Bairro Rio Branco, 90035-903, RS, Brazil. Tel.: +555133598011; fax: +555133598010 email: ssegal@hcpa.ufrgs.br

Conflicts of interest: The authors disclose no conflicts of interest and approve the submission of this manuscript for publication.

Abstract

Mucopolysaccharidosis type IVA (MPS IVA) or Morquio Syndrome type A is an autosomal recessive disease caused by deficiency of the lysosomal enzyme N-

acetylgalactosamine-6- sulfatase (*GALNS*). We report molecular characterization of a patient who presents the new missense mutation p.C165Y in homozygosis. Bioinformatics analysis predicted this mutation as being probably pathogenic. To evaluate the possibility that this alteration was a polymorphism we tested 100 alleles and all the results were negative. These findings together with the observation that this alteration is not present in controls, suggests that it is a disease-causing mutation, which was correlated with the severe phenotype observed in our patient. We conclude that molecular analysis of the *GALNS* gene, in addition to enzyme assays, is important for diagnosis and contributes to the better understanding of the relationship between genotype and phenotype, which is important as enzyme replacement therapy (ERT) will soon become available and treatment decisions will have to be take in such cases.

Key words: Morquio A, N-acetylgalactosamine-6- sulfatase, molecular analysis.

1. Introduction

Mucopolysaccharidosis type IVA (MPS IVA; OMIM253000) or Morquio Syndrome type A is an autosomal recessive disease caused by deficiency of the lysosomal enzyme N-acetylgalactosamine-6-sulfatase (*GALNS*) which is responsible for the catabolism of glycosaminoglicans (GAGs) keratan sulfate (KS) and chondroitin-6-sulfate (C6S) (Hendriksz et al., 2012; Khedhiri et al., 2011).

Phenotypes vary from the classical form (life span of 20 to 30 years old) with severe bone dysplasia, heart involvement, corneal opacity and short trunk dwarfism to attenuated forms with normal life span, mild bone and visceral involvement. Different from most MPS types, MPS IVA is characterized by normal intelligence (Khedhiri et al., 2011; Tomatsu et al., 2011a).

Precise epidemiological data are scarce, with reported incidence ranging from 1 per 76.000 live births to 1 per 640.000, according to reports from different geographical areas (Tomatsu et al., 2011a).

The *GALNS* gene has 50kb in length, containing 14 exons and 13 introns, and is mapped to chromosome 16q24.3 being transcribed into a 1566bp cDNA, which

encodes a 522-residue glycopeptides (Hendriksz et al., 2012; Tomatsu et al., 1991b; Montaña et al., 2000a).

To date, 184 different mutations associated with MPS IVA have been identified [Human Gene Mutation Database (HGMD, 2012); <http://www.hgmd.org/>] including point mutations, splice-site mutations, deletions and insertions. This heterogeneity leads to a wide clinical variability (Khedhiri et al., 2011; Montaña et al., 2007b; Tomatsu et al., 2006c). Despite all efforts made to characterize mutations in order to establish genotype-phenotype correlation in MPS IVA, the results are so far disappointing (Montaña et al., 2007b).

We now report a previously not described genotype of an MPS IVA patient and correlate it with the severe clinical picture presented (height below 120 cm Montaña et al., 2007), aiming to contribute to the better understanding to the correlation between genotype and phenotype in this disease. This study was approved by the Hospital de Clinicas de Porto Alegre Research Ethics Committee (#11-0214), which is recognized by the Office for Human Research Protections as an Institutional Review Board (IRB0000921). After obtaining informed consent, blood sample was collected for laboratory analysis.

2. Clinical Picture

Patient is a female girl, born at full term via normal delivery. Birth weight was 2,630 kg, birth length 50cm and head circumference 36 cm. Perinatal history was unremarkable. Her parents had first-degree consanguinity (in fact, parents are sibs, and patient was referred for adoption shortly after birth). The first symptoms were noticed in the early months of life, including: scoliosis, acetabular dysplasia and bone reabsorption in the ankle x-ray. At the age of 8 years old she had adenoidectomy at 10 years old knee surgery due to bilateral tibial epiphysiolysis).

At clinical examination at the age of 9 years old she had weight of 18.7 kg and height of 107 cm. Her head circumference was 50 cm, with corneal opacity, pectus carinatum, cubital valgus, increased mobility of the elbow, short trunk dwarfism, flaring of the lower limbs, genu valgum and clinodactyly. She had no signs of papular lesions in the skin, joint contractures, thoracolumbar gibbus, hepatomegaly, splenomegaly and seizures. Echocardiography and audiometry results were normal.

At 18 years old she attends the third year of regular school, and intends to have a degree in Psychology. She frequently complains of pain in the limbs. She is 112cm height (in 75th centiles for Morquio A girls according to Montaña et al., 2008c, and her weight is 23.5kg (BMI- Body mass index, 18.7 ideal). She has been monitored by an ophthalmologist and orthopedist and does not have respiratory problems.

3. Material and Methods

3.1 Biochemical assay

Glycosaminoglicans (GAGs) measure

The GAGs were measured by the dimethylmethylenblue method, according De Jong et al.,1992.

GALNS enzyme assay

Leukocytes were separated from 10 ml of heparinized peripheral blood according to the method described by Skoog and Beck., 1956, and stored at -20°C until analysis. The leukocytes were diluted in distilled water and were lysed via ultrasonication for biochemical assay. For the measurement of proteins in leukocytes, we used the method described by Lowry et al., 1951. The *GALNS* enzyme assay was performed as described by Van Diggelen et al., 1990, using the substrate 4-methylumbelliferyl- β -D-galactoside-6-sulphate. Et₃N (Moscerdam, Netherlands).

3.2 Mutation detection

Peripheral blood was obtained from patient and genomic DNA was isolated using standard salting out procedure. The DNA was used as a template for PCR synthesis of *GALNS* gene, first we analyzed the presence of recurrent mutations previously described in Brazilian patients (Tomatsu et al., 2005d; Dieter et al., 2007), followed by Single-strand conformation polymorphism (SSCP) and sequencing to confirm the results.

The PCR reactions were performed according Dieter et al., 2007. For SSCP analysis we used 12ml MDE (mutation detection electrophoresis) gel solution (Lonza, Rockland, USA). PCR products (10 μ l) were denatured at 95 °C for five minutes with 5 μ l the SSCP buffer solution: 95% formamide, bromophenol 0,05% and xylene cyanol 0,05% and chilled on ice per 5 min, this denatured products were migrated at room temperature at 160 V for 24h. The gel was silver-stained and dried with vacuum pump. Single-stranded bands of samples were compared to controls.

For the sequencing reaction products were purified from excess primers and dNTPs with Exonuclease I (USB, Cleveland, USA) and Shrimp Alkaline Phosphatase (USB, Cleveland, USA) and then utilized as templates for direct sequencing with the same PCR primers, in both forward and reverse directions. Sequencing was performed at the Unit of Molecular and Protein Analysis (Experimental Research Center, HCPA) using ABI 3500 Genetic Analyzer with 50 cm capillaries and POP7 polymer (Applied Biosystems). PCR products were labeled with 3.2 pmol of exon specific primers (Dieter et al., 2007) and 1 μ l of BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) in a final volume of 10 μ l.

Labeling reactions were performed in a Veriti® 96-well Thermal cycler (Applied Biosystems) with a denaturing step of 96 °C for 1 min followed by 35 cycles of 96 °C for 15 sec, 50 °C for 15 sec and 60 °C for 4 min. Labeled samples were purified using BigDye XTerminator Purification Kit (Applied Biosystems) and electroinjected in the automatic sequencer.

3.3 Bioinformatics analysis

The bioinformatic analysis were conducted with 3 different softwares: Polyphen-2 (Polymorphism Phenotyping v.2) an online tool that can predict possible impact of an amino acid substitution on the structure and function of a human protein using straightforward physical and comparative considerations (Adzhubei et al., 2010); Mutpred (a tool that classifies an amino acid substitution (AAS) as disease-associated or neutral in human) (Li et al., 2009) and SNPs3D (Peng et al., 2005).

4. Results

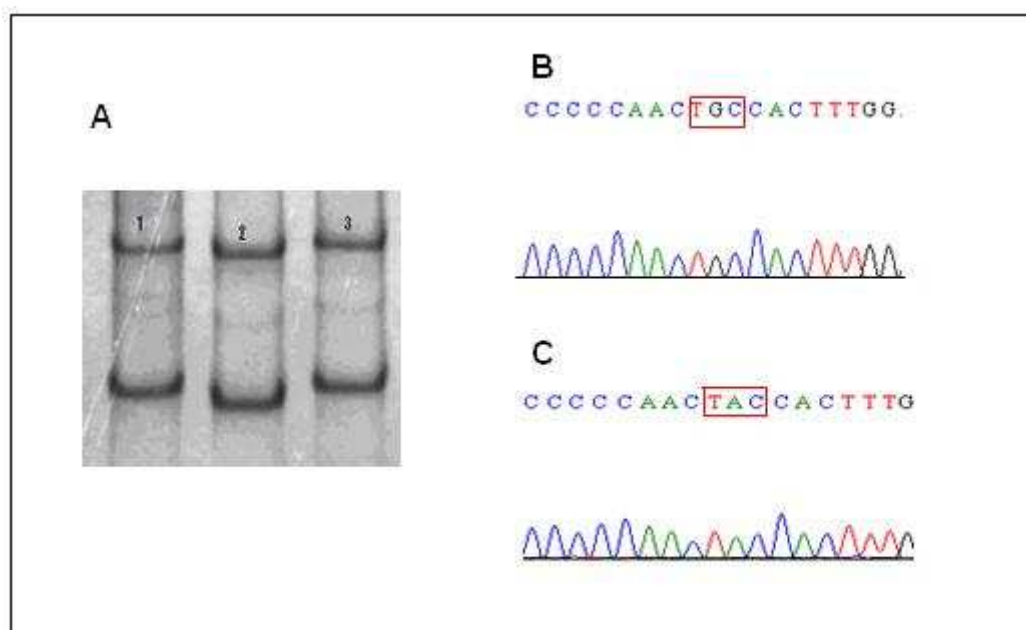
4.1 Biochemical analysis

GAGs measurement was 17mg/mmol creat (reference range: 3.4-11 <19 years old). The patient's *GALNS* assay activity was 0.009 nmol/h/mg protein (reference range: 0.44-1.89). The results of other enzymes (β -glucuronidase, Hexosaminidase A, Chitotriosidase, Arylsulfatase B, α -L-iduronidase, β -galactosidase, Iduronate-2-sulfatase) were normal, excluding Multiple Sulfatase Deficiency.

4.2 Mutation detection

A search for the most common recurrent mutations (Dieter et al., 2007) was negative. SSCP analysis of the *GALNS* exons resulted in an altered band pattern at exon V when compared to normal controls. Thus, the results were confirmed with bidirectional sequencing of exon V that showed the differences between normal and mutated profiles, for this alteration, identifying a new missense mutation p.C165Y in both alleles (figure 1).

Figure 1. A: SSCP (1-3:control; 2: patient), B: sequencing of control; C: sequencing of patient



To check the possibility that this new mutation was a polymorphism we tested 100 allele controls (anonymous blood donors from blood bank of HCPA) by sequencing and all showed the normal allele.

Bioinformatic analyzes, performed by Polyphen v.2, predicted that this mutation is probably damaging with a score of 1.00. The multiple alignment in different species showed that this is a conserved region (figure 2). Analysis on Mutpred gave a probability of deleterious mutation of 0.604 (actionable hypotheses) and a SMV score of -1.00 in SNPs3D indicating a deleterious case.

We also analyzed physicochemical distances between aminoacids changed (Strachan T & Read AP, 2003) and conserved codon among human and mouse GALNS (Tomatsu et al., 2006c) (Table 1)

Figure 2 A. Score of damaging mutation (Polyphen v.2) B. Multiple alignment of 17 different species

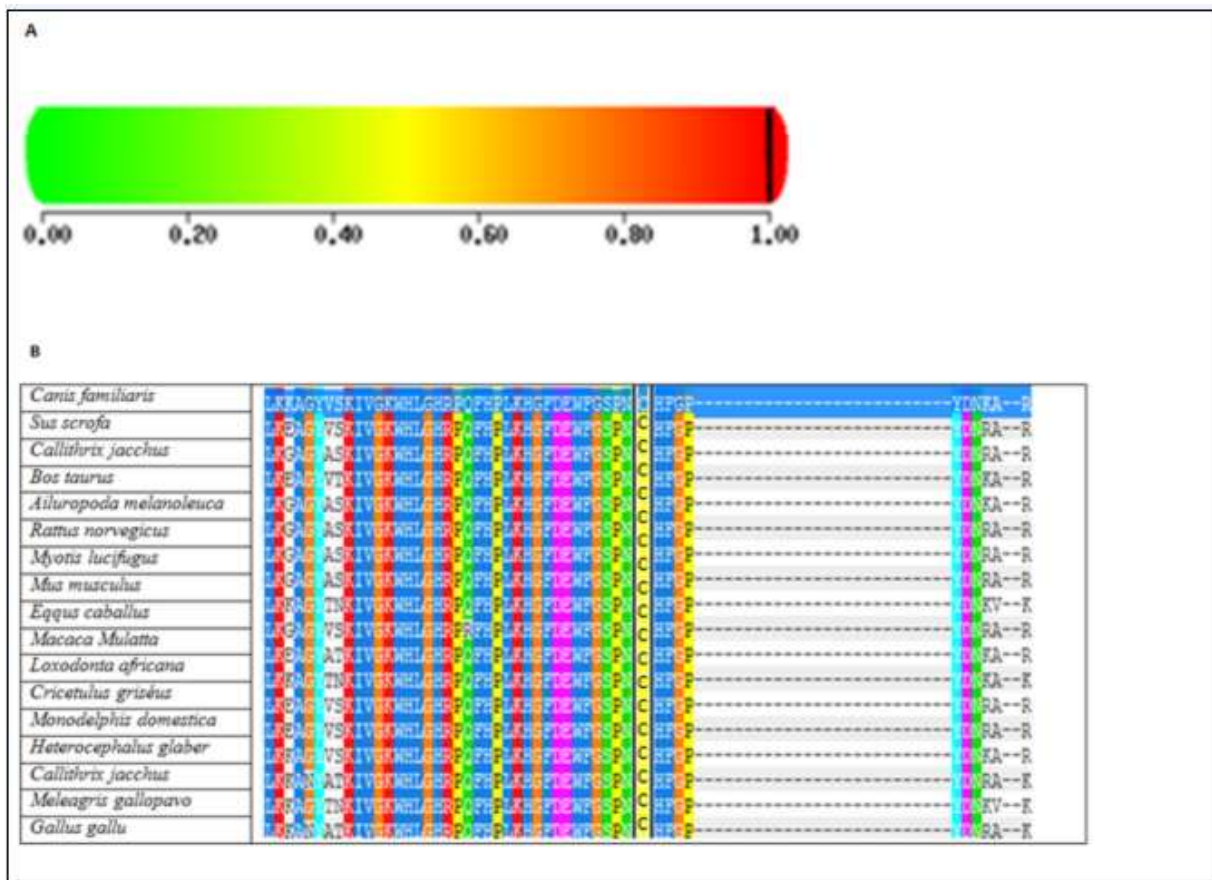


Table 1: Characterization of the new missense mutation in Morquio A Syndrome

Exon	cDNA position*	Sequence change	Physicochemical distances between amino acids changed (Strachan and Read, 2003)**	Conserved codon among human and mouse GALNS (Montaño et al., 2000)	Comments
V	165	TGC to TAC	194	Yes	No mutations described in this codon yet

* cDNA position according GenBank under accession NM_000512.3

**quantifying the degree of similarity between two amino acids is based on properties such as polarity, molecular volume and chemical composition, with large numbers signifying greater dissimilarity; numbers range from 5 to 202.

5. Discussion

In this paper we report for the first time the occurrence of the p.C165Y mutation in homozygosis in a patient with MPS IVA displaying and severe phenotype. Analysis of conservation of this amino acid in other sulfatases (*GALNS* to *IDS*, *G6S*, *ARSA*, *ARSB*, *ARSC* and *ARSU*) showed that this Cysteine is not conserved among sulfatases, a possible explanation can be the location of the amino acid change, outside highly homologous regions, and being situated in less identical region which is important for topogenic signals such as glycosylation, internal proteolysis, substrate binding and others (Tomatsu et al., 1991b).

It is also important to note that this mutation is located within two other previously reported mutations: p.N164T [undefined phenotype (Tomatsu et al., 2005d)] and p.H166Q [severe phenotype (Tomatsu et al., 2006c; Tomatsu et al., 2005e; Sukegawa et al., 2009)]. Thus, further analysis should be performed including a higher number of patients in order to better understand the genotype-phenotype correlation.

In conclusion, the mutation found, together with the observation that the alteration was not present in controls, suggests that it is a disease-causing mutation and can be correlated with the severe phenotype seen in our patient. Molecular analysis of *GALNS* gene could be important to predict the phenotype and to allow treatment decisions, which could be important as enzyme replacement therapy (ERT) is becoming available for this condition.

Acknowledgements

This work was supported by institutional funds (FIPE-HCPA) and by the Brazilian MPS Network (Rede MPS Brasil). FK receives a master degree scholarship from CAPES. ACBF receives a PhD scholarship from CNPq. SLS, RG receive researcher scholarships from the Brazilian Government Funding Agency (CNPq).

References

Hendriksz CJ, Al-Jaward M, Berger KI et al., 2012. Clinical overview and treatment options for non-skeletal manifestations of Mucopolysaccharidosis type IVA. *J Inherit Metab Dis.*1-14.

Khedhiri S, Chkioua L, Bouzidi H et al., 2011. Mucopolysaccharidosis IVA within Tunisian patients: Confirmation of the two novel GALNS gene mutations. *Pathol Biol.* 1-3.

Tomatsu S, Montaña AM, Oikawa H et al., 2011a. Mucopolysaccharidosis Type IVA (Morquio A Disease): Clinical Review and Current Treatment: A Special Review. *Curr Pharm Biotechnol.*12(6), 931-945.

Tomatsu S, Fukuda S, Masue M et al. 1991b. Morquio disease: isolation, characterization and expression of full-length cDNA for human N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase. *Biochem Biophys Res Commun.*181(2), 677-683.

Montaña AM, Yamagishi A, Tomatsu S et al., 2000a. The mouse N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase (*Galns*) gene: cDNA isolation, genomic characterization, chromosomal assignment and analysis of the 5'-flanking region. *Biochim Biophys Acta.* 1500, 323-334.

Montaña AM, Sukegawa K, Kato Z et al., 2007b. Effect of 'attenuated' mutations in Mucopolysaccharidosis IVA on molecular phenotypes of N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase. *J Inherit Metabol Dis.* 30, 758-767.

Tomatsu S, Montaña AM, Lopez P et al., 2006c. Determinant factors of spectrum of missense variants in Mucopolysaccharidosis IVA gene. *Mol Genet Metab.* 89, 139-149.

Strachan T, Read AP (2003) *Human Molecular Genetics*. 3rd edition. Garland Science, London / New York , 674.

Montaña A, Tomatsu S, Brusius Ana et al., 2008c. Growth Charts for Patients affected with Morquio A Disease. *Am J Med Genet.* 146, 1286-1295.

De Jong JGN, Wevers R.A. Liebrand-van Sambeek R., 1992. Measuring urinare glycosaminoglecans in the presence of protein: an improved screening procedure for Mucopolysaccharidosis based on dimethelmethelene blue. *Clin Chem.* 38(6), 803-807.

Skoog WA, Beck WS., 1956. Studies on the fibrinogen, dextran and phytohemagglutinin methods of isolating leukocytes. *Blood.* 11, 436.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL. et al., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193-265.

Van Digglen OP, Zhao H, Kleijer WJ et al., 1990. A fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of Morquio disease type A. *Clin Chim Acta.* 187,131-40.

Tomatsu S, Montaña A, Nishioka T et al., 2005d. Mutation and polymorphism spectrum of the GALNS gene in Mucopolysaccharidosis IVA (Morquio A). *Hum Mutat.* 26(6), 500-512.

Dieter T, Matte US, Schawartz IV et al., 2007. Common N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase (GALNS) exon mutations in Brazilian patients with Mucopolysaccharidosis IVA (MPS IVA). *Genet Mol Biol.* 30(3), 524-528.

Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L et al., 2010. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat methods*. 7(4), 1-2.

Li B, Krishnan VG, Mort ME, Xin F, Kamati KK, et al., 2009. Automated inference of molecular mechanisms of disease from amino acid substitutions. *Bioinformatics*. 25 (21), 2744-2750.

Peng Y, Zhaolong L, Moult J., 2005. Loss of protein structure stability as a major causative factor in monogenic disease. *J Mol Biol*. 353, 459-473.

Tomatsu S, Montaña A, Nishioka T et al., 2005e. Mutation and Polymorphism spectrum of the GALNS gene in Mucopolysaccharidosis IVA (Morquio A). *Hum Mutat*. 26 (6), 500-512.

Sukegawa K, Nakamura H, Kato Z et al., 2009. Biochemical and structural analysis of missense mutations in N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase causing mucopolysaccharidosis IVA phenotypes. *Hum Mol Genet*. 9, 1283-1290.

ARTIGO 3

(Anexo III)

Important aspects in the molecular diagnosis of Mucopolysaccharidoses

Brusius-Facchin AC^{1,2}; Kubaski F^{1,2}; Roberto Giugliani¹, Leistner-Segal S^{1,2}.

1- Medical Genetics Service, Hospital de Clinicas de Porto Alegre (HCPA), RS, Brazil

2- Post Graduation Program in Medical Sciences, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

3- Department of Genetics, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

Recently, Pollard et al. (2012) reported the molecular characterization of 355 patients with mucopolysaccharidoses, in whom 104 novel mutations were found. We read this article with great interest and would like to share some insights and concerns regarding these results, which we think relevant as the authors propose that genetic diagnosis should be performed before or even without biochemical diagnosis. Enzyme diagnosis is presently considered the "gold standard" approach (Neufeld & Muenzer et al., 2001), usually followed by genetic diagnosis mainly to help the understanding of the genotype-phenotype correlation, to detect carriers, to improve prenatal diagnosis and to confirm biochemical diagnosis in the few doubtful cases.

We agree with these authors that information about ethnic background and clinical phenotype is of great importance once the ratio of heterogeneity could differ greatly amongst populations and mutation detection protocols based on local recurrent mutations could be helpful, depending on the population studied. In Brazil, several MPS clusters were identified, and mutation analysis of index cases was very useful to guide molecular testing customized for these areas. For instance, several mutations which are recurrent in our area, especially for MPS II, IVA and VI, were not detected among the patients reported here, which could reflect distinct genetic background.

Regarding the fact that no mutations were identified in a patient with MPS II even after sequencing the whole gene and performance of MLPA analysis and search of the common IDS/IDSP1 abnormality, the authors should consider the analysis of the promoter region. In our sample 2/105 patients analyzed and

confirmed by enzyme deficiency had a deletion (178bpdel) in this region as the disease-cause mutation. Also, other types of rearrangements, apart from the common inversion described, could be undetectable by the methods employed. Also, among patients with whole *IDS* gene deletions it is relevant to analyze the extension of the deletions in order to delineate the breakpoints as contiguous genes could also be deleted inferring genetic determinants of phenotype in different patients.

Other important aspect refers to the lower heterogeneity found in *GALNS* gene nevertheless considering a sample size of 6 patients (including 2 siblings) this could be easily predicted.

Taking into account the probability of uniparental disomy (UPD) and the presence of gene deletions in the *GALNS* gene, we suggest that in homozygous cases a genetic analysis should be performed in the parents as well to rule out this possibility, very important for genetic counseling purposes.

Regarding MPS VI and MPS IVA genotyping, it is important to acknowledge the high frequency of intragenic polymorphisms which could modify genotypes even within families, being also useful for haplotype analysis in the case of recurrent mutations within a specific group. This was partly stated by the authors in the discussion section, but the results for the patients genotyped were not shown.

We believe that molecular analysis is of great importance for this group of patients, especially for providing useful information for genetic counseling and prenatal diagnosis and for helping the phenotype prediction, which could be important to define the treatment plan in some cases. However, we stress that these results should be interpreted in conjunction with clinical findings, biochemical results and family history.

References:

Pollard LM, Jones JR, Wood TC (2012) Molecular characterization of 355 mucopolysaccharidosis patients reveals 104 novel mutations. *J Inher Metab Dis*.

Neufeld EF, Muenzer J (2001) The Mucopolysaccharidoses. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. 7^a ed. New York: McGraw-Hill, 1191-1211

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O screening dessas seis mutações recorrentes possibilitou um diagnóstico rápido e confiável. O fato de encontrarmos algumas destas mutações com uma frequência alélica de 55,8%, em um gene com tamanha heterogeneidade (mais de 180 mutações descritas) valida esse protocolo como uma triagem inicial através da técnica de PCR-ARMS para detecção das mutações comuns (p.G116S/ p.G139S/ p.L307P/ p.N164T/ p.R386C/ p.S341R) seguido de PCR de regiões codificantes e sequenciamento direto dos demais éxons para detecção de outras mutações e/ou polimorfismos intragênicos. O sequenciamento possibilitou a detecção de uma mutação nova, tal como a mutação descrita no artigo 2: p.C165Y, e deve ser incluído no protocolo molecular para a detecção de outras mutações não recorrentes nos pacientes sem genótipo estabelecido na triagem inicial.

A caracterização genotípica desses pacientes é de extrema relevância para elucidação da correlação genótipo-fenótipo e para um melhor entendimento da resposta a TRE que está em fase de testes.

9 PERSPECTIVAS

Esse estudo terá continuidade com a análise do sequenciamento de todos os 14 éxons do gene, bem como de análises de segregação e haplótipos para identificação de um possível efeito fundador no Nordeste (mutação p.S341R presente em 5 pacientes da Paraíba), assim como já demonstrado em MPS VI. A detecção de portadores nesta região nos permitirá calcular o índice de consanguinidade e estabelecer, com base nos dados obtidos, a necessidade de um programa de triagem neonatal para o diagnóstico precoce o que traria grandes benefícios para o tratamento disponível através de TRE.

Futuros projetos nesta área incluem também análises epigenéticas através da técnica de *Methylation-sensitive high-resolution melting* (MS-HRM), análise de proteínas inflamatórias (citocinas) utilizando a plataforma Luminex e análise proteica através de Western blot.

10 ANEXOS

Anexo I- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DO PROJETO: Mucopolissacaridoses no Brasil: um estudo clínico, epidemiológico, genético, bioquímico e genético molecular com impacto no diagnóstico, manejo e prevenção.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Roberto Giugliani, Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, RS.

PESQUISADOR ASSOCIADO (informar nome do pesquisador e do centro participante que está avaliando o paciente): _____

Nome do paciente: _____

Endereço: _____

Cidade: _____ Estado: _____ CEP: _____ Fone: (____) _____

Email: _____

Responsável: _____ Idade: _____

RG: _____ Grau de parentesco: _____

Justificativa e objetivos do estudo

As mucopolissacaridoses são doenças genéticas de curso progressivo e muitas vezes de diagnóstico difícil. Com o objetivo de diagnosticar corretamente os pacientes afetados, permitindo que recebam as medidas de tratamento disponíveis em cada situação, foi montado um projeto para avaliar clínica e laboratorialmente os pacientes com suspeita de apresentar uma mucopolissacaridose. Os casos identificados serão referidos a centros regionais que possam realizar o manejo adequado e oferecer as medidas de prevenção de novos casos para a família. O estudo pretende identificar as mucopolissacaridoses mais frequentes e as regiões de maior incidência, bem como incentivar a pesquisa sobre essas doenças no Brasil.

Procedimentos a que serão submetidos os pacientes

Os pacientes com suspeita de apresentar uma mucopolissacaridose serão submetidos a uma avaliação clínica. Caso a suspeita persista, serão coletadas amostras de urina para análise bioquímica e amostras de sangue para análises bioquímica e/ou molecular. A investigação molecular inclui a análise de DNA para identificação das mutações presentes nas mucopolissacaridoses. Em alguns casos será necessária a repetição dos exames e mesmo a coleta de uma biópsia de pele para o completo esclarecimento do caso. Alguns procedimentos adicionais, como exames de imagem, testes de função pulmonar, testes de mobilidade articular, testes de resistência, estudo do sono, entre outros, poderão ser indicados. Esses exames fazem parte da rotina de atendimento de pacientes com suspeita de mucopolissacaridose. Eventualmente, poderão ser solicitadas amostras de familiares de pacientes para o esclarecimento do caso, identificação de familiares portadores de mutações, aconselhamento genético e diagnóstico pré-natal. Os resultados das análises serão encaminhados ao médico assistente do paciente, ficando sob responsabilidade deste a informação do resultado ao paciente e/ou familiar.

REDE MPS / GPPG
VER. SEM APROVADA
24 / 02 / 09
Nº 03066/09

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
16 JUL 2009
1
Nº 03066

Armazenamento de dados e amostras

Os dados clínicos e laboratoriais serão registrados em um banco de dados e as amostras ficarão armazenadas em um banco de material biológico. Essas amostras poderão ser utilizadas em estudos sobre mucopolissacarídeos que estejam vinculados a este projeto.

Benefícios esperados

Com o diagnóstico do tipo de Mucopolissacarídose, o paciente poderá se beneficiar das medidas de tratamento eventualmente disponíveis, além de possibilitar aconselhamento genético, detecção de portadores e diagnóstico pré-natal.

Caso tenha alguma dúvida ou queira algum esclarecimento adicional, contactar _____ no seguinte endereço e telefone:

Concordo em participar do projeto de pesquisa “Mucopolissacarídeos no Brasil: um estudo clínico, epidemiológico, genético, bioquímico e genético molecular com impacto no diagnóstico, manejo e prevenção” e autorizo a utilização das minhas amostras biológicas em estudos relacionados com este projeto.

Data: ____ / ____ / ____

Paciente ou responsável: _____

Responsável pelo estado: _____

HCPA / GPPG
 VERSÃO APROVADA
 21 / 07 / 09
 Nº 03066 189

Anexo II- Carta de Aprovação



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO CIENTÍFICA E COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

A Comissão Científica e o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CEP/HCPA), que é reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB00000921) analisaram o projeto:

Projeto: 110214

Data da Versão do Projeto: 07/06/2011

Pesquisadores:

SANDRA LEISTNER SEGAL
 ROBERTO GIUGLIANI
 ANA CAROLINA BRUSKUS-FACCHIN
 FRANCYNE KUBASKO

Título: Estudo molecular de pacientes e familiares com Mucopolissacaridose IVA.

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as diretrizes e normas nacionais e internacionais de pesquisa clínica, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

- Os membros da Comissão Científica e do Comitê de Ética em Pesquisa não participaram do processo de avaliação dos projetos nos quais constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente ao CEP/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEP/HCPA.
- Somente poderá ser utilizado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido no qual conste o carimbo de aprovação do CEP/HCPA.

Porto Alegre, 16 de junho de 2011.


 Profa. Nadine Claudel
 Coordenadora GPPG e CEP/HCPA

Anexo III- Artigo 3

J Inherit Metab Dis
DOI 10.1007/s10545-012-9557-z

LETTER TO THE EDITORS

Important aspects in the molecular diagnosis of mucopolysaccharidoses

Ana Carolina Brusius-Facchin · Francyne Kubaski · Roberto Giugliani · Sandra Leistner-Segal

Received: 11 October 2012 / Accepted: 17 October 2012
© SSIEM and Springer Science+Business Media Dordrecht 2012

Recently, Pollard et al (2012) reported the molecular characterization of 355 patients with mucopolysaccharidoses, in whom 104 novel mutations were found. We read this article with great interest and would like to share some insights and concerns regarding these results, which we think relevant as the authors propose that genetic diagnosis should be performed before or even without biochemical diagnosis. Enzyme diagnosis is presently considered the "gold standard" approach (Neufeld and Muenzer 2001), usually followed by genetic diagnosis mainly to help the understanding of the genotype-phenotype correlation, to detect carriers, to improve prenatal diagnosis and to confirm biochemical diagnosis in the few doubtful cases.

We agree with these authors that information about ethnic background and clinical phenotype is of great importance once the ratio of heterogeneity could differ greatly amongst populations and mutation detection protocols based on local recurrent mutations could be helpful, depending on the population studied. In Brazil, several MPS clusters were identified, and mutation analysis of index cases was very useful to guide molecular testing customized for these areas.

Communicated by: Ed Wraith

A. C. Brusius-Facchin · F. Kubaski · R. Giugliani · S. Leistner-Segal (✉)
Medical Genetics Service,
Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA),
Porto Alegre, RS, Brazil
e-mail: ssegal@hcpa.ufrgs.br

A. C. Brusius-Facchin · F. Kubaski · S. Leistner-Segal
Post Graduation Program in Medical Sciences, UFRGS,
Porto Alegre, RS, Brazil

R. Giugliani
Department of Genetics, UFRGS,
Porto Alegre, RS, Brazil

For instance, several mutations which are recurrent in our area, especially for MPS II, IVA and VI, were not detected among the patients reported here, which could reflect distinct genetic background.

Regarding the fact that no mutations were identified in a patient with MPS II even after sequencing the whole gene, performing MLPA analysis and searching for the common IDS/IDSP1 abnormality, the authors should consider the analysis of the promoter region. In our sample 2/105 patients analyzed and confirmed by enzyme deficiency had a deletion (178bpdel) in this region as the disease-causing mutation. Also, other types of rearrangements, apart from the common inversion described, could be undetectable by the methods employed. Among patients with whole *IDS* gene deletions it is relevant to analyze the extension of the deletions in order to delineate the break-points as contiguous genes could also be deleted inferring genetic determinants of phenotype in different patients.

Another important aspect refers to the lower heterogeneity found in *GALNS* gene, nevertheless, considering a sample size of six patients (including two siblings) this could be easily predicted.

Taking into account the probability of uniparental disomy (UPD) and the presence of gene deletions in the *GALNS* gene, we suggest that in homozygous cases a genetic analysis should be performed in the parents as well to rule out this possibility, very important for genetic counseling purposes.

Regarding MPS VI and MPS IVA genotyping, it is important to acknowledge the high frequency of intragenic polymorphisms which could modify genotypes even within families, also being useful for haplotype analysis in the case of recurrent mutations within a specific group. This was partly stated by the authors in the discussion section, but the results for the patients genotyped were not shown.

We believe that molecular analysis is of great importance for this group of patients, especially for providing

Published online: 09 November 2012

 Springer

useful information for genetic counseling and prenatal diagnosis and for helping in the phenotype prediction, which could be important to define the treatment plan in some cases. However, we stress that these results should be interpreted in conjunction with clinical findings, biochemical results and family history.

Conflict of Interest None.

References

- Pollard LM, Jones JR, Wood TC (2012) Molecular characterization of 355 mucopolysaccharidosis patients reveals 104 novel mutations. *J Inherit Metab Dis*. doi:10.1007/s10545-012-9533-7
- Neufeld EF, Muenzer J (2001) The Mucopolysaccharidoses. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The metabolic and molecular basis of inherited disease*, 7th edn. McGraw-Hill, New York, pp 1191–1211