

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

**ESTUDO MOLECULAR E CONFIRMAÇÃO DO  
ASPECTO PATOGÊNICO DE MUTAÇÕES NOVAS EM  
PACIENTES BRASILEIROS COM A SÍNDROME DE  
MORQUIO A**

TATIANA DIETER

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre, Brasil.  
2006

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

**ESTUDO MOLECULAR E CONFIRMAÇÃO DO  
ASPECTO PATOGÊNICO DE MUTAÇÕES NOVAS EM  
PACIENTES BRASILEIROS COM A SÍNDROME DE  
MORQUIO A**

TATIANA DIETER

Orientador: **Dr. Roberto Giugliani**

Co-Orientadora: **Dr<sup>a</sup>. Ursula da Silveira Matte**

“A apresentação desta dissertação é exigência do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Pediatria, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre”

Porto Alegre, Brasil, 2006.

**D565e** Dieter, Tatiana

Estudo molecular e confirmação do aspecto patogênico de mutações novas em pacientes brasileiros com a síndrome de Morquio A / Tatiana Dieter ; orient. Roberto Giugliani ; co-orient. Ursula da Silveira Matte. – 2006.

85 f.

**Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Pediatria. Porto Alegre, BR-RS, 2006.**

1. Mucopolissacaridose IV 2. Virulência 3. Mutagênese I.  
Giugliani, Roberto II. Matte, Ursula da Silveira III. Título.

NLM: WS 115

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

*Este trabalho é dedicado àquele que desde cedo me despertou a curiosidade e o interesse mais puro e sincero pela genética. Ao meu irmão onde quer que esteja...*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Roberto Giugliani pelas oportunidades oferecidas, pela confiança depositada, pela atenção desprendida e pelo exemplo de lutas e conquistas pelo desenvolvimento e reconhecimento da genética em nosso país.

À Dr<sup>a</sup> Ursula da Silveira Matte por todos os ensinamentos; pelo apoio indiscutível em todos os momentos antes, durante e depois deste trabalho; pelo carisma, força e competência que a tornam essa pessoa admirável e de sucesso.

Aos colegas do Centro de Terapia Gênica pelos bons momentos de companheirismo, convivência e amizade.

À Dr<sup>a</sup> Ida Vanessa Schwartz que me confiou os dados clínicos e material para a análise molecular dos seus pacientes. Além disso pela pessoa atenciosa que sempre mostra ser com aqueles que estão sob seus cuidados e o apoio dado, em especial à minha família, nos momentos certos.

Ao Dr. Shunji Tomatsu pelo aprendizado e pela oportunidade de estágio que possibilitou a realização desta dissertação.

Aos pacientes e seus familiares pela confiança e colaboração indispensáveis para a realização desta pesquisa.

À família, por tudo e mais um pouco...

## RESUMO

**Introdução:** A Síndrome de Morquio A (MPS IVA) é um Erro Inato do Metabolismo do grupo das Doenças Lisossômicas. Esta patologia é caracterizada pelo acúmulo e excreção de queratan e condroitin sulfato devido à deficiência da enzima lisossomal Galactose-6 sulfatase (GALNS; E.C.3.1.6.4). É uma doença rara cuja incidência varia entre 1:45.000 e 1:640.000. Os aspectos clínicos predominantes estão relacionados com o sistema osteo-articular com efeitos secundários sobre o sistema nervoso central, embora não haja déficit cognitivo. Os achados clínicos, evidentes a partir dos 2 anos, direcionam as análises bioquímicas para confirmação do diagnóstico através de avaliação dos glicosaminoglicanos urinários e de ensaios enzimáticos específicos. A doença é herdada de forma autossômica recessiva. O cDNA revela uma região codificante com 1566 nucleotídeos, que determina uma proteína com 522 aminoácidos. O gene contém 14 exons e foi mapeado em 16q24.3. Já foram descritas 148 mutações e 16 polimorfismos. O gene apresenta grande heterogeneidade molecular, sendo que 46,1% das mutações ocorreram menos de três vezes. **Objetivo** Identificar as mutações presentes no gene da GALNS em pacientes brasileiros com diagnóstico bioquímico para a MPS IVA; verificar se as mutações novas encontradas são causadoras do fenótipo patológico; e padronizar as técnicas de PCR e SSCP para análise do gene da GALNS. **Materiais e Métodos:** Seis casos-índice tiveram todo o gene da GALNS amplificados por PCR, seguido de seqüenciamento. Para as mutações novas, primers foram confeccionados para os respectivos exons e a patogenicidade testada por análise de frequência em 100 controles normais. Condições de PCR e SSCP foram determinadas para cada um dos 4 exons com mutações novas. Sete pacientes novos com diagnóstico bioquímico foram analisados para os exons com as condições pré-estabelecidas. Os controles e pacientes com padrão alterado no gel de SSCP foram seqüenciados. **Resultados:** Em relação aos seis casos-índice 11 dos 12 alelos tiveram a alteração identificada, revelando seis mutações diferentes. Destas, quatro eram novas (p.G116S, p.N164T, p.L307P e p.S341R) e duas já descritas (p.R386C e p.G139S). Dos 100 controles analisados para cada exon nenhum apresentou o mesmo padrão de migração da amostra mutada, mas foram encontradas novas alterações (p.A107A, p.Y108Y e p.P357P). Entre os pacientes novos, sete dos 14 alelos foram identificados (p.N164T, p.G301C e uma mudança do quadro de leitura). **Discussão:** As quatro mutações novas identificadas foram consideradas patogênicas uma vez que não estavam presentes nos controles, indicando uma frequência menor que 1% nesse grupo. As mutações p.G116S,

p.N164T e p.G301C (frequências de 14,3%, 14,3% e 19,0% dos alelos, respectivamente) foram consideradas recorrentes, além das já descritas e também recorrentes p.G139S e p.R386C. Nos quatro exons padronizados encontramos 40% das mutações descritas. Entre as diferentes mutações encontradas em nossos casos-índice uma nova (p.G116S) e duas já descritas (p.G139S e p.R386C) se localizam em regiões CpG. **Conclusões:** Foram identificadas alterações moleculares em 11 dos 12 alelos de seis pacientes brasileiros com MPS IVA, sendo que as quatro mutações novas encontradas puderam ser classificadas como patogênicas; as técnicas de PCR e SSCP para os 4 exons do gene da GALNS foram padronizadas.

## ABSTRACT

**Introduction:** Morquio A Syndrome (MPS IVA) is an Inborn Errors of Metabolism which belongs to the Lysosomal Diseases group. This pathology is characterized by keratan and chondroitin sulfate storage and excretion due to the deficiency of the lysosomal enzyme galactose-6-sulfatase (GALNS; E.C.3.1.6.4). It's a rare disease whose incidence varies between 1:45,000 and 1:640,000. The main clinical aspects are those related with the articular bone system, with secondary effects on the central nervous system, although intelligence is normal. The clinical findings, which are evident after the age of 2 years, guide the biochemical analysis to the diagnosis throughout urinary glycosaminoglycans screening followed by the specific enzyme assay. The disease is inherited as an autosomal-recessive trait. The cDNA shows a coding region of 1566 nucleotides that determines a protein with 522 amino acids. The gene has 14 exons and was mapped in 16q24.3. So far 148 mutations and 16 polymorphisms have been reported. The gene has a huge molecular heterogeneity, as 46.1% of the mutations have been reported less than three times. **Aim:** Identify the mutations present in the GALNS' gene of Brazilian patients with biochemical diagnosis of MPS IVA; verify if the new mutations found are pathogenic; standardize PCR and SSCP techniques for GALNS' gene analysis. **Patients and Methods:** Six initial cases had the whole GALNS' gene amplified by PCR followed by sequencing. For the new mutations, primers were designed for the respective exons and the pathogenesis tested by frequency analyses in 100 normal controls. PCR and SSCP conditions were determined for each of the four exons with new mutations. Seven new patients with the biochemical diagnosis were analyzed for these exons with preset conditions. Controls and patients with a different SSCP pattern were sequenced. **Results:** Among the index cases 11 out of 12 alleles were identified and revealed six different mutations. Four of these were new (p.G116S, p.N164T, p.L307P and p.S341R) and two already published (p.R386C and p.G139S). Among the 100 controls analyzed for each exon no one had the same SSCP pattern observed in the mutation sample, but three new alterations were found (p.A107A, p.Y108Y e p.P357P). In relation to the new patients, seven out of 14 alleles were identified (p.N164T, p.G301C and a frameshift). **Discussion:** The four new mutations found were considered pathogenic because they were not present in the control group, indicating a frequency less than 1% in this group. The p.G116S, p.N164T and p.G301C mutations (frequencies of 14.3%, 14.3% e 19.0% of the alleles, respectively) were

considered recurrent, like the p.G139S and p.R386C already described. In the four standardized exons we found 40% of the published mutations. Between the seven different mutations in our cases one new (p.G116S) and two other ones (p.G139S and p.R386C) were in CpG sites. **Conclusions:** It were identified 11 out of 12 alleles of six Brazilian patients with MPS IVA, and the four new mutation found could be classified as pathologic; the PCR and SSCP techniques to four exons of GALNS' gene were standardized.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Divisão das MPS de acordo com o tipo de GAG acumulado e suas consequências teciduais. Adaptado de Byers et al., 1998 .....	19
Figura 2 - Modelo da estrutura terciária da enzima GALNS. O resíduo C79, no sítio ativo, é representado pela esfera vermelha. O domínio N-terminal está na arte superior e o domínio C-terminal menor na parte inferior (Sukegawa et. al., 2000)..	28
Figura 3 - Rotina para diagnóstico laboratorial de MPS IVA. Adaptado de Leistner e Giugliani, 1997 .....	33
Figura 4 - Eletroferograma do seqüenciamento realizado com primer direto evidenciando a mutação G116S em homozigose .....	43
Figura 5 - Eletroferograma do seqüenciamento evidenciando a mutação N164T em homozigose realizado com primer reverso .....	43
Figura 6 - Eletroferograma evidenciando a mutação L307P em heterozigose com primer direto .....	43
Figura 7 - Eletroferograma evidenciando a mutação S341R em heterozigose realizado com primer reverso .....	43
Figura 8 - Gel de agarose a 1,5%. Coluna 1 e 2 exon 4; coluna 3 e 4 exon 5, coluna 5 marcador de peso molecular de 50 pb; coluna 6 e 7 exon 9; e coluna 8 e 9 exon 10 .....	44
Figura 9 - Géis de SSCP corados com nitrato de prata. (A) Padronização para o exon 4. (B) Padronização para o exon 5 .....	45
Figura 10 - Géis de SSCP corados com nitrato de prata. (A) Padronização para o exon 9. (B) Padronização para o exon 10.....	45
Figura 11 - Número de mutações descritas por exon para o gene da GALNS (Tomatsu et al., 2005) .....	53

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação das Mucopolissacaridoses (MPS) com indicação do glicosaminoglicano (GAG) acumulado e deficiência enzimática .....	17
Tabela 2 - Primers para amplificação dos exons 4, 5, 9 e 10 da GALNS, temperatura de anelamento e tamanho do produto de PCR .....	35
Tabela 3 - Concentração e condições de corrida do gel de poliacrilamida na técnica de SSCP para cada exon .....	37
Tabela 4 - Sumário dos dados de anamnese dos casos-índice .....	40
Tabela 5 - Sumário dos dados de anamnese dos novos casos .....	41
Tabela 6 - Mutações encontradas nos casos-índice .....	42
Tabela 7 - Alteração na base, códon e aminoácido para cada mutação dos casos-índice ....	42
Tabela 8 - Número de controles estudados e com padrão do SSCP alterado em relação tanto aos demais controles quanto ao padrão da mutação estudada para cada exon	45
Tabela 9 - Número de pacientes estudados e com padrão do SSCP alterado em relação aos demais controles para cada exon .....	46
Tabela 10 - Mutações encontradas nos pacientes novos evidenciando a alteração na base, códon e aminoácido .....	46
Tabela 11 - Mutações encontradas nos controles evidenciando o efeito, a alteração na base, códon e aminoácido e o tipo de mutação .....	47
Tabela 12 - Frequência das mutações encontradas nos pacientes brasileiros corrigida pela consangüinidade .....	47
Tabela 13 - Número de mutações esperadas e observadas por exon do gene da GALNS de acordo com seu tamanho relativo .....	54
Tabela 14 - Grau de conservação do aminoácido e fenótipo para cada mutação encontrada no gene da GALNS em pacientes brasileiros .....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS

µL	Microlitro
°C	Graus Centígrados
1X	Uma vez
A	Adenina
APS	Persulfato de amônio
C	Citosina
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CS	Condroitin sulfato
DL	Doenças Lisossômicas
DMSO	Dimetilsulfoxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
DS	Dermatan sulfato
EDTA	Etileno diamino tetracético
EIM	Erros Inatos do Metabolismo
G	Guanina
GAGs	Glicosaminoglicanos
GALNS	N-acetilgalactosamina-6 sulfato sulfatase ou Galactose-6-sulfatase
H	Hialuronan
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HS	Heparan sulfato
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MPS	Mucopolissacaridose
MPV IVA	Mucopolissacaridose tipo IVA
ng	Nanograma
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pmoles	Picomol
q.s.p.	Quantidade suficiente para
QS	Queratan sulfato
rpm	Rotações por minuto
SGM	Serviço de Genética Médica
SSCP	<i>Single Strand Conformation Polymorfism</i>
T	Timina
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA
TEMED	Tetrametilenodiamina
TG	Terapia Gênica
TMO	Transplante de Medula Óssea
TRE	Terapia de Reposição Enzimática
V	Volts

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>1.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO</b> .....	<b>13</b>
<b>1.2 DOENÇAS LISSÔMICAS DE DEPÓSITO</b> .....	<b>14</b>
1.2.1 Diagnóstico .....	15
1.2.2 Tratamento .....	16
<b>1.3 MUCOPOLISSACARIDOSES</b> .....	<b>16</b>
1.3.1 Epidemiologia .....	18
1.3.2 Aspectos Clínicos .....	18
1.3.3 Diagnóstico .....	20
1.3.4 Tratamento .....	20
1.3.4.1 <i>Transplante de Medula Óssea</i> .....	21
1.3.4.2 <i>Terapia de Reposição Enzimática</i> .....	21
1.3.4.3 <i>Terapia Gênica</i> .....	22
<b>1.4 MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO IVA: SÍNDROME DE MORQUIO A</b> .....	<b>22</b>
1.4.1 Histórico .....	23
1.4.2 Dados Epidemiológicos .....	23
1.4.3 Aspectos Clínicos .....	24
1.4.4 Diagnóstico .....	26
1.4.5 Aspectos Bioquímicos .....	27
1.4.6 Aspectos Moleculares .....	27
1.4.7 Tratamento .....	29
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>31</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>32</b>
<b>4 PACIENTES E MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
4.1 AMOSTRA ESTUDADA .....	33
4.2 MÉTODOS .....	34
4.2.1 Extração de DNA .....	34
4.2.2 Casos-Índice: Amplificação e Sequenciamento direto .....	34
4.2.3 Amplificação do DNA pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase .....	35
4.2.4 Análise dos produtos amplificados em gel de agarose .....	36
4.2.5 Análise por SSCP (Single Strand Conformation Polymorfism) .....	37
4.2.6 Processamento de amostras com padrão alterado no SSCP .....	38
4.2.7 Aspectos Éticos .....	39
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>40</b>
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA .....	40
5.1.1 Amostra estudada .....	40
5.2 ANÁLISE DAS MUTAÇÕES .....	41
5.2.1 Mutações nos casos-índice .....	41
5.2.2 Amplificação por PCR e Análise por SSCP .....	44
5.2.3 Sequenciamentos .....	46
5.2.4 Frequências .....	47

<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>48</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>59</b>
	<b>ANEXO A : Artigo “Identification of a common mutation in mucopolysaccharidosis IVA: correlation among genotype, phenotype, and keratan sulfate” J Hum Genet. 2004; 49(9):490-4</b> .....	<b>60</b>
	<b>ANEXO B: Artigo “Common mutations in Brazilian mucopolysaccharidosis IVA (MPS IVA) patients” submitted</b> .....	<b>61</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>76</b>

## **1 INTRODUÇÃO**

A Síndrome de Morquio A ou Mucopolissacaridose tipo IVA (MPS IVA) é um Erro Inato do Metabolismo do grupo das Doenças Lisossômicas de Depósito, sendo uma das diversas mucopolissacaridoses (MPS) conhecidas. Esta patologia acomete os pacientes desde seu nascimento e, por seu caráter progressivo, leva a um quadro cada vez mais grave. Os achados clínicos direcionam as análises bioquímicas para confirmação do diagnóstico.

Na era da biologia molecular cada vez podemos saber mais sobre as doenças e determinar o erro genético exato que levou ao desenvolvimento da patologia. Este conhecimento nos permite fazer uma correlação genótipo-fenótipo, diagnósticos pré-natais mais precoces e buscar a cura do defeito básico.

Este trabalho buscou, pela primeira vez no Brasil, abordar o diagnóstico molecular de pacientes brasileiros com a Síndrome de Morquio A.

### **1.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO**

Os Erros Inatos do Metabolismo (EIM) são transtornos bioquímicos determinados geneticamente que acarretam alterações na estrutura e/ou função de moléculas protéicas importantes para o metabolismo humano. São, em sua maioria, doenças monogênicas de herança autossômica recessiva. A alteração de um gene produz um defeito em enzimas transportadoras ou co-fatores que levam às alterações bioquímicas características de cada doença metabólica e que são responsáveis pelo fenótipo clínico (Saínez et al., 2002 e Ballas et al., 2003).

O primeiro EIM foi assim caracterizado em 1902 por Sir Archibald Garrot que previu, em um artigo publicado na revista Lancet, que um bloqueio metabólico poderia ser o passo inicial que determinava as alterações observadas na alcaptonúria. Estudos nesta área apresentaram um progresso lento até a década de 50, quando novas informações foram disponibilizadas por novas tecnologias. Juntas, a bioquímica, a biologia celular e a genética molecular estão permitindo compreender como se altera a síntese, o processamento e a localização de numerosos produtos genéticos e suas conseqüências para o indivíduo (Saínez et al., 2002 e Dagach, 2003).

A maioria dos EIM se manifesta na idade pediátrica, desde o nascimento até a adolescência, com sinais e sintomas similares a outras patologias. Muitas evoluem com seqüelas importantes como: convulsões e retardo mental. A prevenção destas seqüelas, possível em algumas situações, através de um diagnóstico precoce é um desafio proposto aos pediatras. A sintomatologia pode ser aguda no período neonatal, podendo ocasionar, inclusive, uma emergência clínica (Ballas et al., 2003).

Apesar de terem incidência relativamente baixa (Hopwood e Morris, 1990), os EIM são importantes devido ao seu impacto devastante na saúde do indivíduo. Por sua gravidade, constituem causa de mortes prematuras, transtornos neurológicos severos, retardo mental, baixa qualidade de vida, dependência, institucionalização e, como conseqüência, cargas familiares, sociais e econômicas elevadas. A constituição de uma hipótese diagnóstica formulada pela avaliação clínica seguida de análises bioquímicas apropriadas constitui a base do diagnóstico, importante para o tratamento, disponível em algumas situações. As investigações bioquímicas usualmente têm uma complexidade crescente e a colaboração interdisciplinar entre pediatras, geneticistas e bioquímicos é necessária para o sucesso do diagnóstico (Saínez et al., 2002).

## **1.2 DOENÇAS LISOSSÔMICAS**

As Doenças Lisossômicas (DL) são um grupo de Erros Inatos do Metabolismo, clinicamente conhecidas já no final do século 19 e início do século 20, muito tempo antes da descoberta do lisossomo em 1955 por de Duve (Wilcox, 2004).

Este grupo grande e heterogêneo, hoje com cerca de 50 doenças, possui uma patogênese comum. Na sua maioria é conseqüência de mutações nos genes estruturais que codificam as hidrolases lisossomais responsáveis pela degradação de macromoléculas. Também se tem demonstrado defeitos determinados geneticamente que dizem respeito a receptores, proteínas ativadoras, proteínas de membrana ou proteínas transportadoras que causam, igualmente, acúmulo lisossomal de substratos específicos. Estes resíduos acumulam-se progressivamente causando deterioração das funções celulares e teciduais. A maioria das doenças apresenta envolvimento sistêmico e do sistema nervoso central. Caracterizam-se por um déficit protéico específico, excreção aumentada de metabólitos na urina e acúmulo dos compostos não degradados em diferentes órgãos e tecidos, o que ocasiona sua disfunção. Na

última década ocorreram significativos avanços no conhecimento dos aspectos clínicos, bioquímicos e genéticos das DL (Wilcox, 2004).

As frequências individuais são baixas, variando entre 1 a 4/100.000 nascimentos. Como grupo, sua incidência é calculada como 1/9.000 e sua prevalência de 1/7.700 nascidos vivos (Meikle et al., 1999). A incidência atual pode estar subestimada pelos fenótipos leves. Em adultos, as doenças de Gaucher, Fabry e Niemann-Pick tipo A são as mais comuns. Algumas doenças são mais prevalentes em determinadas regiões geográficas ou grupos étnicos. Por exemplo, Gaucher, Tay Sachs, Niemann-Pick A e B e Mucopolidose IV são 50 a 60 vezes mais frequentes em descendentes de judeus Ashkenazi do que na população em geral (Wilcox, 2004).

Todas as DL são doenças monogênicas e, com três exceções, são herdadas de modo autossômico recessivo. As exceções são: Síndrome de Hunter (MPS tipo II), Doença de Fabry e a recentemente descrita doença de Danon, todas com herança ligada ao X (Vellodi, 2005). Convencionalmente, se agrupam as DL conforme o tipo químico dos substratos não degradados que se acumulam: esfingolipidoses, mucopolissacaridoses, glicoproteinoses e outras.

### **1.2.1 Diagnóstico**

O amplo espectro de fenótipos e as características clínicas inespecíficas podem dificultar o reconhecimento das DL. O diagnóstico usualmente é estabelecido bioquimicamente por um ensaio enzimático específico, ou por análise de mutações (Wilcox, 2004).

O diagnóstico pré-natal da maioria das DL pode ser feito por ensaio enzimático, análise molecular ou por exame ultraestrutural dos amniócitos e células do viló coriônico. Protocolos de triagem neonatal para as DL como grupo ou como doença específica estão sendo desenvolvidos. Uma vez firmado o diagnóstico, o aconselhamento genético é disponibilizado para pacientes e familiares, para fornecer informações sobre herança, risco de recorrência, detecção de portadores, etc (Meikle et al., 1999).

## **1.2.2 Tratamento**

Dada a gravidade das DL e à limitação de recursos terapêuticos, é importante a prevenção de novos casos nas famílias afetadas através do aconselhamento genético. A prevenção usualmente só é possível a partir de identificação prévia de um caso índice (Saínz et al., 2002).

Pelas variadas manifestações clínicas esses pacientes necessitam de uma equipe multidisciplinar para seu manejo. Além disso, grupos de apoio aos familiares e aos pais fornecem um inestimável suporte emocional (Wilcox, 2004).

Várias terapias não específicas, já que na maioria das situações não há um tratamento eficaz e definitivo, são empregadas nessas doenças (tratamento sintomático com intervenções médicas e cirúrgicas). Terapias específicas podem ser divididas nas que buscam aumentar a atividade da enzima (transplante de medula óssea, terapia de reposição enzimática e terapia gênica) e nas que buscam reduzir a síntese de substrato (terapia de redução de substrato) (Wilcox, 2004).

## **1.3 MUCOPOLISSACARIDOSES**

A primeira descrição de um caso de mucopolissacaridose (MPS), entre 1900 e 1913, foi atribuída a John Thompson, de Edimburg. Mas a primeira publicação sobre elas foi realizada em 1917 por Charles Hunter (Santana, 2004). As MPS são um grupo heterogêneo das doenças lisossômicas de depósito, cada uma causada pela deficiência de uma enzima envolvida na degradação dos glicosaminoglicanos (GAGs), anteriormente chamados de mucopolissacarídeos (Muenzer, 2004).

Os GAGs são formados por cadeias de dissacarídeos que se repetem seqüencialmente e se unem em uma proteína central, constituindo moléculas mais complexas denominadas proteoglicanos. Estes, por sua vez, formam parte da matriz extracelular da maioria dos tecidos, o que se reflete no comprometimento multisistêmico das MPS. Os diferentes GAGs - dermatan sulfato (DS), heparan sulfato (HS), queratan sulfato (QS), condroitin sulfato (CS) e hialuronan (H) - se degradam nos lisossomos por diferentes vias catabólicas mas compartilham entre si algumas das enzimas envolvidas. Este processo de degradação está

alterado nas MPS produzindo um depósito lisossomal progressivo dos catabólitos insuficientemente degradados. Este acúmulo acaba resultando em disfunção da célula, do tecido e do órgão, levando à morte celular e liberação dos GAGs nos conteúdos extracelulares que podem, por sua vez, serem detectados na urina (Neufeld e Muenzer, 2001 e Santana, 2004).

Na última década, os conhecimentos das bases moleculares e das variações clínicas dessas doenças têm evoluído muito. Essas doenças são mais complexas, mais heterogêneas e talvez mais prevalentes do que inicialmente suposto. Até o momento estão descritos sete tipos de MPS (Tabela 1), sendo que três delas apresentam subtipos que indicam diferentes bases genéticas para a mesma apresentação clínica. São herdadas de forma autossômica recessiva com exceção da Síndrome de Hunter (MPS II) que tem sua herança ligada ao cromossomo X (Muenzer, 2004).

Tabela 1 - Classificação das Mucopolissacaridoses (MPS) com indicação do glicosaminoglicano (GAG) acumulado na urina e deficiência enzimática.

<b>Tipo</b>	<b>Epônimo</b>	<b>Enzima Deficiente</b>	<b>GAGs acumulado(s)</b>
MPS I H	Síndrome de Hurler	$\alpha$ -L-iduronidase	DS e HS
MPS I S	Síndrome de Scheie	$\alpha$ -L-iduronidase	DS e HS
MPS I HS	Síndrome de Hurler-Scheie	$\alpha$ -L-iduronidase	DS e HS
MPS II	Síndrome de Hunter	Iduronato sulfatase	DS e HS
MPS IIIA	Síndrome de Sanfilippo A	Heparan N- sulfatase	HS
MPS IIIB	Síndrome de Sanfilippo B	$\alpha$ -N-acetilglicosaminidase	HS
MPS IIIC	Síndrome de Sanfilippo C	Acetil Co-A: $\alpha$ -glicosaminídeo Acetiltransferase	HS
MPS III D	Síndrome de Sanfilippo D	N-acetilglicosamina 6-sulfatase	HS
MPS IVA	Síndrome de Morquio A	Galactose-6-sulfatase	QS e CS
MPS IVB	Síndrome de Morquio B	$\beta$ -galactosidase	QS
MPS VI	Síndrome de Maroteaux-Lamy	Arilsulfatase B	DS
MPS VII	Síndrome de Sly	$\beta$ -glicuronidase	DS, HS e CS
MPS IX		Hialuronidase	Hialuronan

Fonte: MUENZER, 2004.

(DS) dermatan sulfato; (HS) heparan sulfato; (QS) queratan sulfato; (CS) condroitin sulfato.

### **1.3.1 Epidemiologia**

A prevalência geral das MPS é difícil de estimar pela escassez de estudos de base populacional e dados epidemiológicos. Um estudo retrospectivo da população australiana de 1980 a 1996 é uma das poucas referências populacionais. Neste artigo foi encontrada uma prevalência combinada para as MPS de 1/22.500, que representaram 35% das DL (Meikle et al., 1999).

Em um estudo realizado com 10.000 pacientes com sinais e sintomas de EIM, entre 1982 e 1995, no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, completou-se a investigação bioquímica em 9901 pacientes e os EIM foram detectados em 647 (6,5%). O grupo de maior incidência foi o das DL com 59,8% e dentro delas as MPS perfaziam 48,6% do seu total (Coelho et al., 1997).

### **1.3.2 Aspectos Clínicos**

O processo de acúmulo de substrato nos lisossomos começa em período fetal, mas muitas doenças só apresentam sintomas clínicos após o primeiro ano de vida, ou mais tardiamente nas formas juvenis ou adultas. Os quadros clínicos são determinados pela distribuição do acúmulo nos tecidos e pela localização fisiológica do substrato em questão. O acúmulo dos materiais não degradados leva à interrupção das funções celulares e orgânicas ocasionando os sinais e sintomas clínicos das diferentes patologias (Saínez et al., 2002).

Sinais importantes para investigação são hérnia umbilical ou inguinal, perda de aptidões de desenvolvimento e qualquer mudança gradual ou progressiva na aparência física. Todas elas, com exceção da MPS III, têm manifestações somáticas distintas. Pacientes com formas severas de MPS I, II e VII também apresentam retardo mental progressivo. Por outro lado, pacientes com MPS IV e VI não têm retardo mental apesar da gravidade sistêmica da doença (Neufeld e Muenzer, 2001 e Muenzer, 2004).

As MPS têm um desenvolvimento crônico e progressivo que afeta principalmente o sistema esquelético (disostose múltipla) e cardio-pulmonar. Além disso, apresentam hirsutismo, macrocefalia, déficit de crescimento, opacidade de córnea, face grosseira, hepato e

esplenomegalia. A idade de início dos sintomas, a gravidade e apresentação clínica podem variar amplamente tanto intra quanto entre os sete tipos de MPS. Muitos fatores podem contribuir para essa heterogeneidade: natureza ou tipo da mutação, tipo de subproduto acumulado, atividade enzimática residual, fatores ambientais e outros fatores genéticos desconhecidos (Muenzer, 2004 e Santana, 2004).

A maioria dos casos apresenta desenvolvimento fatal com quadros neurodegenerativos graves, dismorfias, alterações ósseas diversas, problemas oculares, anomalias cutâneas e hepato e esplenomegalia (Saínez et al., 2002).

A gravidade do fenótipo está relacionada com a atividade residual da enzima. Pequenas mudanças nesta atividade podem resultar em grandes variações nos níveis de substrato acumulado. Em geral, quanto menor a atividade residual mais cedo iniciam os sintomas e mais grave é a doença (Vellodi, 2005). Outros fatores que afetam a manifestação da doença incluem predisposição genética e ambiente (Wilcox, 2004).

O tipo de GAG acumulado está diretamente relacionado às manifestações clínicas da doença. O acúmulo de heparan sulfato, componente das células do tecido nervoso leva, por exemplo, a sintomas predominantemente neurológicos como se observam nas MPS I, II e III. O depósito de queratan sulfato, um importante componente da córnea e das cartilagens, produz opacidade da córnea e alterações esqueléticas como as observadas na Síndrome de Morquio (MPS IV). O depósito de dermatan sulfato está correlacionado com os sintomas como valvulopatias e miocardiopatia, freqüentes nas MPS I, II e VI (Santana, 2004).

Uma classificação mais geral proposta por Byers et al. (1998) para as MPS as coloca em dois grandes grupos de acordo com o tipo de GAG acumulado e sua ação nos tecidos específicos (Figura 1).

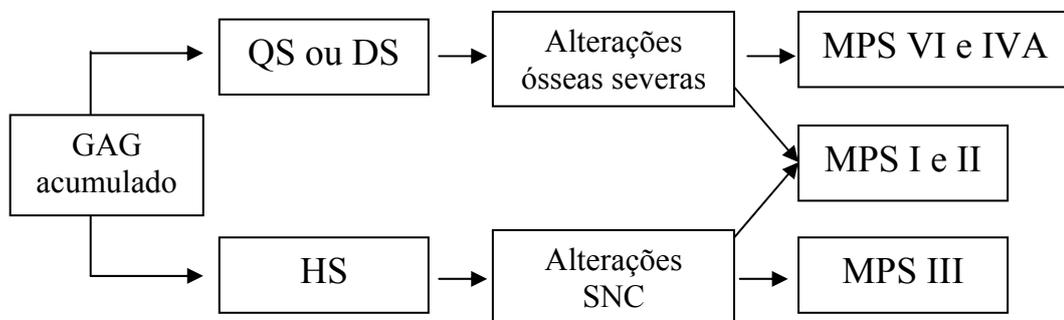


Figura 1- Divisão das MPS de acordo com o tipo de GAG acumulado e suas conseqüências teciduais. Adaptado de Byers et al., 1998.

### **1.3.3 Diagnóstico**

O diagnóstico definitivo das MPS ocorre pela demonstração do déficit enzimático específico em soro, leucócitos ou fibroblastos cultivados. A maioria dos ensaios é realizada por fluorimetria ou colorimetria. A análise de portadores por este método não parece muito confiável. Como os substratos não degradados são excretados na urina, seu estudo é relevante como triagem aos estudos enzimáticos (Saínez et al., 2002). Segundo Wilcox (2004), mucopolissacarídeos e oligossacarídeos podem estar alterados ou elevados em neonatos, indicando que a confirmação do diagnóstico nessa faixa etária deve ocorrer através do ensaio enzimático.

O ensaio enzimático está disponível para o diagnóstico de todas as MPS. A triagem qualitativa e quantitativa de GAGs na urina é muito útil para direcionar o ensaio enzimático, especialmente quando associada aos dados clínicos (Muenzer, 2004).

Em algumas doenças foi estabelecida para algumas mutações a correlação fenótipo-genótipo. Essa relação deve sempre ser avaliada com cuidado, pois outros fatores, como polimorfismos, devem ser levados em consideração (Vellodi, 2005). Além disso, o caráter recessivo das MPS aumenta sua heterogeneidade pois o heterozigoto composto converte-se em um composto genético (Saínez et al., 2002).

### **1.3.4 Tratamento**

Como todas as DL as MPS são mais bem tratadas em equipes multidisciplinares. As terapias que podem ser usadas incluem o Transplante de Medula Óssea (TMO) ou de Células Hematopoiéticas, Terapia de Reposição Enzimática (TRE) (já comercialmente disponível para MPS I e VI, e em fase final de desenvolvimento para MPS II), e perspectivas futuras para a Terapia Gênica (TG) (Muenzer, 2004).

#### *1.3.4.1 Transplante de Medula Óssea*

O TMO vem sendo realizado nas DL há mais de 20 anos, e já foi realizado em pelo menos 20 DL diferentes. Os resultados indicam vários níveis de melhora clínica, sendo rara e, se é que alguma vez ocorreu, a reversão total do fenótipo clínico (Vellodi, 2005).

O objetivo do TMO é reconstruir o sistema hematopoiético a partir de um doador saudável e compatível, proporcionando que as células transplantadas produzam no preceptor a enzima deficiente. O maior problema é a alta morbidade e mortalidade, a dificuldade de encontrar um doador compatível, a toxicidade do procedimento, a dificuldade de pega do transplante e um diagnóstico e tratamento precoce e prévio ao dano neurológico. De uma maneira geral, o TMO prolonga a vida e corrige algumas manifestações clínicas, mas não é uma cura e não impede progressão da lesão em todos os sistemas. A principal vantagem é que as células podem se integrar em diversos tecidos, incluindo sistema nervoso central. A principal desvantagem é o baixo nível de correção e tempo necessário para integração dessas células em outros tecidos (Wilcox, 2004).

#### *1.3.4.2 Terapia de Reposição Enzimática*

A TRE repõe a enzima ausente através de repetidas infusões intravenosas em que grandes doses de enzima podem ser administradas. A observação essencial para esta terapia é que apenas um pequeno aumento da atividade enzimática (1-5%) é suficiente para corrigir o acúmulo lisossomal. O primeiro tratamento com sucesso foi para a doença de Gaucher. Hoje está comercialmente disponível TRE para as MPS I e VI. Ensaio clínico para MPS II estão em fase final. Os resultados da TRE variam consideravelmente de doença para doença e são considerações importantes a idade de início, a velocidade de progressão e a presença ou não de envolvimento neurológico. Não há evidências que a enzima cruze a barreira hematoencefálica, apesar de dados mostrarem que a enzima administrada diretamente no cérebro é absorvida pelos neurônios. As limitações da TRE são: (1) incapacidade de transpor a barreira hematoencefálica; (2) a dificuldade de atingir tecidos específicos, como por exemplo, o osso; e (3) desenvolvimento de anticorpos contra a enzima exógena (Wilcox, 2004 e Vellodi, 2005).

### *1.3.4.3 Terapia Gênica*

A Terapia Gênica (TG) é a promessa de cura para várias doenças monogênicas, como as MPS, pelo potencial de instalação de uma fonte endógena de enzima através de uma cópia normal do gene específico. Apesar de alguns resultados promissores, muitas barreiras ainda existem para sua aplicabilidade clínica: expressão adequada e contínua do gene no tipo celular e/ou tecido necessário e segurança (Wilcox, 2004).

## **1.4 MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO IVA**

A Síndrome de Morquio é causada pela degradação deficiente de queratan sulfato. A deficiência de duas enzimas resulta num fenótipo com amplo espectro de manifestações clínicas: deficiência de N-acetilgalactosamina-6 sulfatase resultando na MPS IVA; e de  $\beta$ -galactosidase em MPS IVB (Neufeld e Muenzer, 2001). Ambas apresentam excreção de queratan sulfato na urina.

A MPS IVB (OMIM 253010) foi inicialmente considerada como uma forma leve da Síndrome de Morquio porque nos primeiros pacientes descritos a progressão das displasias ósseas e a deficiência de crescimento eram menos proeminentes. No entanto, registros posteriores descreveram pacientes com MPS IVB cuja condição clínica era tão severa quanto a MPS IVA (Neufeld e Muenzer, 2001).

Os resíduos de galactose do queratan sulfato são removidos pela  $\beta$ -galactosidase. A enzima normal hidrolisa os resíduos encontrados também em gangliosídeo GM1, glicoproteínas, além de oligossacarídeos, como o queratan sulfato. A ausência total da atividade desta enzima resulta em outra DL, a Gangliosidose GM1, enquanto que a MPS IVB resulta de mutações que seletivamente prejudicam a atividade catalítica em relação ao queratan sulfato. Portanto, a enzima é afetada de tal forma a prevenir a degradação do queratan sulfato sem inibir a degradação de gangliosídios GM1, o que acarretaria na Gangliosidose GM1 (Neufeld e Muenzer, 2001). A Síndrome de Morquio B não é o objetivo do presente trabalho.

A Síndrome de Morquio A ou MPS IVA (OMIM 253000) é caracterizada pelo acúmulo e excreção de queratan sulfato e condroitin sulfato devido à deficiência da enzima

lisossomal N-acetilgalactosamina-6 sulfato sulfatase ou Galactose-6-sulfatase (GALNS, E.C.3.1.6.4). É herdada de forma autossômica recessiva como a maioria das MPS.

#### **1.4.1 Histórico**

A patologia foi descrita simultânea e independentemente por Morquio (1929) em Montevideu, Uruguai, e por Brailsford (1929) em Birmingham, Inglaterra. As primeiras observações incluíram opacidade de córnea, doença da válvula cardíaca e excreção urinária de queratan sulfato. Entre 1929 e 1959 várias deformidades ósseas foram incluídas na descrição do fenótipo. Em 1978, DiFerrante et al. demonstrou o defeito enzimático. Em 1991, Tomatsu et al. clonou e seqüenciou todo o cDNA da GALNS placentária. Nakashima et al. em 1994 demonstrou que o gene apresentava 14 exons.

#### **1.4.2 Dados Epidemiológicos**

A MPS IV é uma doença rara, e dados epidemiológicos precisos são escassos. A incidência varia, está estimada entre 1:40.000 e 1:50.000 nascidos vivos (Northover et al., 1996); 1/216.000 em British Columbia segundo Lowry et al. (1990); e 1/76.000 na Irlanda do Norte segundo Nelson et al. (1997) (Neufeld e Muenzer, 2001). Outros dados de incidência 1: 450.000 nascidos vivos na Holanda (Poorthuis et al., 1999), 1: 201.000 na Austrália (Meikle et al., 1999), 1:640.000 nascidos vivos no oeste da Austrália (Nelson et al., 2003) e 1:45.000 em Portugal (Pinto et al., 2004). A discrepância na incidência entre populações de diferentes etnias reflete parcialmente o efeito fundador (Tomatsu et al., 2005).

A MPS IVA foi detectada em 20 pacientes dos 10.000 analisados de um centro de referência em Porto Alegre (Coelho et al., 1997). Este valor correspondeu a 10,6% das MPS, 5,2% das DL e 3,1% dos EIM diagnosticados. Esses dados estão de acordo com os de um estudo epidemiológico para determinar a prevalência de DL na população da Austrália (Meikle et al., 1999) onde foi encontrada para a MPS IVA uma frequência estimada de 13,3% entre as MPS e de 4,6% entre as DL diagnosticadas.

### 1.4.3 Aspectos Clínicos

Os aspectos clínicos predominantes são aqueles relacionados com o sistema ósseo e seus efeitos sobre o sistema nervoso central. Os pacientes com MPS IVA podem ser usualmente distinguidos de pacientes com outras MPS pela inteligência preservada e manifestações ósseas características (Northover et al., 1996).

O substrato acumulado na MPS IVA é o queratan sulfato, importante componente da córnea e das cartilagens. Por isso observamos as manifestações de opacidade de córnea e alterações esqueléticas características da Síndrome de Morquio. As manifestações clínicas são evidentes a partir dos 2 a 3 anos, destacando-se a ausência de déficit cognitivo nesta patologia (Santana, 2004).

A grande maioria dos pacientes apresenta a forma grave clássica da doença, com um número menor de casos com as formas leve e moderada. Não há diferença quanto à gravidade em relação ao gênero. Fenotipicamente muito heterogênea, é caracterizada clinicamente por displasia esquelética grave de todos os ossos e articulações que leva à baixa estatura (altura adulta em torno de 100 cm) e com preservação da inteligência. Além disso, o tecido conjuntivo da córnea, vias aéreas e válvulas cardíacas também são afetados no curso da doença (Northover et al., 1996).

Estudos convencionaram que pacientes com a forma leve são aqueles com altura adulta final acima de 125 cm; e, com a forma grave, aqueles com altura inferior a 125 cm (o que corresponde a 9 desvios padrões abaixo da altura adulta média normal) (Tomatsu et al., 2004f), além de outros critérios previamente descritos (Tomatsu 1997 e 2005b). A terapia com hormônio de crescimento não tem justificativa uma vez que o sistema endócrino destes pacientes é normal.

Embora as anormalidades radiológicas já estejam presentes ao nascimento, o diagnóstico dificilmente é feito no primeiro ano de vida apesar da forma anormal do peito (peito de pomba) e da cifose espinhal. Os sinais e sintomas iniciais na maioria dos pacientes são notados na idade de três anos, sendo que a maioria é avaliada entre dois e três anos de vida por características ósseas anormais (Tomatsu et al, 2005b).

O processo odontóide é hipoplásico em todos os pacientes com MPS IVA. Isto, combinado com a frouxidão dos ligamentos, característica comum do tecido conjuntivo desses pacientes, e com o depósito dos GAGs, são os responsáveis pela alta incidência de subluxação atlantoaxial dos pacientes afetados. Esta característica, juntamente com outros

fatores, pode levar à compressão da medula espinhal, mielopatia cervical ou até mesmo a morte. Anormalidades neurológicas podem aparecer abruptamente, com colapso seguido de hemiplegia ou outra alteração neurológica transitória ou permanente (Northover et al., 1996 e Tomatsu et al., 2005b).

Apesar dos problemas cervicais dominarem o manejo clínico, outras alterações ósseas também ocorrem. Deslocamento de quadril é comum, e a postura típica da criança afetada é com flexão do quadril e joelhos com *genu valgum* e pés planos. Com a idade, dores nas grandes articulações são comuns com altos estalidos. A frouxidão dos ligamentos, além de responsável pela postura, também acarreta problemas na função das mãos. O punho e os dedos são extremamente frouxos resultando em dificuldade para atividades como higiene pessoal e escrita (Northover et al, 1996).

Assim como nas outras MPS, problemas urinários, auditivos, obstrução das vias aéreas superiores e apnéia noturna são comuns. As anormalidades cardíacas mais frequentes são o espessamento médio da válvula mitral e aórtica. Quanto aos aspectos oftalmológicos a anormalidade mais característica nos pacientes com Síndrome de Morquio A é opacidade da córnea e fotofobia. Em relação aos aspectos odontológicos apresentam dentes amplamente espaçados, com fina camada de esmalte, cúspides pontiagudas nos dentes permanentes e normalmente menores. Eles são mais susceptíveis a desenvolver cárie dental e necessitam um programa preventivo regular (Northover et al, 1996 e Tomatsu et al., 2005b).

Pacientes com a forma grave, principalmente relacionada com instabilidade cervical e compressão pulmonar, geralmente não sobrevivem após a segunda ou terceira década de vida. Já os pacientes com fenótipo moderado têm sido relatados a sobreviverem até os setenta anos (Tomatsu et al., 2005b). Existem relatos de gestações com sucesso e, tanto mulheres quanto homens afetados, são férteis.

Em um estudo sobre a história natural da doença, conduzido pela *The International Morquio Organization*, foram coletados dados através de um questionário. No total foram 258 questionários respondidos em mais de 25 países, número estimado como sendo 20% do total de pacientes com MPS IVA nestes países. Os resultados mostraram uma distribuição de gênero correspondendo a 47% de homens e 53% de mulheres. A média de idade de diagnóstico foi de 4,2 anos e a idade atual varia de 1 a 73 anos com média de 16,3 anos. A idade média de início dos sinais e sintomas foi de 2,2 anos. A altura final aos 13 anos foi 7,8 desvios padrões abaixo da média, sendo a média final de 114,6 cm para as mulheres e 117,5 cm para os homens. O peso aos 13 anos estava 3,3 desvios padrões abaixo da média. Tanto altura quanto peso ao nascimento estavam compatíveis com a média. Os sintomas iniciais

mais importantes foram deformidades ósseas, baixa estatura, cifose ou escoliose e marcha anormal presente em 50% dos pacientes. Os sintomas mais prevalentes incluem baixa estatura e deformidade óssea em 90% dos pacientes. Inteligência normal ou excelente foram registradas também em 90% dos casos. Oitenta por cento dos pacientes conseguem caminhar menos do que 200 m e 70% já sofreram cirurgias. A média de idade dos pacientes que sofreram cirurgia foi de 19,2 anos contra 10,2 anos dos pacientes que não apresentam história de cirurgia (Tomatsu, 2004b).

#### **1.4.4 Diagnóstico**

O diagnóstico é sugerido pelas observações clínicas e radiográficas que revelam a displasia esquelética, que é diferente da disostose múltipla comum a outras MPS. Excreção urinária de queratan sulfato é um indicativo que deve ser confirmado com o ensaio enzimático em sangue periférico ou em fibroblastos. O diagnóstico pré-natal é possível a partir do primeiro trimestre de gestação por ensaio enzimático em vilosidades coriônicas. Além disso, se as mutações forem conhecidas também é possível realizar teste molecular (Northover et al, 1996).

Um novo ensaio de ELISA com um anticorpo monoclonal específico para queratan sulfato demonstrou que os níveis em sangue e urina variam com a idade e gravidade clínica, indicando que este teste pode ser útil para diagnóstico precoce e avaliação longitudinal da severidade da doença em pacientes com MPS IVA (Tomatsu et al., 2004a e 2004e).

O nível sanguíneo de queratan sulfato nos pacientes afetados foi 2-8 vezes maior do que em controles pareados por idade. Foi visto que a concentração de queratan sulfato varia com a idade e a gravidade da doença, sendo o pico entre 5 e 10 anos de idade. Esse pico vale tanto para os afetados quanto para os controles normais. Os níveis sanguíneos em pacientes graves foi 1,5 vezes maior do que pacientes com a forma moderada. Por outro lado os níveis na urina atingem o pico entre 1 e 5 anos e depois declinam com a idade. O nível na urina também varia com a idade e a gravidade do caso, o fenótipo grave apresentou 6,7 vezes mais excreção de queratan do que o fenótipo moderado. Esses achados sugerem que a concentração de queratan sulfato na urina e sangue é um biomarcador potencial para a gravidade da doença (Tomatsu et al., 2004c).

### 1.4.5 Aspectos Bioquímicos

A enzima é sintetizada em uma forma precursora de 522 aminoácidos. Após o corte do peptídeo sinal de 21 aminoácidos N-terminal e glicosilação, a enzima torna-se madura e ativa com duas subunidades de 40 e 15 kDa (Masue et al., 1991; Tomatsu et al., 1991).

Todas as mutações correlacionadas com fenótipo severo apresentaram menos de 1% de atividade residual da enzima, enquanto que o fenótipo moderado apresenta atividade residual maior (2,2 – 17,4% do controle normal), indicando uma boa correlação entre o nível de expressão da enzima e o fenótipo clínico. O ponto de corte para a enzima entre fenótipos graves e moderados em análises de expressão com mutagênese *in vitro* poderia ser 1%, apesar de algumas exceções existirem (Tomatsu et. al., 2005b).

A GALNS é uma enzima que pertence à família das sulfatases, das quais 13 genes humanos foram clonados. Todos os produtos dos genes das sulfatases são proximamente relacionados, mostrando 20-35% de similaridade ao nível dos aminoácidos. O resíduo C79 da GALNS humana é conservado entre todas as sulfatases de várias espécies. As modificações pós-traducionais do resíduo de cisteína altamente conservado são necessárias para a ativação catalítica das sulfatases. A caracterização dessas proteínas por análises estruturais e a comparação das homologias confirmaram C79 como o sítio ativo (Sukegawa et. al., 2000 e Tomatsu et al., 2005b).

O modelo da estrutura terciária da GALNS (Figura 2) indica que pelo menos três tipos de alterações levam a um fenótipo severo: destruição do núcleo hidrofóbico ou modificação do empacotamento; remoção da ponte iônica com desestabilização da conformação; e modificações no sítio ativo (Sukegawa et. al., 2000).

### 1.4.6 Aspectos Moleculares

O cDNA foi clonado e seqüenciado em 1991 revelando uma região codificante com 1566 nucleotídeos, que codifica uma proteína de 522 aminoácidos. O gene contém 14 exons e foi mapeado no braço longo do cromossomo 16, em 16q24.3 (Baker et al., 1993 e Neufeld e Muenzer, 2001).



Figura 2 - Modelo da estrutura terciária da enzima GALNS. O resíduo C79, no sítio ativo, é representado pela esfera vermelha. O domínio N-terminal está na arte superior e o domínio C-terminal menor na parte inferior (Sukegawa et. al., 2000).

As mutações estão distribuídas ao longo de todo o gene e podem ser de vários tipos. As mutações com sentido trocado são as mais freqüentemente descritas no gene da GALNS. Já foram descritas cerca de 100 mutações e a grande maioria são mutações de uma única base ou pequenas deleções. Grandes deleções detectadas por *Southern blot* foram descritas em poucos pacientes. Quase todas as mutações são restritas a determinados grupos com poucas mutações recorrentes (Neufeld e Muenzer, 2001). Em recente estudo publicado por Tomatsu (2005b) sobre o espectro das mutações e polimorfismos no gene da GALNS as três mutações mais freqüentes (2% do total das mutações e 21,4% dos alelos) foram representadas por mutações com sentido trocado (p.R386C, p.G310C e p.I113F). As dez mais freqüentes correspondem a 35,3% de todas as mutações descritas. Cerca de 46% das mutações ocorreram menos de três vezes na população total dos estudos avaliados, o que sugere uma marcante heterogeneidade molecular nas mutações da GALNS.

No estudo de Tomatsu et al. (2005b) foram relacionadas 148 mutações, incluindo 26 novas, em um total de 227 pacientes. Além disso, dezesseis polimorfismos também foram identificados. Os polimorfismos foram usados para análise de haplótipos para entender a origem das mutações. Dos alelos mutantes analisados, 78,4% das mutações eram com sentido trocado, 9,2% pequenas deleções, 5,0% sem sentido, 2,4% grandes deleções e 1,6% inserções.

#### **1.4.7 Tratamento**

Pela natureza das dificuldades físicas é necessária uma abordagem multidisciplinar com sub-especialidades pediátricas como, por exemplo, neurocirurgião, ortopedista, cardiologista, etc.

No manejo da MPS IVA um dos aspectos mais complexos é a decisão em relação à fusão cervical para evitar a luxação desta região. Alguns autores propõem que seja feita de forma profilática antes que os pacientes apresentem sinais de mielopatia cervical compressiva. Sem dúvida a existência de riscos anestésicos nos pacientes com MPS leva a postergar esta indicação. As complicações cirúrgicas podem se apresentar como consequência da hiperextensão cervical no momento da intubação, pela obstrução da via aérea superior ou ainda por complicações cardíacas (Santana, 2004).

Os pacientes que são heterozigotos compostos manifestam clinicamente sintomas mais moderados do que pacientes em homozigose para mutações graves, o que sugere que uma pequena percentagem de atividade normal da GALNS pode proteger contra o fenótipo severo. Alguns relatos de transplante de medula óssea, no entanto, não levaram a melhoras nas alterações esqueléticas, não sendo recomendado para esta patologia (Northoover et al., 1996).

A patogênese da displasia óssea, principal manifestação clínica, é desconhecida, mas se acredita que o acúmulo de queratan sulfato possa ser tóxico para os osteoblastos. O QS, o qual contribui com mais de 25% dos GAGs na cartilagem de adultos, é um dos mais importantes componentes do osso. Os produtos degradados do QS se difundem através da matriz da cartilagem e na MPS IVA os resíduos não degradados se acumulam principalmente nos condrócitos (Tomatsu et al., 2004a).

A Terapia de Reposição Enzimática se encontra em fase preliminar de desenvolvimento e a Terapia Gênica ainda está muito no início das pesquisas. O grande desafio para ambas é direcionar a enzima para atuar no sistema ósseo e viabilizar a correção

do defeito nesse tecido que não tem muita plasticidade e atividade de regeneração. Assim a Terapia de reposição Enzimática e/ou a Terapia Gênica podem ser tratamentos potenciais para a MPS IVA (Tomatsu et. al, 2005a).

Trabalhos iniciais de um sistema de direcionamento para o tecido ósseo estão em desenvolvimento. O tratamento atual tem pouco impacto sobre as deformidades ósseas dos pacientes com Morquio A. A idéia é modificar a enzima para ser direcionada ao osso mais especificamente, visando a aumentar a efetividade da mesma. Um trabalho desenvolvido por Tomatsu et al., (2005a) teve por objetivo comparar a eficiência do direcionamento da GALNS ao osso entre a enzima com direcionamento ou sem, e verificar melhoras na patologia óssea usando TRE em modelo murino. Os resultados mostraram que a enzima com direcionamento teve 5-10 vezes maior permanência no sangue, permaneceu por mais tempo no osso e na medula óssea, mantendo atividade enzimática três vezes maior no osso em 24 horas quando comparada com a enzima convencional. Os achados patológicos mostraram maior diminuição do substrato acumulado em osso e córnea nos animais tratados com a enzima direcionada. Os resultados pré-clínicos desta pesquisa em modelo murino de MPS IVA indicam o potencial dessa estratégia de direcionamento ósseo.

## **2 JUSTIFICATIVA**

O Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SGM-HCPA) é um centro de referência para doenças genéticas no país e fora dele, especialmente para as MPS. Em relação aos pacientes com MPS IVA existe uma escassez de estudos moleculares na população da América Latina e ausência total de estudos em pacientes brasileiros. Estes estudos possibilitam identificar critérios preditivos para relação genótipo-fenótipo. Também criam a possibilidade de oferecer mais um tipo de informação aos pacientes, a qual pode ser importante para o diagnóstico pré-natal de novas gestações na família e quem sabe influenciar em terapias futuras para esta patologia.

### **3 OBJETIVOS**

3.1 Objetivo Geral: Identificar as mutações presentes no gene da GALNS em pacientes brasileiros com diagnóstico bioquímico para a MPS IVA

3.2 Objetivos secundários:

3.2.1 Verificar se as mutações novas encontradas nesses pacientes são causadoras do fenótipo patológico.

3.2.2 Padronizar as técnicas de PCR e SSCP para análise do gene da GALNS nas nossas condições laboratoriais.

## 4 PACIENTES E MÉTODOS

### 4.1 AMOSTRA ESTUDADA

Inicialmente foram analisados seis pacientes brasileiros com a Síndrome de Morquio A diagnosticados no Serviço de Genética Médica (SGM) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Este Serviço é um centro de referência para o diagnóstico de Erros Inatos do Metabolismo no Brasil e na América Latina. Estes pacientes não apresentam nenhuma relação de parentesco nem consangüinidade entre si. Um sétimo paciente, irmão de um deles, também teve seu DNA analisado.

O diagnóstico laboratorial de MPS IVA foi feito de acordo com a rotina apresentada na Figura 3.

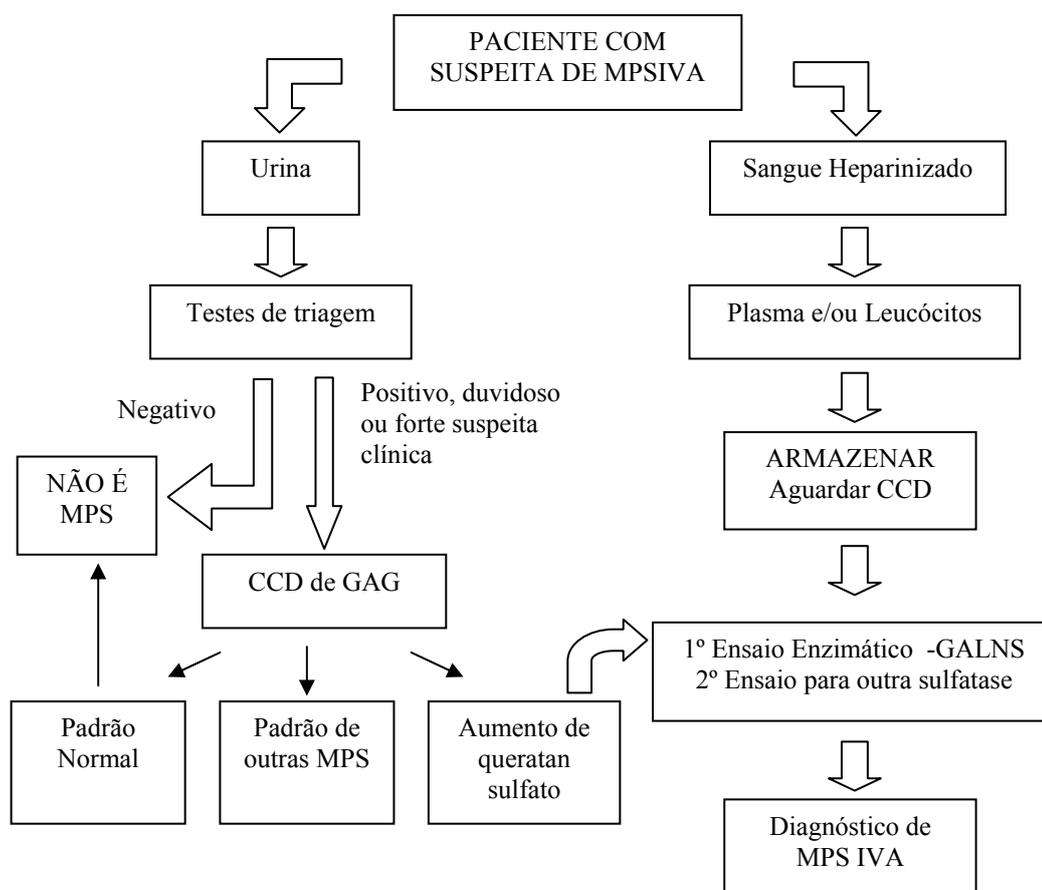


Figura 3 - Rotina para diagnóstico laboratorial de MPS IVA. Adaptado de Leistner e Giugliani, 1997.  
(CCD) cromatografia em camada delgada; (GAGs) glicosaminoglicanos.

Todos os pacientes obtiveram confirmação bioquímica através de ensaio enzimático fluorimétrico (Van Diggelen et. al., 1990) para a MPS IVA realizada no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do SGM.

Um grupo de amostras de controles normais foi usada para a confirmação do aspecto patogênico das mutações novas pelo método de análise de frequência. Esse material está disponível no Serviço de Genética Médica e já foi utilizado em outros projetos de pesquisa.

Numa segunda fase do estudo a amostra foi ampliada para novos pacientes diagnosticados. Mas, para estes, apenas foram testados os exons nos quais os casos iniciais apresentaram mutações.

## **4.2 MÉTODOS**

### **4.2.1 Extração de DNA**

As amostras de DNA foram obtidas através de alíquotas de sangue periférico coletadas com EDTA. O método de extração do DNA foi o de precipitação por sais adaptado de Miller et al. (1988). Essas amostras foram armazenadas em freezer à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **4.2.2 Casos-Índice: Amplificação e Seqüenciamento direto**

As amostras de DNA foram amplificadas usando os primers e as condições de PCR descritas anteriormente (Ogawa et al., 1995). Os produtos das reações de PCR foram analisados molecularmente por seqüenciamento direto dos 14 exons do gene da GALNS. Essas análises foram realizadas na Universidade de Saint Louis, Estado de Missouri, nos Estados Unidos da América, em colaboração com o Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

O processamento por PCR foi realizado pela própria autora, e os seqüenciamentos em um serviço dentro da própria Instituição com o sequenciador ABI-377. A técnica usada foi de seqüenciamento por fluorescência automatizado. Nesta técnica, corantes fluorescentes

específicos são incorporados nos produtos de PCR durante a extensão do DNA. O equipamento detecta a fluorescência emitida pelos quatro corantes diferentes usados para identificar as diferentes bases do DNA: adenina (A), timina (T), citosina (C) e guanina (G). Cada um deles emite luz com um comprimento de onda diferente quando excitados por um laser de argônio e são detectados por injeção capilar em gel dentro do equipamento.

#### 4.2.3 Amplificação do DNA pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para a confirmação do aspecto patogênico das mutações novas encontradas nestes seis pacientes, 100 controles anônimos foram analisados para cada mutação. Esses controles são doadores do Banco de Sangue do HCPA, dos quais já havia o material disponível no Serviço de Genética Médica. Outros pacientes com MPS IVA diagnosticados posteriormente também seguiram a mesma seqüência de análise, descrita nos próximos itens.

Primers para amplificação dos exons que apresentaram as mutações novas foram desenhados e confeccionados. A Tabela 2 mostra a seqüência de cada primer, a temperatura de anelamento esperada e o tamanho do fragmento amplificado.

Tabela 2 - Primers para amplificação dos exons 4, 5, 9 e 10 da GALNS, temperatura de anelamento e tamanho do produto.

<b>Exon</b>	<b>Seqüência dos primers (iniciadores)</b>	<b>Temperatura de anelamento (°C)</b>	<b>Tamanho do produto (pares de base)</b>
4f	GCTTCTCGGGGTCTCCTCG	61	193
4r	GTGGATGGAGCAGGACGCC		
5f	GTGGGGTCCCTGAAGTGTC	60	212
5r	CGTGGGAGGGGAAGGGG		
9f	CTGGTCCCAGTGGCCTGAC	61	176
9r	CTGCTGCCCCGGCAGACCG		
10f	CAGAGTGCCCTGACCGTG	57	231
10r	GCTCTGGGCTTCACTACTTG		

As reações de amplificação foram realizadas de acordo com o protocolo listado a seguir, em um volume final de reação de 50 µl. No entanto, as reações de PCR para o exon 5 tiveram acréscimo de 5,6% de DMSO.

PCR Buffer (tampão)	1X
dNTPs	0,2 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
Primer direto (forward)	20 pmoles
Primer reverso (reverse)	20 pmoles
Taq DNA polimerase	1 U
DNA	100 ng
Água de injeção	q.s.p. 50µl

As reações de PCR foram realizadas em Termociclador Eppendorf Personal e as condições de amplificação iniciaram com uma desnaturação de 5 minutos a 94°C, seguida de 30 ciclos de 30 segundos à 94°C, 30 segundos na temperatura de anelamento de cada exon (Tabela 2) e 45 segundos a 72°C de extensão, seguido de extensão final a 72°C por dez minutos. Em todas as reações um controle negativo sem DNA foi usado para monitorar a presença de contaminação.

#### **4.2.4 Análise dos produtos amplificados em gel de agarose**

Os produtos de PCR (5µl de cada produto de PCR com 2µl de corante xileno cianol) foram corridos em um gel de agarose a 1,5% com Brometo de Etídio em tampão de TBE 1X por 30 minutos a 90V para verificação da amplificação e ausência de contaminação. As bandas foram comparadas ao padrão de peso molecular 50 pb DNA ladder (Gibco-BRL). Os géis foram diretamente observados em luz ultravioleta.

#### 4.2.5 Análise por SSCP (*Single Strand Conformation Polymorfism*)

A triagem dos produtos de PCR dos controles e novos pacientes foi realizada pela técnica de SSCP em gel de poliacrilamida não desnaturante. Os PCR dos pacientes sabidamente mutantes para cada exon eram colocados junto com os controles normais para que, se houvesse alguma alteração, esta pudesse ser evidenciada. Oito µl do produto de PCR juntamente com 4 µl de corante para SSCP (95% formamida, 20mM EDTA, 0,005% bromofenol azul, 0,05% xileno cianol) eram misturados e aquecidos à 94°C por 5 minutos e imediatamente resfriados em gelo para promover a desnaturação. Essas amostras eram então aplicadas em um gel de poliacrilamida em uma cuba de eletroforese vertical, com tampão de TBE 1X. As condições de voltagem, tempo e temperatura estão resumidas na Tabela 3 para cada exon estudado. Para desencadear a polimerização do gel, além do TBE e da poliacrilamida, adicionávamos APS e TEMED (com concentração final no gel de 0,1%). Em cada gel, além das amostras, sempre era colocado o padrão da mutação a qual se estava testando.

Tabela 3 - Concentração e condições de corrida do gel de poliacrilamida na técnica de SSCP para cada exon

<b>EXON</b>	<b>Concentração do gel (%)</b>	<b>Voltagem (V)</b>	<b>Tempo de corrida (horas)</b>	<b>Temperatura</b>
4	12	230	2	TA
5	12	200	3,5	4°C
9	12	50	15	4°C
10	8	250	2	TA

(TA) temperatura ambiente.

As bandas de DNA nos géis de SSCP eram visualizadas corando-se o gel com nitrato de prata (Orita et al., 1989). Posteriormente o gel era depositado sobre uma folha de papel filtro e seco sob vácuo por 30 minutos a 70°C. Os fragmentos com padrão diferenciado eram reamplificados, purificados e enviados para seqüenciamento.

#### 4.2.6 Processamento de amostras com padrão alterado no SSCP

Os controles e pacientes amplificados que apresentaram padrão diferenciado nos géis de SSCP foram processados para serem seqüenciados. Uma nova reação de PCR foi realizada e confirmada em gel de agarose 1,5% com o corante xileno cianol (5 µl de PCR com 2 µl do corante). O gel era submetido a uma corrente de 95V por 30 minutos em tampão de TBE 1X.

Em seguida este produto de PCR era purificado com o uso do kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* da Amersham Biosciences de acordo com as instruções do fabricante. O PCR purificado, em um volume final de 35 µl, era novamente corrido em um gel de agarose a 1,5% para verificarmos a intensidade da banda e decidirmos sobre a quantidade necessária para a reação de seqüenciamento.

O material era submetido a uma reação de seqüenciamento em Termociclador Eppendorf Personal com 1 µl de tampão, 2 µl de Big Dye, 1 µl de primer diluído e 6 µl de PCR e água com a proporção sendo dependente da intensidade da banda do PCR purificado. O programa é constituído de 24 ciclos na seguinte ordem: 96°C por 30 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por quatro minutos.

Esta reação era, então, precipitada de acordo com protocolo a seguir. Aos 10 µl da reação foram adicionados 90 µl de água de injeção, 10 µl de acetato de sódio 3M com pH 5,2 e 250 µl de etanol absoluto. O eppendorf foi agitado no vortex por alguns segundos e colocado no freezer a -80°C por 30 minutos. Após este tempo as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 4°C em 10.000 rpm usando a Centrífuga Eppendorf 5810R. O sobrenadante foi descartado imediatamente, o pelet lavado com 250 µl de etanol 75% e submetido a novo ciclo de centrifugação a 4°C em 10.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi novamente desprezado e os eppendorfs invertidos sobre um papel absorvente, longe da luz, por aproximadamente 30 minutos até que o tubo estivesse seco. Estas amostras precipitadas foram assim mantidas até o momento do seqüenciamento quando foram então ressuspensas em 12 µl de TSR (*Template Suppression Reagent*). As amostras foram corridas em um seqüenciador ABI 310.

#### **4.2.7 Aspectos Éticos**

Um aspecto ético relevante é a possibilidade de se encontrar uma ou mais das mutações dos casos nos controles, devendo ser considerada duas situações. Primeiramente, uma das mutações é encontrada em apenas um indivíduo, como heterozigoto. Neste caso, esta mutação pode ser considerada como causadora da doença e este indivíduo está, teoricamente, em risco de ter um filho afetado, Este risco, entretanto, é muito baixo, dada a baixa incidência da doença (1:40.000) e não é alterado significativamente pela descoberta de heterozigosidade, já que a doença é recessiva. Desta forma, consideramos que este estudo pode ser feito em amostras não identificadas (anônimas), já que não haverá um benefício na eventual descoberta de um heterozigoto.

A outra possibilidade é que uma das mutações seja encontrada em vários indivíduos ou em um indivíduo em homozigose. Como não se espera que as pessoas com mucopolissacaridose sejam doadoras de sangue (devido às limitações físicas impostas pela doença), considerar-se-á que essas mutações não são causadoras da doença nos pacientes analisados e sim variações normais da seqüência gênica. Neste caso, não há, novamente, nenhuma repercussão para o portador dessas mutações, que são consideradas não patogênicas.

Este trabalho foi aprovado no Comitê de Ética do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre sob o número 02-302.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

#### 5.1.1 Amostra estudada

Entre os casos-índice, cinco (71,4%) eram do gênero masculino e dois (28,6%) do feminino, entre eles dois irmãos afetados (pacientes E1 e E2). A idade média dessas crianças foi de 11,14 anos com desvio padrão de 3,44 e variando entre 6 e 15 anos. Quanto à origem quatro eram do Rio Grande do Sul, um de Santa Catarina, e os dois irmãos da Bahia. Todos apresentaram seus sintomas iniciais antes dos três anos de idade e havia dois casos de consangüinidade entre os pais. Os dados de cada paciente encontram-se descritos na Tabela 4.

Tabela 4 - Sumário dos dados de anamnese e clínicos dos casos-índice

<b>Paciente</b>	<b>Gênero</b>	<b>Origem (Estado)</b>	<b>Consangüíneo</b>	<b>IIS (meses)</b>	<b>IUA</b>	<b>Altura (cm)</b>	<b>LS</b>
A	F	SC	Não	<6	13a	dnd	dnd
B	F	RS	Não	36	16a1m	104	Sim
C	M	RS	Sim	24	11a5m	113	Não
D	M	RS	Não	36	15a6m	103	Sim
E1	M	BA	Não	<6	2a	82,5	Sim
E2	M	BA	Não	18	6a	97	Sim
F	M	RS	Sim	12	7a8m	99,5	Sim

(F) feminino; (M) masculino; (SC) Santa Catarina; (RS) Rio Grande do Sul; (BA), Bahia; (IIS) idade de início dos sintomas; (IUA) idade na última avaliação; (a) anos; (m) meses; (dnd) dado não disponível; (LS) se locomove sozinho.

Oito pacientes posteriormente diagnosticados foram incluídos nas análises. Desses quatro (50%) eram meninos e quatro (50%) meninas, sendo que duas das meninas eram irmãs

(pacientes K1 e K2). A média para a idade foi de 11,00 anos com desvio padrão de 5,19. Esses valores foram calculados levando em conta os pacientes com dados disponíveis. Outros dados estão resumidos na Tabela 5.

Tabela 5 - Sumário dos dados de anamnese e clínicos dos novos casos

<b>Paciente</b>	<b>Gênero</b>	<b>Origem (Estado)</b>	<b>Consangüíneo</b>	<b>IIS (meses)</b>	<b>IUA</b>	<b>Altura (cm)</b>	<b>LS</b>
G	M	RS	Não	12	10a2m	105	Não
H	F	dnd	dnd	dnd	dnd	dnd	Sim
I	M	CH	dnd	dnd	dnd	dnd	dnd
J	F	MG	Sim	<6	9a10m	107	Sim
K1	F	PE	Sim	12	6a5m	97,5	Sim
K2	F	PE	Sim	12	7a7m	100	Sim
L	M	AL	Não	48	11a	103	Sim
M	M	RS	Sim	24	21a	dnd	Não

(F) feminino; (M) masculino; (RS) Rio Grande do Sul; (CH), Chile; (MG) Minas gerais; (PE) Pernambuco; (AL) Alagoas; (IIS) idade de início dos sintomas; (IUA) idade na última avaliação; (a) anos; (m) meses; (dnd) dado não disponível; (LS) se locomove sozinho.

Analisando conjuntamente os 15 pacientes em relação à distribuição de gênero houve entre nossos pacientes um leve predomínio do sexo masculino (60%) sendo calculada uma diferença estatisticamente significativa em Teste Binomial para uma proporção ( $p < 0,05$ ). Em relação à idade a média conjunta foi de  $10,6 \pm 5,0$  anos (2 a 21 anos) e idade de início dos sintomas de  $19,3 \pm 13,4$  meses (<6 a 48 meses).

## 5.2 ANÁLISE DAS MUTAÇÕES

### 5.2.1 Mutações dos casos-índice

Considerando a consanguinidade dos pacientes analisaremos as frequências em relação a 10 alelos, uma vez que esses pacientes só apresentam uma alteração em homozigose. Entre eles foram identificadas alterações em nove deles (90,0% dos alelos). No total seis mutações

distintas foram encontradas das quais quatro eram mutações novas, responsáveis por 70,0% dos alelos identificados (Tabela 6). Algumas dessas foram observadas em mais de um paciente sem laços familiares, tornando de grande importância esta determinação, pois indicaria a existência de mutações comuns à população brasileira, facilitando o diagnóstico molecular futuro de novos pacientes. Esses dados foram publicados com nossa co-participação (Tomatsu 2004e) e estão no Anexo 1 desta dissertação (pacientes 16 à 20).

Tabela 6 - Mutações encontradas nos casos iniciais

Pacientes	Exon				
	4	5	9	10	11
A	p.G139S Het	p.N164T* Het			
B					p.R386C Het
C <sup>+</sup>		p.N164T* Hom			
D	p.G116S* Hom				
E			p.L307P* Het	p.S341R* Het	
F <sup>+</sup>	p.G116S* Hom				

(<sup>+</sup>) consangüinidade; (\*) mutações novas; (Het) heterozigoto; (Hom) homozigoto.

A Tabela 7 especifica para cada mutação as alterações que ocorrem ao nível do DNA em relação à base, ao códon e ao aminoácido. Os seqüenciamentos evidenciando cada uma das novas mutações estão representados pelos eletroferogramas das Figuras 4 a 7.

Tabela 7 - Alteração na base, códon e aminoácido para cada mutação dos casos-índice.

Mutação	Exon	Substituição de base	Alteração no códon	Alteração do aminoácido
p.G116S	4	445G → A	GGC → AGC	glicina → serina
p.G139S	4	514G → A	GGC → AGC	glicina → serina
p.N164T	5	590A → C	AAC → ACC	aspargina → treonina
p.L307P	9	1019T → C	CTG → CCG	leucina → prolina
p.S341R	10	1122C → A	AGC → AGA	serina → arginina
p.R386C	11	1255C → T	CGT → TGT	arginina → cisteína

Numeração de acordo com NM\_000512.3.

(A) adenina; (T) timina; (C) citosina; (G) guanina

Além dessas mutações dois polimorfismos previamente descritos foram encontrados nos pacientes E1 e E2: L67M e T200M.

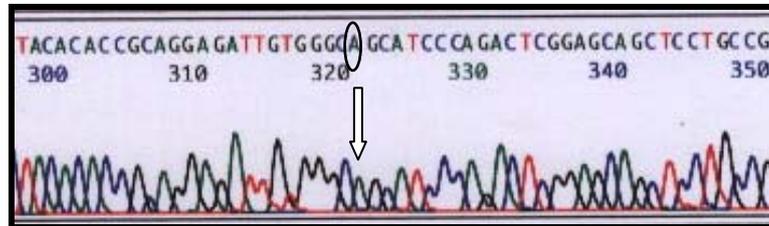


Figura 4 - Eletroferograma do seqüenciamento realizado com primer direto evidenciando a mutação p.G116S em homozigose.

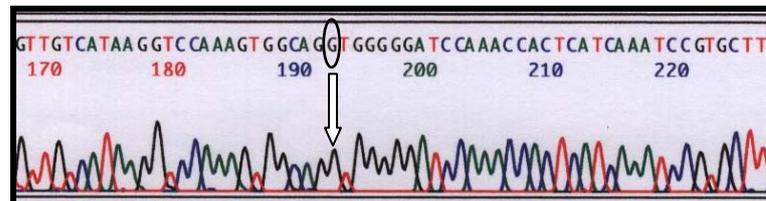


Figura 5 - Eletroferograma do seqüenciamento evidenciando a mutação p.N164T em homozigose realizado com primer reverso.

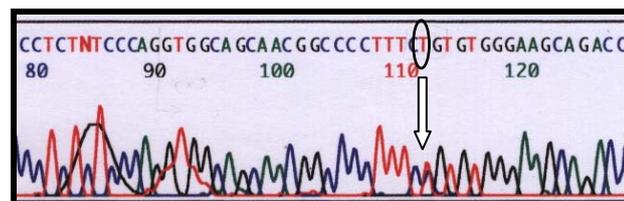


Figura 6 - Eletroferograma evidenciando a mutação p.L307P em heterozigose com primer direto.

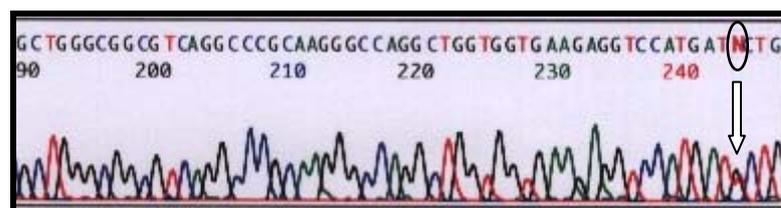


Figura 7 - Eletroferograma evidenciando a mutação p.S341R em heterozigose realizado com primer reverso.

### 5.2.2 Amplificação por PCR e Análise por SSCP

A amplificação dos fragmentos de cada exon foi conferida em gel de agarose a 1,5% e está representada na Figura 8.

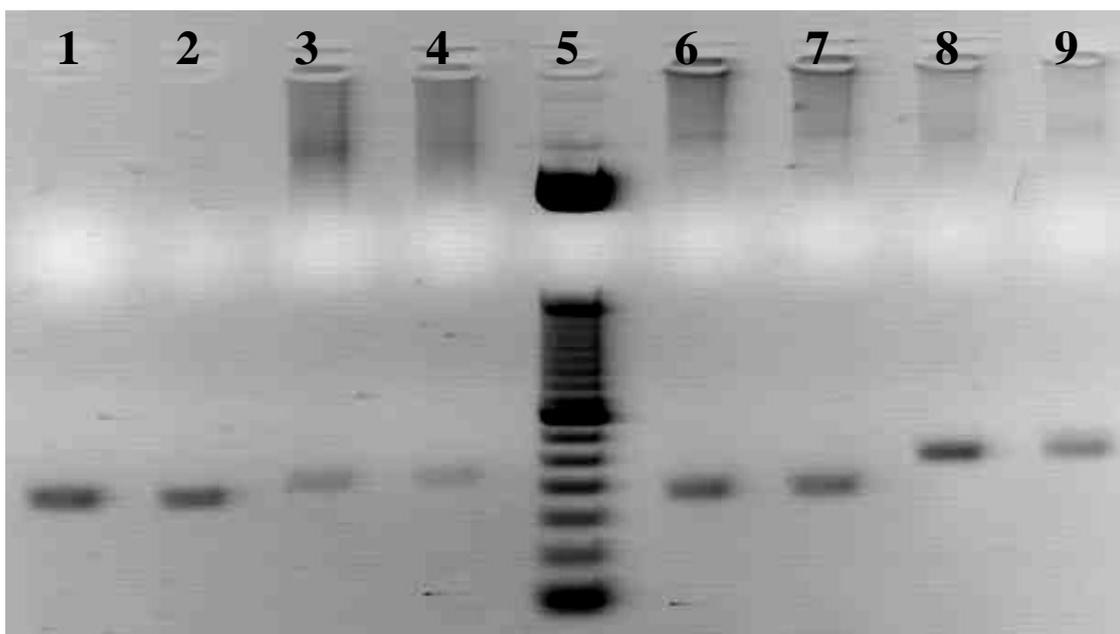


Figura 8 - Gel de agarose a 1,5%. (Coluna 1 e 2) exon 4; (coluna 3 e 4) exon 5, (coluna 5) marcador de peso molecular de 50 pb; (coluna 6 e 7) exon 9; e (coluna 8 e 9) exon 10.

A padronização dos géis de SSCP foi estabelecida de acordo com o anteriormente descrito nos Materiais e Métodos. As imagens do padrão dos géis de SSCP para cada exon estão apresentadas nas figuras 9 e 10.

Foram amplificados cem controles para cada exon e também os novos pacientes que ampliaram a amostra dos casos iniciais. Após a análise de SSCP foram encontradas algumas alterações nos controles e nos novos pacientes analisados (Tabela 8 e 9, respectivamente). Os padrões de migração no SSCP em alguns controles diferiram dos padrões dos demais controles, mas também das mutações estudadas. Entre os pacientes, quatro deles apresentaram um padrão de corrida no gel de SSCP diferente dos controles.

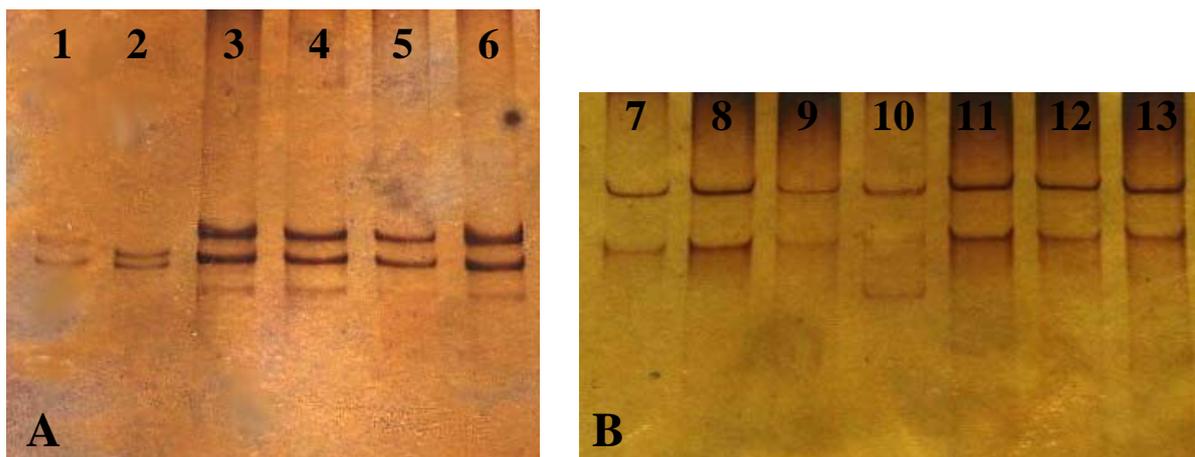


Figura 9 - Géis de SSCP corados com nitrato de prata. (A) Padronização para o exon 4. (B) Padronização para o exon 5.

(1) mutação p.G139S em heterozigose; (2) mutação p.G116S em homozigose; (3-6) controles normais para o exon 4. (7-9 e 11-13) controles normais para o exon 5; (10) mutação p.N164T em heterozigose.

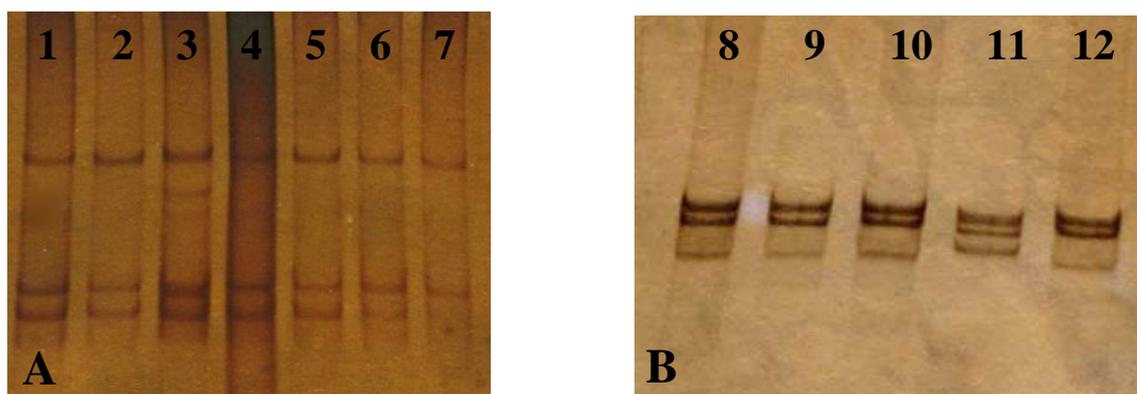


Figura 10 - Géis de SSCP corados com nitrato de prata. (A) Padronização para o exon 9. (B) Padronização para o exon 10.

(1-2 e 4-7) controles normais para o exon 9; (3) mutação p.L307P em heterozigose; (8-10 e 12) controles normais para o exon 10; (11) mutação p.S341R em heterozigose.

Tabela 8 - Número de controles estudados e com padrão do SSCP alterado em relação tanto aos demais controles quanto ao padrão da mutação estudada para cada exon.

Exon	Número de controles analisados	Número de controles alterados
4	100	2
5	100	0
9	100	0
10	100	1

Tabela 9: Número de pacientes estudados e com padrão do SSCP alterado em relação aos demais controles para cada exon.

<b>Exon</b>	<b>Número de pacientes novos analisados</b>	<b>Número de pacientes novos alterados</b>
4	8	1
5	8	1
9	8	2
10	8	0

### 5.2.3 Seqüenciamentos

Foram seqüenciados quatro pacientes novos para os respectivos exons nos quais eles apresentaram padrão de SSCP alterado no gel de poliacrilamida. As alterações encontradas nos quatro exons pesquisados estão descritas na Tabela 10 com a substituição da base, alteração do códon e do aminoácido. No total foram caracterizados 45,6% dos alelos dos pacientes novos. Juntamente com os casos-índice atingimos um percentual de 71,6% de alelos identificados. No entanto se analisarmos apenas as mutações encontradas nos exons 4, 5, 9 e 10 o percentual foi de 66,8.

Tabela 10 - Mutações encontradas nos pacientes novos evidenciando a alteração na base, códon e aminoácido.

<b>Paciente</b>	<b>Exon</b>	<b>Mutação</b>	<b>Substituição de base</b>	<b>Alteração no códon</b>	<b>Alteração do aminoácido</b>
G	9	p.G301C Hom	1000G → T	GGC → TGC	glicina → cisteína
I	4	Mudança no quadro de leitura ( <i>frameshift</i> )			
L	9	p.G301C Hom	1000G → T	GGC → TGC	glicina → cisteína
M*	5	p.N164T Hom	590A → C	AAC → ACC	aspargina → treonina

Numeração de acordo com NM\_000512.3.

(\*) consangüíneo; (A) adenina; (T) timina; (C) citosina; (G) guanina; (Hom) homozigoto; (Het) heterozigoto.

Além desses, os três controles que apresentaram alteração no padrão de corrida do SSCP também foram seqüenciados (Tabela 11).

Tabela 11 - Mutações encontradas nos controles evidenciando o efeito, a alteração na base, códon e aminoácido e o tipo de mutação.

<b>Exon</b>	<b>Efeito</b>	<b>Substituição de base</b>	<b>Alteração no códon</b>	<b>Tipo de Mutação</b>
4	p.A107A	420C→T	GCC → GCT	Silenciosa
4	p.Y108Y	423C→T	TAC → TAT	Silenciosa
10	p.P357P	1170G→A	CCG → CCA	Silenciosa

Numeração de acordo com NM\_000512.3.

(A) adenina; (T) timina; (C) citosina; (G) guanina; (Hom) homozigoto; (Het) heterozigoto.

#### 5.2.4 Frequências

As mutações foram analisadas conjuntamente para análise da frequência. Nos casos de consangüinidade foi considerado apenas um alelo mutante presente para efeitos de correção dos cálculos de frequência (Tabela 12).

Tabela 12 - Frequência das mutações encontradas nos pacientes brasileiros corrigida pela consangüinidade.

<b>Exon</b>	<b>Mutação</b>	<b>Frequência (%)</b>
4	p.G116S	14,3
4	p.G139S	4,8
4	<i>frameshift</i>	4,8
5	p.N164T	14,3
9	p.G301C	19,0
9	p.L307P	4,8
10	p.S341R	4,8
11	p.R386C	4,8
Não determinados		28,4

## 6 DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo molecular em pacientes brasileiros com MPS IVA, tendo se iniciado a partir de uma colaboração com um grupo de pesquisa norte-americano. Neste trabalho partimos de seis casos-índice com o diagnóstico bioquímico para a Síndrome de Morquio A. Esses pacientes tiveram seu gene que codifica a enzima GALNS, deficiente nesta patologia, completamente seqüenciado.

Para efeito de conceituação uma mutação é considerada como uma mudança herdável em uma seqüência específica de DNA em relação a uma seqüência de referência (variante alélica), independente de sua ação. Já uma variação polimórfica significa uma mudança na estrutura do DNA, sem efeito fenotípico (mutação neutra ou não prejudicial) e presente em uma freqüência maior ou igual a 1% (Cotton e Scriver, 1998).

Muitas das investigações para a determinação das mutações descritas para pacientes com MPS IVA usaram a técnica de PCR seguida de sequenciamento direto. Neste tipo de abordagem rearranjos, deleções, inversões e mutações nos introns podem não ser identificadas. Outra estratégia muito usada foi a amplificação do DNA por PCR seguida de triagem por SSCP e seqüenciamento das amostras com padrões alterados. Nenhuma das alternativas se mostrou 100% eficaz. Melhorias nos métodos de diagnóstico deverão ajudar a definir o restante das mutações nos pacientes com MPS IVA (14% dos alelos mutantes publicados são indefinidos) (Tomatsu et al., 2005b).

Nos seis casos iniciais deste estudo, nos quais todos os exons foram seqüenciados, apenas um dos alelos mutantes não foi determinado (10,0%). Esse valor está abaixo da porcentagem de 14% de alelos não identificados descrita na literatura (Tomatsu et al., 2005b) indicando que obtivemos um bom resultado na análise destas amostras.

Entre as seis diferentes mutações encontradas nos pacientes iniciais- p.G116S, p.N164T, p.L307P, p.S341R, p.G139S e p.R386C - as quatro primeiras estavam sendo descritas pela primeira vez. Para essas optamos por avaliar o caráter patológico através da análise da freqüência conforme discutido a seguir. Posteriormente, pacientes novos que deram entrada no SGM-HCPA diagnosticados bioquimicamente para a Síndrome de Morquio A foram então analisados para os mesmos exons a fim de se verificar a ocorrência de alterações gênicas.

Entre os mecanismos para se estudar a patogenicidade de uma mutação podemos citar: análise da estrutura conformacional da proteína; análise do(s) aminoácido(s) afetado(s);

estudos de expressão; estudos de frequência; análise do tipo de mutação; e análise de segregação.

A análise conformacional da estrutura terciária da proteína requer inicialmente que ela já tenha sido estudada e que esteja disponível um programa computacional para análise dos dados. Podemos prever que a mutação pode alterar importantes sítios da estrutura da proteína madura, mas é uma análise cara que requer equipamentos específicos. Em relação aos aminoácidos, os conservados tendem a ter importância funcional maior, e mutações que os afetam geralmente alteram a estrutura e função do polipeptídeo produzido. Os estudos de expressão, por sua vez, permitem a análise funcional de um gene mutante, normalmente pela expressão do cDNA, e a medida da atividade biológica *in vitro*. É o melhor teste para confirmar que a mutação está modificando o fenótipo. Como desvantagens podemos citar seu custo elevado, necessidade de cultura de células, dosagem bioquímica, construção de um vetor de expressão entre outros. Quando consideramos os estudos de frequência, alelos polimórficos, que escapam de seleção negativa, costumam ser prevalentes na população. Uma mutação que ocorre em menos de 1% dos alelos é, por definição, rara e pode ser patogênica; em contrapartida, uma mutação que é encontrada em frequências maiores pode ser um polimorfismo neutro. O tipo de mutação pode prever o caráter patogênico como é o caso de mutações na sequência codificante que geram codons de terminação (mutação sem sentido ou *frameshift*), grandes deleções ou inserções e sítios de *splice*. As análises de segregação de fenótipos com as mutações podem ser úteis se tivermos à disposição famílias afetadas onde a patologia em questão estiver sendo passada entre as gerações (Cotton e Scriver, 1998).

As mutações de sentido trocado causadoras da doença tanto podem ser analisadas por estudos de expressão quanto pela comparação de suas localizações com domínios padrões. Para as mutações de ponto com sentido trocado podemos adotar as estratégias de: análise da estrutura conformacional da proteína; análise do(s) aminoácido(s) afetado(s); estudos de expressão; estudos de frequência; e análise de segregação.

Neste estudo, onde analisamos apenas a patogenicidade de mutações de ponto com sentido trocado, optamos por usar os estudos de frequência e a análise dos aminoácidos afetados. Isto ocorreu porque a análise da estrutura terciária e os estudos de expressão não estavam disponíveis além de seus custos mais elevados. Relatos de mutações devem incluir a análise de 200 cromossomos ou menção da frequência. Este número leva em consideração a baixa frequência esperada das mutações causadoras da doença. O seqüenciamento da região codificante do gene da GALNS e a determinação da ausência de mutações entre 100 controles

normais é uma metodologia usada e está de acordo com a literatura (Cotton e Scriver, 1998 e Tomatsu et al., 2004f).

Para análise de um grande número de amostras os métodos de triagem são normalmente usados no contexto dos diagnósticos. Neste caso, onde foram necessárias as análises de 400 amostras (100 controles X 4 exons) além dos pacientes novos, os métodos de triagem foram inicialmente usados ao invés do sequenciamento direto. Esta escolha ocorreu porque as análises de sequenciamento não estarão disponíveis de forma rotineira e padronizada em muitos laboratórios. Além disso, heterozigotos podem ser difíceis de identificar por sequenciamento e principalmente porque é também uma análise cara e podemos economizar até 75% do seu valor pelo uso de métodos de triagem (Cotton, 2000).

A técnica de SSCP (*Single strand conformational polymorphism*) é simples, não requer instrumentos sofisticados nem técnicas especializadas e é muito difundida. As mutações influenciam o arranjo e conseqüentemente a mobilidade do DNA nos géis, sinalizando mutações diferentes por padrões de corrida diferentes (Cotton, 2000). Moléculas que diferem em substituições de uma única base podem formar conformações diferentes e migrar diferentemente em um gel não desnaturante de poliacrilamida. Esta técnica provou-se útil na detecção de múltiplas mutações e polimorfismos. Parece ser mais sensível quando usada com PCR em torno de 200 pb (Orita et al., 1988; Sheffield et al., 1993) o que está de acordo com o tamanho dos fragmentos analisados neste trabalho que variaram de 176 pb a 231 pb.

A maioria das mutações descritas para o gene da GALNS até hoje foi detectada usando amplificação do DNA por PCR seguido da técnica de SSCP como método de triagem. Esta estratégia é plausível e reprodutível e cerca de 85-95% das mutações no gene da GALNS foram assim detectadas (Tomatsu et al., 2004f).

A conformação do DNA fita simples pode ser afetada por fatores ambientais como temperatura do gel durante a eletroforese, concentração do tampão de corrida e presença de agentes desnaturantes no gel. Temperaturas mais elevadas podem destruir algumas conformações semi-instáveis. A sensibilidade do SSCP pode ser aumentada pela análise em mais de uma condição de gel (Orita et al., 1998).

Para cada exon foram testadas pelo menos duas condições de gel de poliacrilamida variando a concentração do mesmo (8% e 12%). Foi selecionada a condição que melhor distinguia o padrão de corrida da mutação do padrão dos controles normais. Para dois exons foram ainda alterados a temperatura e tempo de corrida do gel. Como descrito na literatura

(Orita et al., 1998), a temperatura influencia a conformação das fitas e pode, como foi o caso, melhorar a identificação dos fragmentos mutados.

Investigamos, para cada exon, 200 alelos de controles anônimos doadores do banco de sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Este material já estava disponível no SGM e já havia sido usado em outros projetos de pesquisa. Padrões alterados em alguns controles foram enviados para sequenciamento. Em nenhum dos controles analisados foi encontrada a presença de uma das novas mutações. Assim, uma vez testada e descartada a existência das mutações nos controles, e analisados o caráter de conservação dos aminoácidos podemos afirmar que as mutações novas são patogênicas. (Cotton e Scriver, 1998).

Levando em conta a origem dos pacientes notamos que quase a metade é originária do Rio Grande do Sul (40,0%) mas também existem pacientes de diversas outras regiões do país. Estes dados só vêm a demonstrar a importância do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre como Centro de Referência para doenças genéticas. Pode-se observar que os pacientes novos provêm de um maior número de Estados, fato que se deve a instituição da Rede MPS Brasil que vem cadastrando pacientes com MPS de todo o país. A rede MPS teve início em Abril de 2004 e já conta com 426 pacientes cadastrados (em março de 2006), sendo que destes cinco (1,2%) estão com diagnóstico confirmado para a Síndrome de Morquio A.

Entre nossos pacientes houve um leve predomínio com diferença estatisticamente significativa do sexo masculino (60,0%). Este dado não está exatamente de acordo com a literatura disponível sobre a história natural da doença (Tomatsu et al., 2004b) onde observou-se 47% do sexo masculino, mas sem diferença estatística em relação às mulheres. Esta discordância pode ser pelo pequeno número da nossa amostragem (15) em relação a esse levantamento que foi realizado com 258 pacientes.

Análises moleculares para o gene da GALNS foram realizadas em diversos grupos populacionais. Entretanto, muito pouco tem sido feito em pacientes da América Latina e só recentemente foram publicados os primeiros resultados sobre pacientes brasileiros, a partir de dados obtidos nesta pesquisa. A heterogeneidade genética, característica das mutações desta patologia, também foi verificada na população da América Latina, incluindo nossos pacientes. Isso reflete o amplo espectro de fenótipos clínicos que podemos encontrar. Em um estudo publicado por Tomatsu et al. (2004e), entre os 20 pacientes analisados (incluindo os sete casos iniciais deste trabalho) foram encontradas 3 mutações previamente descritas e 9 novas, sendo que dessas, quatro foram nos pacientes brasileiros. Além disso, a grande

heterogeneidade é demonstrada pelo fato de que 46,1% das mutações descritas foram relatadas em apenas três alelos ou menos (Tomatsu et al., 2005b).

Em relação à consangüinidade, dois dos casos-índice (pacientes C e F) apresentavam relações de consangüinidade entre os pais. Esses dois pacientes são homocigotos para as suas respectivas mutações (p.N164T e p.G116S) como era de se esperar pelo caráter autossômico recessivo da Síndrome de Morquio A. Essas mesmas mutações novas foram encontradas em outros dois pacientes sem consangüinidade nem relação de parentesco com os dois primeiros (pacientes A e D). O paciente A é heterocigoto para a mutação p.N164T e o paciente D apresenta a mutação p.G116S em homocigose. Por terem sido inicialmente descritas nesta pesquisa pode-se supor que elas sejam frequentes entre pacientes brasileiros, especialmente da Região Sul do Brasil, local de origem desses quatro indivíduos.

Os pacientes E1 e E2 são de ascendência negra. Não há dados na literatura em relação a pacientes de origem africana. As duas mutações novas encontradas nesses pacientes (p.L307P e p.S341R) podem estar relacionadas a origem étnica uma vez que não foram encontradas em mais nenhum dos outros pacientes analisados que eram caucasianos. Além disso, como anteriormente constatado, não há descrição de mutações em pacientes de origem africana.

As mutações p.G116S e p.N164T foram consideradas como recorrentes, assim como já anteriormente determinado para as mutações p.G139S, p.G301C e p.R386C.

Estes dados mostram a importância da genotipagem das diferentes populações, pois evidencia que muitas mutações são restritas a grupos étnicos. Conhecendo as mutações mais prevalentes em nosso país poderemos direcionar as análises moleculares tornando mais ágil o processamento das amostras e obtenção dos resultados. Vale salientar que a tecnologia do DNA, através da análise molecular, não é necessária para o diagnóstico dos pacientes uma vez que esse é confirmado por ensaios bioquímicos. No entanto, a detecção gênica das mutações é de relevante e crescente importância para: obtenção de informações sobre as diferentes mutações da doença e sua epidemiologia; diferenciação entre as formas clínicas de uma mesma doença; auxiliar na correlação genótipo/fenótipo; melhorar a detecção de portadores especialmente em doenças ligadas ao X; diagnóstico pré-natal; perspectiva de uso em terapia gênica no futuro, e, eventualmente, estas informações serão úteis para avaliar a resposta a possíveis tratamentos como a TRE (Saínz et al., 2002).

A análise dos seis primeiros pacientes brasileiros revelou que 80,0% das mutações encontradas estavam presentes nos exons 4, 5, 9 e 10. Além disso, as mutações novas que foram identificadas também estavam nesses quatro exons. Esses exons considerados

conjuntamente, de acordo com os dados da literatura, contemplam quase 40% de todas as mutações descritas e 41,0% dos alelos (Figura 11). O número encontrado em nossos pacientes foi muito superior e por esse motivo os novos pacientes incluídos no estudo foram analisados apenas quanto à presença de alterações nestes exons. Neste estudo 66,8% de todos os 21 alelos, ajustados para consangüíneos, estavam concentrados nesses quatro exons (4, 5, 9 e 10).

O exon 11 que apresenta a mutação mais prevalente (p.R386C) responde por 10,5% das mutações (Tomatsu et al., 2005b).

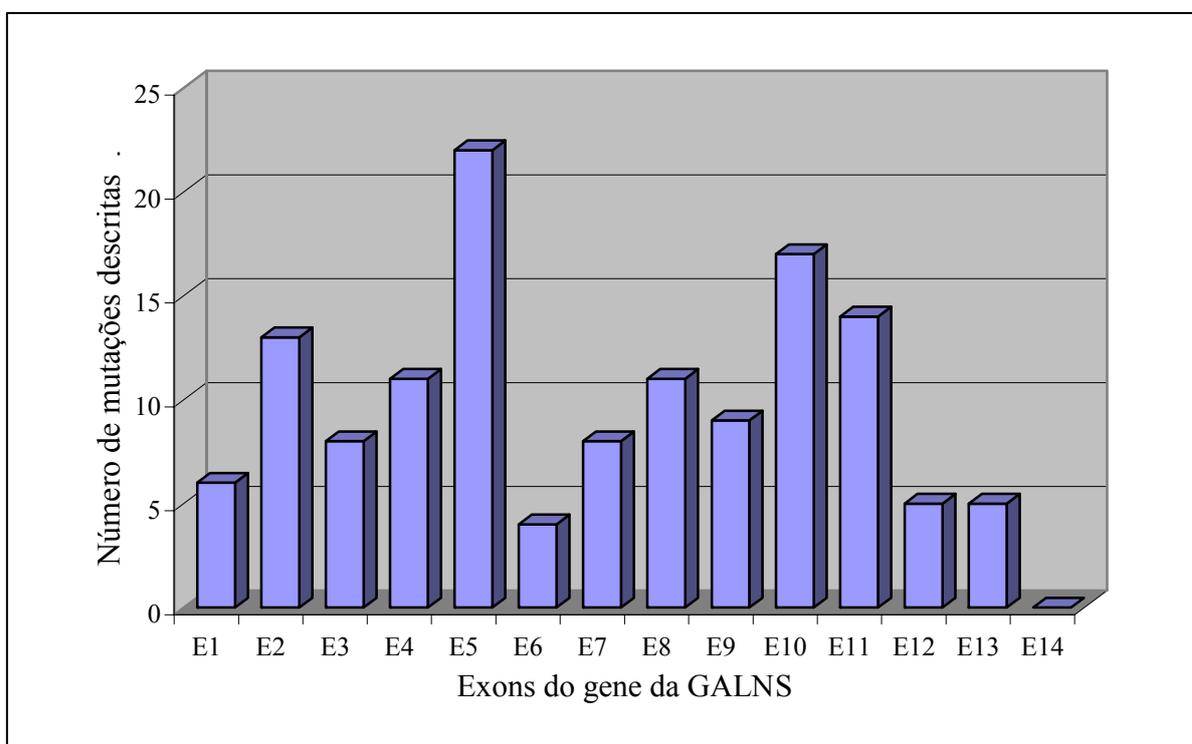


Figura 11 - Número de mutações descritas por exon para o gene da GALNS (Tomatsu et al., 2005).

Nos sete pacientes novos que foram incluídos no estudo foram encontradas mutações em quatro deles para os exons avaliados. No total dos 11 alelos, ajustado para a consangüinidade, foram caracterizados cinco deles (45,6%). A mutação p.N164T apareceu novamente, em homozigose, em um outro paciente com consangüinidade entre os pais. Este dado só vem a reiterar seu caráter recorrente e o provável efeito fundador no sul do país, local de origem deste e dos outros pacientes portadores da mesma mutação. Ela apresentou uma alta freqüência uma vez que do total dos 21 alelos estudados ela apareceu em três deles (14,3% dos alelos). A mutação p.G301C foi identificada em homozigose em dois dos novos

pacientes sem relações de consanguinidade familiar. Esta mutação é considerada recorrente e já foi identificada em vários grupos étnicos. Neste estudo ela representou 19,0% dos alelos.

O tipo (sem sentido ou sentido trocado), frequência e localização das mutações de ponto causadoras das doenças genéticas são altamente não-randômicas. Tomando por base o gene da GALNS contamos o número de mutações observadas por exon e, baseados no tamanho relativo de cada um, calculamos o número de mutações esperadas para cada um deles (Tabela 13).

Tabela 13 - Número de mutações esperadas e observadas por exon do gene da GALNS de acordo com seu tamanho relativo

<b>Exon</b>	<b>Tamanho (pb)</b>	<b>Tamanho relativo (%)</b>	<b>Mutações Esperadas</b>	<b>Mutações Observadas</b>
1	120	7,66	10	6
2	124	7,92	11	13
3	75	4,79	6	8
4	103	6,58	9	11
5	144	9,20	12	22
6	67	4,28	6	4
7	125	7,98	11	8
8	140	8,94	12	11
9	104	6,64	9	9
10	137	8,75	12	17
11	103	6,58	9	14
12	122	7,79	10	5
13	118	7,54	10	5
14	84	5,36	7	0
<b>Total</b>	<b>1566</b>	<b>100</b>	<b>133</b>	<b>133</b>

A partir desta tabela foi realizado um teste de qui quadrado e concluído que existe uma diferença estatisticamente significativa entre o número de mutações observadas e esperadas para os exons ( $p < 0,01$ ). Com isso podemos afirmar que não há uma aleatoriedade da distribuição das mutações e que existem áreas mais propensas a mutações dentro do gene. Podemos considerar os exons 5, 10 e 11 como *hot spots* para mutações, uma vez que

apresentam um acréscimo de 83%, 42% e 56% respectivamente no número de mutações esperadas.

Esta não aleatoriedade ao nível do DNA tem sido atribuída a variações na sequência do DNA, como, por exemplo, a presença ou ausência de regiões ricas em dinucleotídeos CpG. A distribuição das mutações dessas regiões dentro de um gene é irregular. Isto pode ser explicado, em parte, pela diferença na metilação e números variáveis de sítios CpG em diferentes genes ou nos diferentes exons (Tomatsu et al., 2004d).

A metilação de resíduos de citosina nos sítios CpG produz 5-metilcitosina resultando em uma mudança transicional de citosina para timina (ou guanina para adenina) via desaminação mediada por metilação. Uma citosina metilada nesse sítio é mais suscetível a desaminação do que as não metiladas que terão, portanto, menor chance de mutar para uma timina (Tomatsu et al., 2002).

No gene da GALNS foi verificada uma metilação completa dos exons 2 ao 14 (com 65 sítios CpG) enquanto que o exon 1 é completamente não metilado (13 sítios CpG). Transições nessas regiões correspondem a 26,4% dos alelos mutantes, o que representa 31,7% das mutações de ponto na região codificante. Além disso, dois polimorfismos (12,5% dos polimorfismos descritos) também foram identificados em áreas de dinucleotídeos CpG. Esses dados estão de acordo com a literatura e demonstram uma probabilidade 20 vezes maior de transição em dinucleotídeos CpG quando comparados com o valor esperado, mostrando que a maioria dessas mutações é recorrente (Tomatsu et al., 2004d e 2005b).

Todas as 22 mutações nos sítios CpG estão entre os exons 2 e 14 demonstrando que apesar do grande número de dinucleotídeos CpG no exon 1 a sua não metilação está correlacionada com a ausência de transição nesses sítios. Da mesma forma nenhuma transição deste tipo foi encontrada nos exons 9 ou 14, o que pode ser explicado pelo menor número de sítios CpG nesses exons (quatro e um respectivamente) ou pela escassez de resíduos de aminoácidos conservados com dinucleotídeos CpG. (Tomatsu et al., 2005b).

Entre as sete diferentes mutações encontradas em nossos pacientes uma nova (p.G116S) e duas já descritas (p.G139S e p.R386C) estão localizadas nas regiões CpG constituindo 35,7% das mutações encontradas. Este dado está um pouco acima do descrito para o gene da GALNS (31,7%) mas está de acordo com a literatura em geral que sugere que 10-60% das mutações de ponto que causam doenças humanas resultam em transições em dinucleotídeos CpG (Antonarakis et al., 2001).

Sete polimorfismos com troca de aminoácido e nove sem foram relatados na literatura sendo que destes, dois (p.T200M e p.V488M) estão em sítios CpG. Neste estudo entre os

cinco diferentes polimorfismos encontrados 20% estava em um sítio CpG o que está um pouco acima dos 12,5% anteriormente descritos para as alterações não patogênicas do gene da GALNS (Tomatsu et al., 2005b).

A análise de haplótipos para a mutação R386C demonstrou ser o mesmo para quatro pacientes homocigotos de três países diferentes - Argentina, Chile e Colômbia (Tomatsu et al., 2004e). Uma perspectiva futura seria fazer a mesma análise em pacientes do nosso meio para verificar se existe a mesma ancestralidade da mutação.

As bases moleculares da deficiência enzimática que leva aos sintomas clínicos da MPS IVA é de particular interesse em virtude do grande número de alelos e variabilidade clínica (Terzioglu et al., 2002). A correlação de uma mutação individual, em homocigose, com a gravidade da doença é baseada principalmente em mudanças na estrutura terciária da proteína e no nível da atividade enzimática *in vitro*. Essas correlações foram definidas para algumas mutações do gene da GALNS.

As mutações sem sentido, em sítios de *splice*, a maioria das pequenas e as grandes deleções reportadas resultaram em fenótipo grave pela ausência de atividade catalítica da enzima. Entre as cinco inserções descritas na literatura não há homocigotos, e os heterocigotos apresentam fenótipos moderados ou graves. As mutações de ponto produzem diversos graus de severidade fenotípica. Resíduos conservados entre as diferentes sulfatases devem ser mais importantes e mutações nessas regiões devem ser mais frequentes nos pacientes graves (Tomatsu et al., 2004d). Entre as 103 mutações (78,4%) com sentido trocado há um amplo espectro de manifestações clínicas, sendo que a mutação p.R386C, a mais prevalente, gera um fenótipo grave em homocigose. De forma geral 31 mutações (21,0%) foram associadas ao quadro moderado, 101 (68,2%) ao grave e 16 (10,8%) não foram definidas (Terzioglu et al., 2002 e Tomatsu et al., 2005b).

Os aminoácidos considerados conservados são aqueles que estão conservados entre todas as diferentes espécies de GALNS e entre as sulfatases humanas. Os resíduos semi-conservados são aqueles que estão conservados entre todas as diferentes espécies de GALNS mas parcialmente conservados entre as sulfatases humanas. Aminoácidos GALNS-específicos são aqueles que estão conservados entre todas as diferentes espécies de GALNS mas não entre as sulfatases humanas.

No entanto, mesmo em regiões conservadas, o fator determinante para as características fenotípicas está relacionado não só com a troca do aminoácido conservado, mas também pelo efeito na estrutura secundária e/ou terciária que vai ocorrer pela substituição. Aqui devem ser levadas em consideração as características físico-químicas de

cada substituição (Ogawa et al., 1995). Na tabela abaixo está a correlação de cada uma das mutações encontradas neste estudo com seu fenótipo preditivo, quando em homozigose, e o grau de conservação do aminoácido (Tabela 14). Como podemos perceber, mutações em aminoácidos conservados levaram a fenótipos severos, mas o mesmo foi observado em mutações que ocorrem em aminoácidos semi conservados, GALNS específicos e inclusive em um não conservado.

Tabela 14 - Grau de conservação do aminoácido e fenótipo para cada mutação encontrada no gene da GALNS em pacientes brasileiros

<b>Mutação</b>	<b>Grau de conservação do AA</b>	<b>Fenótipo</b>
p.G116S	SC	Severo
p.G139S	C	Severo
p.N164T	G-S	Severo
p.G301C	NC	Severo
p.L307P	G-S	Severo
p.S341R	NC	Severo
p.R386C	NC	Severo

Fonte: Tomatsu et al., 2005b.

(AA) aminoácido; (C) conservado; (SC) semi-conservado; (NC) não conservado; (G-S) GALNS específico; (ND) não determinado.

Para os pacientes abordados por este trabalho torna-se difícil avaliarmos a estatura final, que é um dado relacionado com a gravidade da doença. Isto porque entre eles apenas dois atingiram a maioridade e cinco chegaram aos treze anos, o que significa que a maioria ainda pode crescer.

Em relação ao início dos sintomas a média de idade entre os pacientes com dados disponíveis (19,3 meses com desvio padrão de  $\pm 13,4$  meses) está de acordo com o descrito na literatura onde o início dos sinais e sintomas ocorre por volta dos dois anos de idade e o diagnóstico final por volta dos três anos (Northover et al., 1996 e Tomatsu et al., 2004b).

A mutação mais prevalente é a p.R386C que é a única que foi descrita em todos os grupos populacionais até hoje estudados. Ela é responsável por 8,9% dos alelos descritos e leva à perda quase total da atividade enzimática em estudos *in vitro*. Esta mutação foi encontrada em apenas um caso índice em heterozigose.

Análises da mutação p.G301C mostra que em homozigose leva a um fenótipo grave o que pode ser previsto pelo fato de que em estudos de expressão *in vitro* não apresenta nenhuma atividade residual da enzima. Esta mutação é a segunda mais freqüente e é responsável por 6,8% dos alelos descritos na literatura. Ela havia sido descrita em pacientes italianos, francês, britânico, português, marroquino e, em 90% dos pacientes colombianos. Esta mutação está presente em 70% dos alelos descritos nos pacientes colombianos representando um efeito fundador (Tomatsu et al., 2005b). Neste trabalho esta mutação foi encontrada em homozigose em dois dos pacientes novos.

A mutação p.G139S foi descrita em 1,3% dos alelos. Já foi identificada em pacientes da Irlanda, Argentina, Estados Unidos e agora do Brasil. Em estudos de expressão *in vitro* apresentou atividade residual abaixo de 1% sendo considerada, quando em homozigose, preditiva de fenótipo severo.

Entre as mutações novas encontradas (p.G116S, p.N164T, p.L307P e p.S341R) apenas, até o momento de redação desta dissertação, a mutação p.G116S já foi descrita em um paciente de outra população (Estados Unidos da América).

O estabelecimento da relação genótipo-fenótipo será um dos maiores desafios, pois implica em observação clínica dos pacientes ao longo do tempo, e posterior identificação e caracterização dos fatores modificadores para a correta pós-tradução e estabilização da enzima, e para o eficiente catabolismo do queratan sulfato. Estudos sobre a relação entre a atividade residual da GALNS em pacientes com MPS IVA e acúmulo de queratan sulfato, especialmente no osso, irão fornecer mais informações sobre o mecanismo causador da displasia óssea sistêmica e fornecer as bases para um tratamento mais eficiente (Tomatsu et al., 2005b).

Para os pacientes com Morquio A não há qualquer opção de tratamento resolutivo. Por esse motivo, alternativas de prevenção é o que pode ser oferecido às famílias. Entre elas a detecção de portadores, aconselhamento genético, diagnóstico pré-natal e estudos de relação genótipo-fenótipo. Para isso é importante a disponibilização de técnicas de biologia molecular para a genotipagem e detecção de novas mutações. Uma melhor compreensão do mecanismo da patologia também deve contribuir para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes para a MPS IVA.

## CONCLUSÕES

1. Foram identificadas mutações em 11 dos 12 alelos de seis pacientes brasileiros com a Síndrome de Morquio A;
2. As quatro mutações novas encontradas foram submetidas à análise de frequência em controles normais, tendo todas sido consideradas patogênicas;
3. As técnicas de PCR para os 4 exons do gene da GALNS foram padronizadas assim como foram desenvolvidos primers específicos para cada exon;
4. A técnica de SSCP foi padronizada para cada um dos quatro exons avaliados neste trabalho.

## ANEXO A

### **“Identification of a common mutation in mucopolysaccharidosis IVA: correlation among genotype, phenotype, and keratan sulfate”**

Tomatsu S, Dieter T, Schwartz IV, Sarmiento P, Giugliani R, Barrera LA, Guelbert N, Kremer R, Repetto GM, Gutierrez MA, Nishioka T, Serrato OP, Montano AM, Yamaguchi S, Noguchi A.

J Hum Genet. 2004;49(9):490-4. Epub 2004 Aug 11.

## **ANEXO B**

### **“Common mutations in Brazilian mucopolysaccharidosis IVA (MPS IVA) patients”**

Dieter T, Matte US, Tomatsu S, Giugliani R.

Genetics and Molecular Biology - submitted

## **Common mutations in Brazilian mucopolysaccharidosis IVA (MPS IVA) patients**

Tatiana Dieter<sup>1\*</sup>

Ursula da Silveira Matte<sup>1,2</sup>

Shunji Tomatsu<sup>5</sup>

Roberto Giugliani<sup>1,3,4</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Pediatria

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Porto Alegre – RS- Brasil

<sup>2</sup>Centro de Terapia Gênica

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Porto Alegre – RS- Brasil

<sup>3</sup>Serviço de Genética Médica

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Porto Alegre – RS- Brasil

<sup>4</sup>Departamento de Genética

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Porto Alegre – RS- Brasil

<sup>5</sup>Department of Pediatrics, Pediatric Research Institute

Saint Louis University

Saint Louis - MO - USA

Key words: Mucopolysaccharidosis IVA – Common Mutations – GALNS – Genomic PCR amplification – SSCP

\*Correspondence to Tatiana Dieter

## **Abstract**

Morquio A Syndrome (mucopolysaccharidosis IVA - MPS IVA, OMIM# 253000) is an inborn error of metabolism caused by the deficiency of N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase (GALNS). In this study, five unrelated Brazilian MPS IVA patients were investigated for mutations in exons 4, 5, 9 and 10 of the GALNS gene. Primers were designed for PCR and sequencing. PCR and SSCP conditions were standardized. One hundred control subjects were also analyzed to neglect the polymorphic changes. Six out of 10 mutant alleles were identified. Taken together with the previous study, mutations in common among Brazilian patients were p.N164T, p.G116S, and p.G301C. Three novel silent mutations were found (p.A107A; GCC → GCT, p.Y108Y; TAC → TAT, p.P357P; CCG → CCA). Screening starting with exons 4, 5, 9, 10 and 11 may be a good strategy for genotyping of Brazilian patients since these exons include 72.7% of all mutations identified in the current and previous studies.

Morquio A Syndrome (mucopolysaccharidosis IVA - MPS IVA, OMIM# 253000) is an autosomal recessive inborn error of metabolism of the lysosomal disorder group caused by the deficiency of N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase (GALNS: E.C.3.1.6.4) (Neufeld and Muenzer, 2001).

MPS IVA is a rare disorder, incidence is estimated to be 1/216,000 live births in British Columbia segundo (Lowry et al., 1990); 1/76,000 live births in Northern Ireland based on ascertained cases over 30 years (Nelson et al., 1997); 1/450,000 live births in The Netherlands for 26 years (Poorthuis et al., 1999), 1/201,000 in Australia (Meikle et al., 1999), 1/640,000 live births in Western Australia for 27 years (Nelson et al., 2003), and 1/450,000 live births in Portugal for 20 years (Pinto et al., 2004). GALNS is one of the sulfatases necessary to degrade keratan sulfate (KS) and chondroitin-6-sulfate (CS). The restricted tissue distribution of KS leads to the unique clinical manifestations of this disorder (skeletal alterations mainly) (Byers et al, 1998). As in other mucopolysaccharidoses (MPS), MPS IVA shows a broad spectrum of clinical severity, presumably which results from a wide variety of GALNS mutations. Clinical features include growth retardation, skeletal dysplasia, short trunk, dwarfism, odontoid hypoplasia and joint laxity (Northover et al, 1996 and Neufeld and Muenzer, 2001). Specific treatments (e.g. enzyme replacement and gene therapy) are under investigation.

The gene for GALNS is located on chromosome 16q24.3 and is split into 14 exons. The GALNS cDNA has an open reading frame of 1566 bp which encodes a 522 amino acid protein. Around 140 different mutations have been described, and around 70% of them are missense mutations (Tomatsu et al, 2005). This data confirms the allelic heterogeneity in the GALNS gene. Genotype/phenotype correlation exists for some of these mutations. The amino-acid-changed or silent polymorphisms have also been described.

The aim of this study was to investigate molecular alterations in Brazilian MPS IVA patients who were evaluated at the Medical Genetics Service (SGM), in the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) from 2004 to 2005. The MPS IVA diagnosis was confirmed by biochemical assay (van Diggelen et al, 1990), where the GALNS activity in leucocytes was lower than 1% of normal controls and the arylsulfatase B activity (ARSB), was normal.

Diagnoses were done in five new patients and one sibling case during 2004 and 2005. DNAs of Brazilian patients with MPS IVA were isolated from the peripheral blood by the ammonium acetate salting-out procedure (Miller et al., 1988). Clinical data of patients from our Genetic Service in the present study (n = 6; Patients 7 – 11) and the data (n = 7; Patients 1 - 6) in the previous study of Brazilian MPS IVA patients (Tomatsu et al., 2004a) are summarized in Table 1. A written informed consent was obtained for each patient. The study protocol was approved by the IRB at HCPA.

In this study, five unrelated subjects were screened for exons 4, 5, 9 and 10 of the GALNS gene. To amplify those exons, PCR reactions were carried out with 100 ng of genomic DNA in a total volume of 50 µl. The reaction include 1X PCR buffer, 0.2 mM dNTPs, 1.5 mM magnesium chloride (MgCl<sub>2</sub>), 20 pmol of each primer (forward and reverse) and 1 U of Taq DNA polymerase (purchased from Invitrogen). Dimethyl sulfoxide (DMSO) was used only for exon 5 in a concentration of 5.6%. All PCR reactions were performed on an Eppendorf Personal Thermal Cycler. The PCR amplification conditions started with 5 min of initial denaturation step at 94°C, followed by 30 cycles of 30 sec at 94°C, 30 sec at annealing temperature and 45 sec at 72°C, followed by a final extension step for 10 min at 72°C. The primers used here were newly designed. PCR primers and conditions are presented in Table 2.

Control PCR reactions, without DNA, were done in each reaction. The products from PCR reactions were checked on a 1.5% TBE-agarose gel containing ethidium bromide.

PCR products were submitted to Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) analysis in order to identify GALNS exon alterations. SSCP was performed with 8µl of PCR product and 4µl of SSCP buffer (95% formamide, 20 mM EDTA, 0.005% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol FF) that were mixed, heated to 95°C for 5 min and chilled on ice before being loaded onto no denaturing polyacrylamide gel. Electrophoresis was performed in 1X TBE buffer. SSCP conditions for exons 4, 5, 9 and 10 are detailed on Table 2. The DNA bands on the SSCP gels were visualized by silver nitrate staining as previously described (Orita et al., 1989). Fragments with an altered pattern were re-amplified, purified with *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences) and sequenced on ABI 310 (Applied – Biosystems) using BigDye Terminator kit version 3.1.

One hundred Brazilian control subjects (anonymous blood donors from south Brazil) were screened by SSCP analysis in the same way as the samples of the patients.

Molecular analyses for MPS IVA have been done in various ethnic populations, however there are very few data about Brazilians patients. In this study, we found two common missense mutations (p.N164T and p.G301C) that accounted for 60% of the mutant alleles investigated so far.

Twelve different missense mutations were found in Brazilian subjects till now. Four of them (p.G116S, p.N164T, p.L307P, p.S341R) were first described in Brazilian patients. Three of these four mutations may be defined to Brazilian population except p.G116S found in a non-Brazilian patient (Tomatsu et al, 2004a and 2005).

The frequency of mutations (60% of mutant alleles) found in exons 4, 5, 9 and 10 in the present study is higher than the 40% in the compiled data (Tomatsu et al., 2005), but lower than the number found before in the other Brazilian subjects (around 80%) (Tomatsu et al, 2004a).

In the previous study, we have done the first report of mutations in Brazilian patients and have confirmed the allelic heterogeneity observed in this pathology where 46.1% of the mutations reported are private or occur in the low frequency (Tomatsu et al., 2004a and Tomatsu et al., 2005).

The frequency of the mutations found in 11 patients from our Genetic Service, including the six reported patients (Tomatsu et al., 2004a), were 22.7% for p.N164T, 18.2% each for p.G116S and p.G301C, 4.5% each for p.G139S, p.L307P, p.S341R and p.R386C (Table 3). Six of 11 patients were homozygous for the mutation and five of these six patients were from a consanguineous marriage.

The p.G116S, p.N164T, and p.G301C mutations could be explained as either “a true recurrent mutation” or “a common founder mutation” since they are observed among unrelated Brazilian patients. The other two common mutations, p.G139S and p.R386C, are considered as “a true recurrent mutation” since they are found in other ethnic populations (Tomatsu et al., 2005).

In a recent study on the mutation spectrum of the GALNS gene, it was shown that the three most frequent mutations, p.R386C, p.G301C, and p.I113F, account for only 20% of the identified mutant alleles (Tomatsu et al., 2005). These data suggest that genotyping for MPS IVA patients should be done for each ethnic population since it seems that majority of mutations are sporadic or unique to each ethnic group.

The frequency of p.R386C, the most common mutation, that is described in most population groups studied, may be underestimated in this study because patients reported here were not analyzed for exon 11 where this mutation is present. It is unknown if this mutation will be frequent among Brazilians because this mutation was found only in one allele (4.5%). The p.G301C mutation was very common in Colombian MPS IVA patients where it accounted for 70% of the mutant alleles investigated. This mutation was found among Italian,

French, British, Portuguese, and Moroccan patients as well. The p.G139S was described in 1.3% of the alleles elsewhere (Irish, Argentine, and American) and its frequency was 3.6% in our sample (Tomatsu et al, 2004a).

In the analysis of the control group, none of the alterations (p.G116S, p.N164T, p.L307P and p.S341R) were found in any of the 100 controls. Analysis of 200 chromosomes in the general population is the methodology used for assessing disease-causing variants (Cotton and Scriver, 1998).

There were 16 nonpathogenic variants of the GALNS gene with a single nucleotide change (Tomatsu et al., 2005). In the control group of this study, three additional silent nucleotide changes were found for the first time: p.A107A (GCC → GCT), p.Y108Y (TAC → TAT), p.P357P (CCG → CCA).

Analyzing the expected and observed number of mutations in the exons (corrected by exon size), we observed that mutations are not randomly distributed along the gene ( $p < 0.01$ ). With these data, it can be predicted that exons 5, 10 and 11 are hot spots for mutations because they have 83%, 42% and 56% increase in frequency more than expected. Mutations reported in exons 4, 5, 9 and 10 accounted for almost 40% of all identified mutations so far. In Brazilian patients, the mutation frequency in these four exons is higher since 16 out of 22 alleles (72.7%) are found in the two studies (here and Tomatsu et al, 2004a). This suggests that it is a good strategy for Brazilian patients to start analyzing exons 4, 5, 9, and 10. Thus PCR conditions (Figure 1) as well as the SSCP conditions (Table 2) for exons 4, 5, 9 and 10 of GALNS gene were standardized initially. Moreover, exon 11 should also be analysed since it possesses the more frequent mutation (p.R386C).

In respect to the phenotype, 68.2% of all the complied mutations are associated with the severe phenotype, 21.0% to the attenuated, and 10.8% were not defined (Terzioglu et al, 2002; Tomatsu et al, 2005). In our patients, the beginning of the signs and symptoms started

around 20 months (SD  $\pm$  13.4 months) and this data are in accordance with the literature where it starts around two years of age and final diagnosis is made around three years old (Northover et al, 1996; Tomatsu et al, 2004c). The standard deviations observed ( $\pm$  13.4 months) show the broad range between the different forms of phenotype. The range of age in Brazilian patients was between 2.0 years and 21 years 3 months. The height was 82.5 ~ 113 cm (-1 ~ -8.9 SD of age-matched normal controls) and the weight was 11 ~ 36 kg (-0.9 ~ -4.3 SD of age-matched normal controls) (data is available from the National Center for Health Statistics –<http://www.cdc.gov/nchs>). Since all patients except Patient 5a have stopped or nearly stopped growing, those patients have been defined as a severe phenotype (the final height is under 125 cm). Accordingly, all the mutations listed here are associated with a severe phenotype.

The PCR technique, primers and SSCP conditions were established for exons 4, 5, 9 and 10 of GALNS gene where we found the majority of mutations reported for Brazilian patients. In this study, using this strategy, was possible to determine 6 out of 10 alleles from patients with Morquio A Syndrome. Common mutations among Brazilian patients are p.N164T, p.G116S, and p.G301C.

### **Acknowledgments**

We thank the support of CNPq and FIPE/HCPA.

## References

1. Byers S, Rozaklis T, Brumfield LK, Ranieri E, Hopwood JJ. Glycosaminoglycan accumulation and excretion in the mucopolysaccharidoses: characterization and basis of a diagnostic test for MPS. *Mol Genet Metab.* 1998 Dec;65(4):282-90.
2. Cotton RG, Scriver CR. Proof of "disease causing" mutation. *Hum Mutat.* 1998;12(1):1-3.
3. Lowry RB, Applegarth DA, Toone JR, MacDonald E, Thunem NY. An update on the frequency of mucopolysaccharide syndromes in British Columbia. *Hum Genet.* 1990 Aug;85(3):389-90.
4. Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA.* 1999 Jan 20;281(3):249-54.
5. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988 Feb 11;16(3):1215.
6. Nelson J. Incidence of the mucopolysaccharidoses in Northern Ireland. *Hum Genet.* 1997 Dec;101(3):355-8.
7. Nelson J, Crowhurst J, Carey B, Greed L. Incidence of the mucopolysaccharidoses in Western Australia. *Am J Med Genet A.* 2003 Dec 15;123(3):310-3. Review.
8. Neufeld EF e Muenzer J. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular basis of inherited disease.* New York: McGraw-Hill, 2001: 3421-3452.
9. Northover H, Cowie RA, Wraith JE. Mucopolysaccharidosis type IVA (Morquio syndrome): a clinical review. *J Inherit Metab Dis.* 1996;19(3):357-65. Review.
10. Ogawa T, Tomatsu S, Fukuda S, Yamagishi A, Rezvi GM, Sukegawa K, Kondo N, Suzuki Y, Shimozawa N, Oru T. Mucopolysaccharidosis IVA: screening and identification of mutations of the N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase gene. *Hum Mol Genet.* 1995 Mar;4(3):341-9.

11. Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*. 1989 Nov;5(4):874-9.
12. Pinto R, Caseiro C, Lemos M, Lopes L, Fontes A, Ribeiro H, Pinto E, Silva E, Rocha S, Marcao A, Ribeiro I, Lacerda L, Ribeiro G, Amaral O, Sa Miranda MC. Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal. *Eur J Hum Genet*. 2004 Feb;12(2):87-92.
13. Poorthuis BJ, Wevers RA, Kleijer WJ, Groener JE, de Jong JG, van Weely S, Niezen-Koning KE, van Diggelen OP. The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. *Hum Genet*. 1999 Jul-Aug;105(1-2):151-6.
14. Saínz C M, Muñoz C Z, Monteagudo A G-Q. Errores innatos del metabolismo. Enfermedades lisosomales / Metabolism inborn errors. Lysosomal storage diseases. *Rev. cuba. pediatr*; 74(1):68-76, ene.-mar. 2002.
15. Terzioglu M, Tokatli A, Coskun T, Emre S. Molecular analysis of Turkish mucopolysaccharidosis IVA (Morquio A) patients: identification of novel mutations in the N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase (GALNS) gene. *Hum Mutat*. 2002 Dec;20(6):477-8.
16. Tomatsu S, Dieter T, Schwartz IV, Sarmient P, Giugliani R, Barrera LA, Guelbert N, Kremer R, Repetto GM, Gutierrez MA, Nishioka T, Serrato OP, Montano AM, Yamaguchi S, Noguchi A. Identification of a common mutation in mucopolysaccharidosis IVA: correlation among genotype, phenotype, and keratan sulfate. *J Hum Genet*. 2004a;49(9):490-4. Epub 2004a Aug 11.
17. Tomatsu S, Filocamo M, Orii KO, Sly WS, Gutierrez MA, Nishioka T, Serrato OP, Di Natale P, Montano AM, Yamaguchi S, Kondo N, Orii T, Noguchi A. Mucopolysaccharidosis IVA (Morquio A): identification of novel common mutations in

the N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase (GALNS) gene in Italian patients. *Hum Mutat.* 2004b Aug;24(2):187-8.

18. Tomatsu S, Smith M, Orii T. Natural history of MPS IVA: Clinical aspects. Abstracts. In: 8<sup>th</sup> International Symposium on Mucopolysaccharide and Related Diseases. New therapeutic strategies – what can we hopefully expect? June 10-13, 2004c; Rheingoldhalle Mainz, Germany. P29. p 25.
19. Tomatsu S, Montano AM, Nishioka T, Gutierrez MA, Pena OM, Tranda Firescu GG, Lopez P, Yamaguchi S, Noguchi A, Orii T. Mutation and polymorphism spectrum of the GALNS gene in mucopolysaccharidosis IVA (Morquio A). *Hum Mutat.* 2005 Dec;26(6):500-12.
20. van Diggelen OP, Zhao H, Kleijer WJ, Janse HC, Poorthuis BJ, van Pelt J, Kamerling JP, Galjaard H. A fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of Morquio disease type A (MPS IV A). *Clin Chim Acta.* 1990 Feb 28;187(2):131-9.

**Table 1.** Clinical and genetic data of the MPS IVA patients.

<b>Patient</b>	<b>Gender</b>	<b>Origin</b>	<b>Consanguinity</b>	<b>AOS (months)</b>	<b>ALE</b>	<b>Height (cm)</b>	<b>Weight (Kg)</b>	<b>Walking Alone</b>	<b>Genotype</b>
1	F	S	No	<6	?	?	?	?	p.G139S / p.N164T <sup>+</sup>
2	F	S	No	36	16y1m	104 (-8.7SD)	22.5 (-4.3SD)	Yes	p.R386C / ND
3	M	S	Yes	24	11y5m	113 (-4.7SD)	28.5 (-1.5SD)	No	p.N164T <sup>+</sup> / p.N164T <sup>+</sup>
4	M	S	No	36	15y6m	103 (-8.9SD)	22.0 (-4.0SD)	Yes	p.G116S / p.G116S
5a*	M	NE	No	?	2y	82.5 (-1.0SD)	11.0 (-1.3SD)	Yes	p.L307P <sup>+</sup> / p.S341R <sup>+</sup>
5b	M	NE	No	18	6y	97 (-3.9SD)	15.0 (-2.3SD)	Yes	p.L307P <sup>+</sup> / p.S341R <sup>+</sup>
6	M	S	Yes	12	7y8m	99.5 (-4.9SD)	21.0 (-1.2SD)	Yes	p.G116S / p.G116S
7	M	S	No	12	10y2m	105 (-5.4SD)	28.1 (-0.9SD)	No	p.G301C / p.G301C
8	F	SE	Yes	<6	9y10m	107 (-4.4SD)	18.7 (-2.6SD)	Yes	ND
9a*	F	NE	Yes	12	6y5m	97.5 (-3.8SD)	17.3 (-1.4SD)	Yes	ND
9b	F	NE	Yes	12	7y7m	100 (-4.1SD)	19.6 (-1.4SD)	Yes	ND
10	M	SE	No	48	11y	103 (-6.0SD)	20 (-2.8SD)	Yes	p.G301C / p.G301C
11	M	S	Yes	24	22y1m	?	36 (-1.7SD)	No	p.N164T <sup>+</sup> / p.N164T <sup>+</sup>

Patients 1 to 6 were reported in a previously study (Tomatsu et al., 2004a patients 17, 16, 18, 19, 15 and 14 respectively) and were analyzed regarding all the exons of GALNS gene. Patients 7 to 11 were analysed just for exons 4, 5, 9 and 10 (see methodology).

(\*)Patients 5a and 5b, 9a and 9b are sibling cases; (S) South of Brazil; (NE) Northeast of Brazil; (SE) Southeast of Brazil; (?) Data not available; (AOS) age at onset of symptoms; (ALE) age at last evaluations; ( <sup>+</sup> ) exclusive in Brazilian patients; (ND) not determined; (SD) standart deviation.

**Table 2.** PCR and SSCP conditions

Exon	Primers	Anneling Temperature (°C)	Fragment Size (bp)	PAGE (%)	Voltage (V)	Running Time (hours)	Temperature (°C)
4	F: GCTTCTCGGGGTCTCCTCG	61	193	12	230	2	RT
	R: GTGGATGGAGCAGGACGCC						
5	F: GTGGGGTCCCTGAAGTGTC	60	212	12	200	3.5	4
	R: CGTGGGAGGGGAAGGGG						
9	F: CTGGTCCCAGTGGCCTGAC	61	176	12	50	15	4
	R: CTGCTGCCCGGCAGACCG						
10	F: CAGAGTGCCCTGACCGTG	57	231	8	250	2	RT
	R: CTCTGGGCTTCACTACTTG						

(F) forward; (R) reverse; (RT) room temperature.

**Table 3.** Nucleotide and codon change, effect on the amino acid, exon, phenotype, and frequency of the mutations in Brazil patients.

<b>Nucleotide change *</b>	<b>Codon alteration</b>	<b>Effect on the amino-acid</b>	<b>Exon</b>	<b>Phenotype defined</b>	<b>Frequency (%)</b>
445G → A	GGC → AGC	p.G116S	4	Severe	18.2
514G → A	GGC → AGC	p.G139S	4	Severe	4.5
590A → C	AAC → ACC	p.N164T	5	Severe	22.7
1000G → T	GGC → TGC	p.G301C	9	Severe	18.2
1019T → C	CTG → CCG	p.L307P	9	Severe	4.5
1122C → A	AGC → AGA	p.S341R	10	Severe	4.5
1255C → T	CGT → TGT	p.R386C	11	Severe	4.5
Not determined					22.9

\*The numbers for the nucleotide changes are reported in accordance with Genebank entry NM\_000512.3.

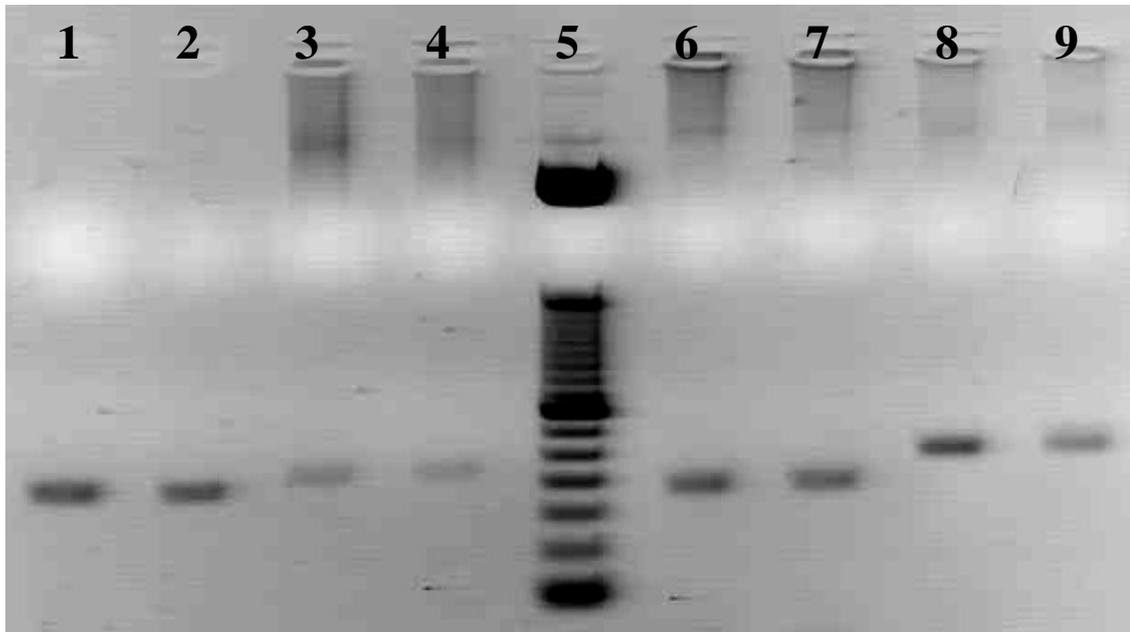


Figure 1. PCR products on 1.5% TBE-agarose gel. Column 1 and 2 exon 4; column 3 and 4 exon 5, column 5 50 pb DNA ladder; column 6 and 7 exon 9; and column 8 and 9 exon 10.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Antonarakis SE, Krawczak M, Cooper DN. The Nature and Mechanisms of Human Gene Mutation. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. The metabolic and molecular basis of inherited disease. New York: McGraw-Hill, 2001: 343-377.
2. Baker E, Guo XH, Orsborn AM, Sutherland GR, Callen DF, Hopwood JJ, Morris CP. The morquio A syndrome (mucopolysaccharidosis IVA) gene maps to 16q24.3. *Am J Hum Genet.* 1993 Jan;52(1):96-8.
3. Ballas ER, Espinoza VC, Muñoz MJ. Aproximación al diagnóstico y tratamiento de los errores innatos del metabolismo. In: Campbell MC, Espinoza VC, Ballas ER. Errores innatos en el metabolismo del niño. 2ª ed. Santiago de Chile: Editorial Universitaria, 2003. 646 p. cap. 2, p. 47-69.
4. Brailsford JF. Chondro-osteo-dystrophy: roentgenographic and clinical features of child with dislocation of vertebrae. *Am. J. Surg.* 7: 404-410, 1929.
5. Byers S, Rozaklis T, Brumfield LK, Ranieri E, Hopwood JJ. Glycosaminoglycan accumulation and excretion in the mucopolysaccharidoses: characterization and basis of a diagnostic test for MPS. *Mol Genet Metab.* 1998 Dec;65(4):282-90.
6. Coelho JC, Wajner M, Burin MG, Vargas CR, Giugliani R. Selective screening of 10,000 high-risk Brazilian patients for the detection of inborn errors of metabolism. *Eur J Pediatr.* 1997 Aug;156(8):650-4.
7. Cotton RG, Scriver CR. Proof of "disease causing" mutation. *Hum Mutat.* 1998;12(1):1-3.
8. Cotton RG. Methods in clinical molecular genetics. *Eur J Pediatr.* 2000 Dec;159 Suppl 3:S179-82. Review.
9. Dagach RU. Errores innatos del metabolismo del niño: es tiempo de actuar. In: Campbell MC, Espinoza VC, Ballas ER. Errores innatos en el metabolismo del niño. 2ª ed. Santiago de Chile: Editorial Universitaria, 2003. 646 p. Introducción, p. 21-24.
10. DiFerrante NM, Ginsburg LC, Donnelly PV, DiFerrante DT, Caskey CT. Deficiencies of glucosamine-6-sulfate or galactosamine-6-sulfate sulfatases are responsible for different mucopolysaccharidoses. *Science* 199: 79-81, 1978.

11. Hopwood JJ, Morris CP. The mucopolysaccharidoses. Diagnosis, molecular genetics and treatment. *Mol Biol Med.* 1990 Oct;7(5):381-404.
12. Leistner, Sandra; Giugliani, Roberto. - A useful routine for biochemical detection and diagnosis of mucopolysaccharidoses. *Genet. mol. biol;* 21(1):163-7, Mar. 1998.
13. Lowry RB, Applegarth DA, Toone JR, MacDonald E, Thunem NY. An update on the frequency of mucopolysaccharide syndromes in British Columbia. *Hum Genet.* 1990 Aug;85(3):389-90.
14. Masue M, Sukegawa K, Orii T, Hashimoto T. N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase in human placenta: purification and characteristics. *J Biochem (Tokyo).* 1991 Dec;110(6):965-70.
15. Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA.* 1999 Jan 20;281(3):249-54.
16. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988 Feb 11;16(3):1215.
17. Morquio L. Sur une forme de dystrophie osseuse familiale. *Bull. Soc. Pediat. Paris* 27: 145-152, 1929.
18. Muenzer J. The mucopolysaccharidoses: a heterogeneous group of disorders with variable pediatric presentations. *J Pediatr.* 2004 May;144(5 Suppl):S27-34. Review.
19. Nakashima Y, Tomasu S, Hori T, Fukuda S, Sukegawa K, Kondo N, Suzuki Y, Shimozawa N, Orii T. Mucopolysaccharidosis IV A: molecular cloning of the human N-acetylgalactosamine-6-sulfatase gene (GALNS) and analysis of the 5-prime-flanking region. *Genomics* 20: 99-104, 1994.
20. Nelson J. Incidence of the mucopolysaccharidoses in Northern Ireland. *Hum Genet.* 1997 Dec;101(3):355-8.
21. Nelson J, Crowhurst J, Carey B, Greed L. Incidence of the mucopolysaccharidoses in Western Australia. *Am J Med Genet A.* 2003 Dec 15;123(3):310-3. Review.

22. Neufeld EF e Muenzer J. The mucopolysaccharidoses. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. The metabolic and molecular basis of inherited disease. New York: McGraw-Hill, 2001: 3421-3452.
23. Northover H, Cowie RA, Wraith JE. Mucopolysaccharidosis type IVA (Morquio syndrome): a clinical review. *J Inherit Metab Dis.* 1996;19(3):357-65. Review.
24. Ogawa T, Tomatsu S, Fukuda S, Yamagishi A, Rezvi GM, Sukegawa K, Kondo N, Suzuki Y, Shimozawa N, Oru T. Mucopolysaccharidosis IVA: screening and identification of mutations of the N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase gene. *Hum Mol Genet.* 1995 Mar;4(3):341-9.
25. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989a Apr;86(8):2766-70.
26. Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics.* 1989 Nov;5(4):874-9.
27. Pinto R, Caseiro C, Lemos M, Lopes L, Fontes A, Ribeiro H, Pinto E, Silva E, Rocha S, Marcao A, Ribeiro I, Lacerda L, Ribeiro G, Amaral O, Sa Miranda MC. Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal. *Eur J Hum Genet.* 2004 Feb;12(2):87-92.
28. Poorthuis BJ, Wevers RA, Kleijer WJ, Groener JE, de Jong JG, van Weely S, Niezen-Koning KE, van Diggelen OP. The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. *Hum Genet.* 1999 Jul-Aug;105(1-2):151-6.
29. Saínz C M, Muñoz C Z, Monteagudo A G-Q. Errores innatos del metabolismo. Enfermedades lisosomales / Metabolism inborn errors. *Lysosomal storage diseases. Rev. cuba. pediatr;* 74(1):68-76, ene.-mar. 2002.
30. Santana P M. Las mucopolisacaridosis / The mucopolysaccharidosis. *Rev. chil. nutr;* 31(1):8-16, abr. 2004.
31. Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, Stone EM. The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics.* 1993 May;16(2):325-32.
32. Sukegawa K, Nakamura H, Kato Z, Tomatsu S, Montano AM, Fukao T, Toietta G, Tortora P, Orii T, Kondo N. Biochemical and structural analysis of missense

- mutations in N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase causing mucopolysaccharidosis IVA phenotypes. *Hum Mol Genet.* 2000 May 22;9(9):1283-90.
33. Terzioglu M, Tokatli A, Coskun T, Emre S. Molecular analysis of Turkish mucopolysaccharidosis IVA (Morquio A) patients: identification of novel mutations in the N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase (GALNS) gene. *Hum Mutat.* 2002 Dec;20(6):477-8.
  34. Tomatsu S, Fukuda S, Masue M, Sukegawa K, Fukao T, Yamagishi A, Hori T, Iwata H, Ogawa T, Nakashima Y, et al. Morquio disease: isolation, characterization and expression of full-length cDNA for human N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991 Dec 16;181(2):677-83.
  35. Tomatsu S, Orii KO, Islam MR, Shah GN, Grubb JH, Sukegawa K, Suzuki Y, Orii T, Kondo N, Sly WS. Methylation patterns of the human beta-glucuronidase gene locus: boundaries of methylation and general implications for frequent point mutations at CpG dinucleotides. *Genomics.* 2002 Mar;79(3):363-75.
  36. Tomatsu S, Okamura K, Taketani T, Orii KO, Nishioka T, Gutierrez MA, Velez-Castrillon S, Fachel AA, Grubb JH, Cooper A, Thornley M, Wraith E, Barrera LA, Giugliani R, Schwartz IV, Frenking GS, Beck M, Kircher SG, Paschke E, Yamaguchi S, Ullrich K, Isogai K, Suzuki Y, Orii T, Kondo N, Creer M, Noguchi A. Development and testing of new screening method for keratan sulfate in mucopolysaccharidosis IVA. *Pediatr Res.* 2004a Apr;55(4):592-7. Epub 2004 Jan 7.
  37. Tomatsu S, Smith M, Orii T. Natural history of MPS IVA: Clinical aspects. Abstracts. In: 8<sup>th</sup> International Symposium on Mucopolysaccharide and Related Diseases. New therapeutic strategies – what can we hopefully expect? June 10-13, 2004b; Rheingoldhalle Mainz, Germany. P29. p 25.
  38. Tomatsu S, Okamura K, Taketani T, Orii KO, Nishioka T, Gutierrez MA, Velez-Castrillon S, Fachel AA, Grubb JH, Cooper A, Thornley M, Wraith E, Barrera LA, Giugliani R, Schwartz IV, Schulze Frenking G, Beck M, Kircher SG, Paschke E, Yamaguchi S, Ullrich K, Isogai K, Suzuki Y, Orii T, Kondo N, Noguchi A. Natural History of MPS IVA: Biochemical Aspects. Abstracts. In: 8<sup>th</sup> International Symposium on Mucopolysaccharide and Related Diseases. New therapeutic strategies – what can we hopefully expect? June 10-13, 2004c; Rheingoldhalle Mainz, Germany. P28. p 25.
  39. Tomatsu S, Nishioka T, Montano AM, Gutierrez MA, Pena OS, Orii KO, Sly WS, Yamaguchi S, Orii T, Paschke E, Kircher SG, Noguchi A. Mucopolysaccharidosis

IVA: identification of mutations and methylation study in GALNS gene. *J Med Genet.* 2004d Jul;41(7):e98

40. Tomatsu S, Dieter T, Schwartz IV, Sarmient P, Giugliani R, Barrera LA, Guelbert N, Kremer R, Repetto GM, Gutierrez MA, Nishioka T, Serrato OP, Montano AM, Yamaguchi S, Noguchi A. Identification of a common mutation in mucopolysaccharidosis IVA: correlation among genotype, phenotype, and keratan sulfate. *J Hum Genet.* 2004e;49(9):490-4. Epub 2004 Aug 11.
41. Tomatsu S, Filocamo M, Orii KO, Sly WS, Gutierrez MA, Nishioka T, Serrato OP, Di Natale P, Montano AM, Yamaguchi S, Kondo N, Orii T, Noguchi A. Mucopolysaccharidosis IVA (Morquio A): identification of novel common mutations in the N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase (GALNS) gene in Italian patients. *Hum Mutat.* 2004f Aug;24(2):187-8.
42. Tomatsu S, Gutierrez M, Nishioka T, Grubb J, Sly W. Development of a therapeutic bone-targeting system for mucopolysaccharidoses. In: Abstracts of The American Society of Human Genetics 55<sup>th</sup> Annual Meeting; 2005a Oct 25-29; Salt Lake City, Utah, USA. p. 444 (2458/F).
43. Tomatsu S, Montano AM, Nishioka T, Gutierrez MA, Pena OM, Tranda Firescu GG, Lopez P, Yamaguchi S, Noguchi A, Orii T. Mutation and polymorphism spectrum of the GALNS gene in mucopolysaccharidosis IVA (Morquio A). *Hum Mutat.* 2005b Dec;26(6):500-12.
44. van Diggelen OP, Zhao H, Kleijer WJ, Janse HC, Poorthuis BJ, van Pelt J, Kamerling JP, Galjaard H. A fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of Morquio disease type A (MPS IV A). *Clin Chim Acta.* 1990 Feb 28;187(2):131-9.
45. Vellodi A. Lysosomal storage disorders. *Br J Haematol.* 2005 Feb;128(4):413-31. Review
46. Wilcox WR. Lysosomal storage disorders: the need for better pediatric recognition and comprehensive care. *J Pediatr.* 2004 May;144(5 Suppl):S3-14. Review.