

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**MUCOPOLISSACARIDOSE IVA:
ANÁLISE MOLECULAR E CARACTERIZAÇÃO DE
HAPLÓTIPOS INTRAGÊNICOS NO GENE *GALNS***

ALINE NEMETZ BOCHERNITSAN

Porto Alegre

2015

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**MUCOPOLISSACARIDOSE IVA:
ANÁLISE MOLECULAR E CARACTERIZAÇÃO DE
HAPLÓTIPOS INTRAGÊNICOS NO GENE *GALNS***

ALINE NEMETZ BOCHERNITSAN

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Sandra Leistner Segal

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

Porto Alegre

2015

CIP - Catalogação na Publicação

Nemetz Bochernitsan, Aline

Mucopolissacaridose IVA: Análise molecular e caracterização de haplótipos intragênicos no gene GALNS / Aline Nemetz Bochernitsan. -- 2015.
55 f.

Orientador: Sandra Leistner Segal.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Mucopolissacaridose IVA. 2. Análise Molecular.
3. Análise de haplótipos. I. Leistner Segal, Sandra, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Sandra Leistner Segal e à Ana Carolina Brusius Facchin, pela oportunidade de realizar este trabalho, pela ajuda, dedicação e ensinamentos durante todos esses anos.

A todas colegas, ex-colegas e grandes amigas do Laboratório de Genética Molecular do Serviço de Genética Médica do HCPA, em especial à minha querida IC Rowena Rubim pela grande ajuda em todas as etapas deste trabalho e a Isabel Bandeira por estar sempre disposta a me ajudar independentemente da hora que fosse.

Ao Dr. Roberto Giugliani, ao apoio e oportunidade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas e à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela oportunidade de realizar este trabalho e obter este título.

Ao Serviço de Genética Médica, pela estrutura de trabalho, ensinamentos e amizades conquistadas.

A todas minhas amigas, principalmente à Christina Suksteris e a Manuella Fernandes, pelo carinho e por entenderem minha ausência em muitos momentos.

À minha família, por todo carinho, apoio e compreensão durante a realização deste trabalho.

Resumo

Introdução: Mucopolissacaridose IVA é uma doença lisossômica, autossômica recessiva, causada pela deficiência da enzima *N*-acetilgalactosamina-6-sulfatase. É uma doença rara e a incidência varia de 1:76.000 a 1:640.000 recém-nascidos vivos. Até o momento 319 diferentes mutações causadoras da doença já foram identificadas, o que demonstra a ampla variabilidade genética. **Objetivo:** Caracterizar o genótipo de pacientes com MPS IVA, analisar 6 polimorfismos intragênicos e identificar os haplótipos presentes em nossos pacientes, através do estudo molecular do gene *GALNS*. **Métodos:** O estudo foi realizado em 45 pacientes provenientes das regiões Nordeste, Sudeste, e Sul do Brasil, com diagnóstico bioquímico confirmado para MPS IVA. A análise molecular foi realizada através de PCR seguida de sequenciamento, pelo método de Sanger, a fim de identificar as mutações causadoras da doença. Para o estudo de haplótipos foram analisados 6 polimorfismos intragênicos através de PCR em Tempo Real, pelo método Taqman, em pacientes e controles. **Resultados:** A análise do gene *GALNS*, nos 45 pacientes, permitiu a identificação de 18 diferentes mutações, e a caracterização de 6 haplótipos distintos. Das 18 mutações encontradas, 5 apresentaram uma alta frequência (p.Ser341Arg, p.Arg386Cys, p.Gly301Cys, p.Arg94Leu e p.Gly116Ser), além disso, foram encontradas 4 novas mutações em outros três pacientes (p.Gly115Arg, p.Asn45Gly, p.Thr394Ala e c.759-2A>G). Dentre as mutações encontradas com maior frequência, a mutação p.Ser341Arg foi identificada em um maior número de pacientes, sendo a maioria proveniente da região Nordeste. Além disso, todos os pacientes com esta mutação apresentaram um único haplótipo. **Conclusão:** Os resultados obtidos permitiram a identificação de 18 mutações dentre elas 4 novas mutações. A alta frequência da mutação p.Ser341Arg no Nordeste do Brasil, principalmente no estado da Paraíba nos leva a inferir um possível efeito fundador da doença. Esta mutação foi observada somente na população brasileira e todos os pacientes com mutação em homozigose apresentaram um único haplótipo. Estas análises são importantes para identificar portadores nas famílias, para diagnóstico pré-natal, e também como forma de identificar uma origem comum em mutações frequentes em determinadas populações.

Palavras-chave: Mucopolissacaridose IVA, *GALNS*, Análise molecular, Análise de haplótipos

Abstract

Background: Mucopolysaccharidosis IVA is an autosomal recessive lysosomal disease, caused by deficiency of *N*-acetylglucosaminase-6-sulfatase. It is a rare disease and the incidence ranges from 1: 76,000 to 1:640,000 live births. To date 319 mutations have been identified in this gene, demonstrating the wide variability of disease causing mutations. **Objective:** Analyze and characterize the genotype of patients with MPS IVA, through molecular analysis of GALNS. **Methods:** Molecular analysis of 45 patients with confirmed biochemical diagnosis for MPS IVA was performed. Mutation analysis was performed by PCR followed by Sanger sequencing. Haplotype analysis was performed using 6 intragenic polymorphisms by Real-Time PCR. **Results:** In this study we found 18 different mutations among 45 Brazilian patients and identified 5 common mutations (p.Ser341Arg, p.Arg386Cys, p.Gly301Cys, p.Arg94Leu e p.Gly116Ser). Four novel mutations were also identified through molecular analysis, including: p.Gly115Arg, p.Asn45Gly, p.Thr394Ala e c.759-2A>G. Patients are distributed in Northeast, Southeast and South regions of Brazil. Six different haplotypes were identified among patients. The p.Ser341Arg mutation showed the highest frequency, and most patients are located in the Northeast, additionally, all patients with this mutation show the same haplotype. **Conclusion:** These analyzes are important to identify carriers in families, for prenatal diagnosis, and in order to identify the mutation origin when certain recurrent mutation is associated with the same haplotype. In this study, we observed a high frequency of p.Ser341Arg mutation in Northeast, mainly in the state of Paraíba. This mutation was detected with higher frequency among patients, and showed only a haplotype. This mutation is unique for the Brazilian population and thus, we could suggest that a possible founder effect for this mutation could exist.

Key words: Mucopolysaccharidosis IVA, GALNS, Molecular Analysis, Haplotype analysis

Lista de tabelas

TABELA 1: Classificação das MPS..... 16

TABELA 2: Tipos de mutações identificadas no gene *GALNS* 24

Lista de figuras

FIGURA 1: Estratégia e resultado de busca de referências bibliográficas.....	11
FIGURA 2: Sítio de clivagem dos grupos fosfatos pela enzima GALNS.....	18
FIGURA 3: Mapeamento das mutações no gene GALNS	19
FIGURA 4: Manifestações clínicas de MPS IVA	20
FIGURA 5: Algoritmo de diagnóstico para MPS IVA	22
FIGURA 6: Localização e estrutura do gene <i>GALNS</i>	24

Lista de siglas e abreviaturas

cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
C6S	Condroitin-6-Sulfato
DL	Doenças lisossômicas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DS	Dermatan Sulfato
GAGs	Glicosaminoglicanos
GALNS	N-acetilgalactosamina-6-sulfatase
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HGMD	<i>Human Gene Mutation Database</i>
HS	Heparan Sulfato
Kb	Kilobases
MPS	Mucopolissacaridose(s)
MPS IVA	Mucopolissacaridose IVA
pb	Par de base
QS	Queratan Sulfato
RFLP	<i>Restriction Fragment length Polimorphism</i>
SGM	Serviço de Genética Médica
SIPF	Sangue impregnado em papel filtro
TCTH	Transplante de células tronco hematopoiéticas
TRE	Terapia de Reposição enzimática
TG	Terapia Gênica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DA LITERATURA	11
2.1. ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES	11
2.2. ERROS INATOS DO METABOLISMO	13
2.3. DOENÇAS LISSÔMICAS	14
2.4. MUCOPOLISSACARIDOSES	15
2.4.1 Mucopolissacaridose IVA	17
2.4.1.1 Manifestações Clínicas	19
2.4.1.2 Incidência	21
2.4.1.3 Diagnóstico	21
2.4.1.4 Tratamento	22
2.4.1.5 Aspectos Genéticos e Moleculares	23
2.5 CASAMENTOS CONSANGUÍNEOS E ISOLADOS	26
2.5.1 Isolados genéticos no Brasil	26
3. JUSTIFICATIVA	28
4. OBJETIVOS	29
OBJETIVOS SECUNDÁRIOS	29
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
6. ARTIGOS	35
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	52
8. ANEXOS	53

1. INTRODUÇÃO

A Síndrome de Morquio A, também conhecida como Mucopolissacaridose IVA, é uma Doença Lisossômica (DL) de herança autossômica recessiva. É causada pela deficiência da enzima *N*-acetilgalactosamina-6-sulfatase, envolvida na degradação dos glicosaminoglicanos (GAGs) Queratan Sulfato (QS) e Condroitin-6-Sulfato (C6S) os quais ficam acumulados no interior de órgãos e tecidos, levando as manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes (Tomatsu *et al.*, 2011; Khedhiri *et al.*, 2011).

Existe um amplo espectro de manifestações clínicas, desde a forma clássica (grave) até formas mais leves (fenótipo atenuado). Os pacientes não apresentam as características clínicas da doença ao nascimento, porém há uma progressão dos sintomas ao longo dos anos (Montano *et al.*, 2007; Harmatz *et al.*, 2013).

O gene *GALNS* foi mapeado no cromossomo 16q24.3, sendo composto por 14 éxons e 13 íntrons com tamanho aproximado de 50 Kb (Nakashima *et al.*, 1994). Até o momento, foram descritas 319 diferentes mutações, sendo a maioria do tipo *missense* (HGMD, 2015). Esta grande heterogeneidade das alterações gênicas pode dificultar a interpretação dos resultados dos testes moleculares, pois mutações novas e variantes de significado incerto são detectadas frequentemente e muitas mutações são identificadas em apenas um paciente ou família. Entretanto, algumas destas mutações, apesar de serem raras, são observadas em mais de um paciente não relacionado dependendo da população estudada (Morrone *et al.*, 2014; Caciotti *et al.*, 2015).

No Brasil, as mutações p.Gly139Ser, p.Gly116Ser, p.Asn164Thr, p.Leu307Pro e p.Ser341Arg, apresentam uma alta frequência, segundo estudos realizados por Tomatsu e colaboradores (2004; 2005). A mutação p.Ser341Arg, após análise envolvendo pacientes brasileiros, foi encontrada apenas em pacientes provenientes da região Nordeste, sendo a maioria do estado da Paraíba. (Kubaski, 2012). Os resultados deste estudo levantaram a hipótese de um possível *cluster* da doença devido a um efeito fundador.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Estratégias para localizar e selecionar as informações

A busca dos artigos para a revisão da literatura desta dissertação teve como foco os aspectos relacionados aos Erros Inatos do Metabolismo, Doenças Lisossômicas, Mucopolissacaridoses, e principalmente à Mucopolissacaridose IVA, incluindo artigos que relatam as manifestações clínicas, epidemiologia, tratamento, aspectos moleculares e análise de haplótipos.

Foram utilizadas três bases de dados, incluindo: *PubMed*, *SciELO* e *LILACS*. A partir dos resultados encontrados, os artigos foram selecionados conforme sua relevância em relação ao assunto abordado nesta revisão. A Figura 1 apresenta as palavras-chaves e as combinações utilizadas nestas buscas.

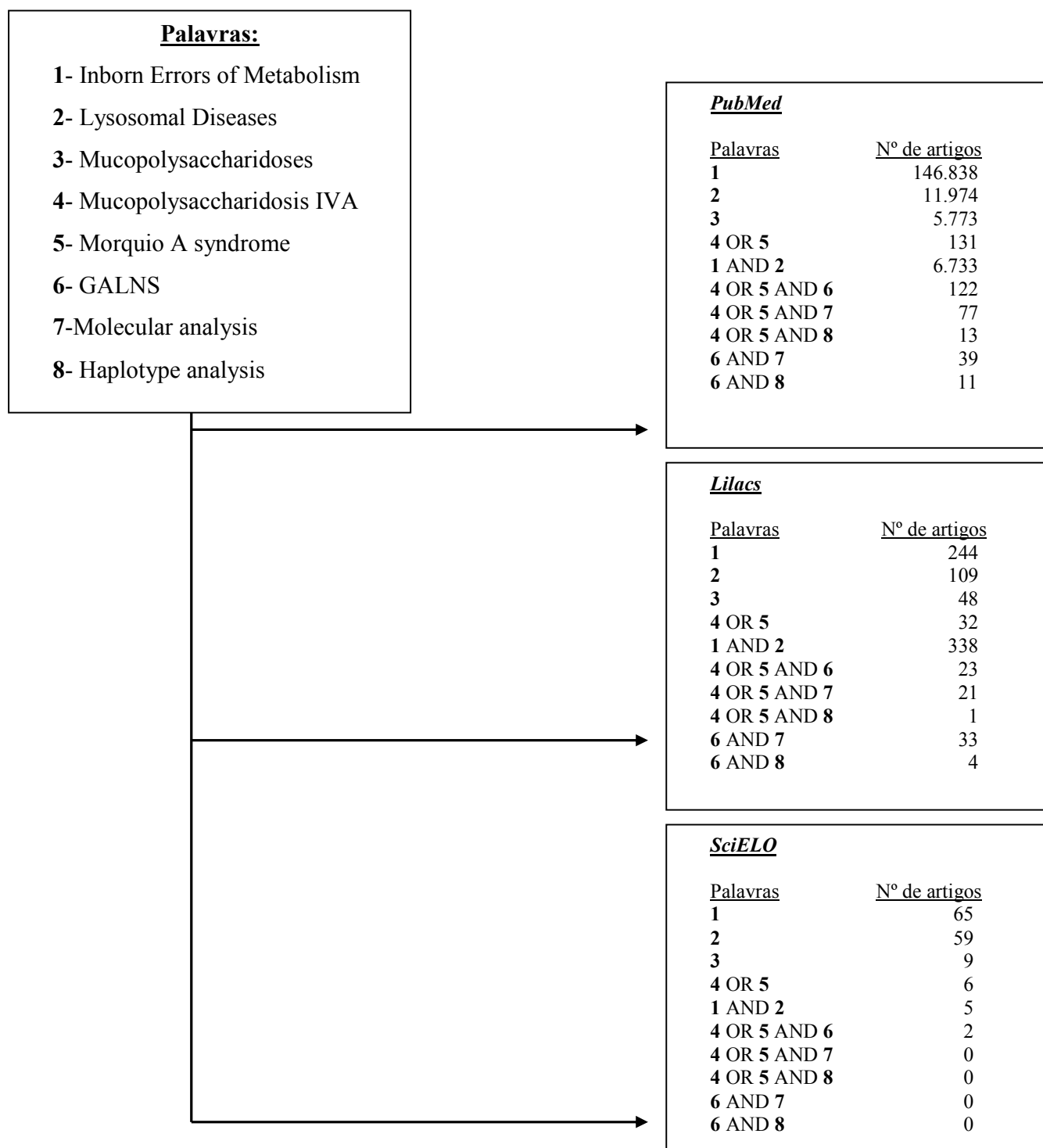


Figura 1: Estratégia e resultado de busca de referências bibliográficas

2.2. Erros Inatos do Metabolismo

Os Erros Inatos do Metabolismo (EIM) são um conjunto de doenças hereditárias consideradas individualmente raras. Ocorrem devido a alterações gênicas que podem causar falha de síntese, degradação, transporte e/ou armazenamento de moléculas no organismo, resultando no bloqueio total ou parcial de determinada via metabólica. Como consequência a este bloqueio, pode ocorrer o acúmulo de substrato de uma reação, a falta de produto da reação ou ainda o acúmulo de produtos tóxicos originados através de uma via metabólica alternativa (Mak *et al.*, 2013).

A incidência de cada uma destas doenças é baixa, sendo consideradas doenças raras. No entanto, já foram descritos mais de 1000 distúrbios classificados como EIM, sendo então consideradas coletivamente comuns, com incidência mundial estimada podendo chegar a mais de 1:800 nascidos vivos (Mak *et al.*, 2013).

Devido ao número elevado de doenças bastante distintas dentro dos EIM, diferentes formas de classificação têm sido propostas na literatura. De acordo com Saudubray *et al.*, (2012) foram estabelecidos 3 grandes grupos conforme suas características fisiopatológicas:

- a) **Grupo 1** - Defeitos no metabolismo intermediário: Dão origem a uma intoxicação aguda ou progressiva, resultante do acúmulo de compostos tóxicos próximos ao bloqueio metabólico. Estão incluídas neste grupo as aminoacidopatias, acidemias orgânicas, defeitos no ciclo da uréia, intolerância a açúcares, intoxicação por metais e as porfírias.
- b) **Grupo 2** – Defeitos do metabolismo energético: São EIM que afetam o funcionamento normal do metabolismo intermediário levando a deficiência na produção ou utilização de energia, resultante de um defeito no fígado, músculo, miocárdio, cérebro, entre outros tecidos. Estão incluídas neste grupo as glicogenoses, defeitos na gliconeogênese, acidemias lácticas congênitas, defeitos da oxidação de ácidos graxos e defeitos da cadeia respiratória mitocondrial.
- c) **Grupo 3** – Defeitos na síntese ou catabolismo de moléculas complexas: São doenças que resultam de alterações da síntese ou o catabolismo de moléculas complexas. Estão

incluídas neste grupo as doenças peroxissomais, doenças de tráfico e processamento de proteínas intracelulares e doenças lisossômicas.

2.3. Doenças Lisossômicas

As Doenças Lisossômicas (DL) são um grupo heterogêneo dos EIM que compreendem mais de 50 doenças. São causadas pela deficiência de alguma enzima lisossômica específica ou defeitos no receptor, proteína ativadora, proteína de membrana ou ainda proteína de transporte. Como consequência, as macromoléculas não degradadas ou parcialmente degradadas, acumulam-se progressivamente no interior dos lisossomos de diversos tecidos (Gieselmann, 1995; Wilcox, 2004; Filocamo and Morrone, 2011; Kadali *et al.*, 2014).

Este acúmulo resulta em quadros clínicos complexos, apresentando um envolvimento multissistêmico devido aos danos nas funções celulares e teciduais (Wraith, 2002; Vellodi, 2005; Brand *et al.*, 2013; Lampe *et al.*, 2013). Os pacientes apresentam manifestações clínicas extremamente variáveis que dependem da macromolécula específica que é acumulada e sua quantidade, do local de produção e degradação dos metabolitos específicos e da expressão enzimática residual (Winchester *et al.*, 2000).

São doenças monogênicas autossômicas recessivas, com exceção da doença de Fabry, Mucopolissacaridose tipo II (Síndrome de Hunter) e a doença de Danon que possuem herança ligada ao cromossomo X (Gieselmann, 1995; Kadali *et al.*, 2014).

De acordo com a deficiência enzimática e o substrato não degradado, as DL podem ser classificadas em: Esfingolipidoses, Oligossacaridoses, Mucolipidoses, Lipofuscinoses, Mucopolissacaridoses entre outros (Ruivo *et al.*, 2009; Parkinson-Lawrence *et al.*, 2010; Kadali *et al.*, 2014). Nas Mucopolissacaridoses a deficiência enzimática leva ao acúmulo dos GAGs.

2.4. Mucopolissacaridoses

As Mucopolissacaridoses (MPS) são doenças hereditárias causadas por mutações em genes que codificam uma das onze enzimas lisossomais necessárias para que ocorra a degradação gradual dos GAGs (Neufeld, E. F. and Muenzer, 2001).

Os GAGs são formados por cadeias de polissacarídeos não ramificadas, compostas por unidades repetidas de dissacarídeos (Wraith, 1995). Quando os GAGs estão ligados a proteínas, formam-se moléculas mais complexas denominadas proteoglicanos, sendo estes parte essencial da matriz extracelular de diversos tecidos (Neufeld, E. F. and Muenzer, J., 2001; Lampe *et al.*, 2013). Os GAGs estão envolvidos na estabilização da matriz fibrilar extracelular, controle de hidratação, regulação de tecido, desenvolvimento do organismo pelo controle do ciclo celular, comportamento celular e diferenciação celular (Viola *et al.*, 2012).

É possível classificar os diferentes GAGs de acordo com seus açúcares, o tipo de ligação que existe entre eles e o número e localização dos grupos sulfatos. Os grupos principais são: Condroitin Sulfato (CS), Dermatan Sulfato (DS), Heparan Sulfato (HS), Queratan Sulfato (QS) e Ácido Hialurônico (Wraith, 1995; Byers *et al.*, 1998).

Diversas enzimas atuam de forma sequencial na degradação dos GAGs, e dependendo da enzima deficiente, o catabolismo de DS, CS, HS, QS e Ácido Hialurônico podem ser interrompidos isoladamente ou em combinação, levando aos diferentes tipos de MPS.. Estas doenças são caracterizadas pelo acúmulo dos GAGs não degradados ou parcialmente degradados dentro dos lisossomos, além de serem excretados em quantidade aumentada na urina. Como consequência, ocorre disfunção de células, tecidos e órgãos. As MPSs possuem um curso progressivo, multissistêmico e apresentam redução na expectativa de vida (Wraith, 1995; Byers *et al.*, 1998; Neufeld, E. F. and Muenzer, J., 2001; Tomatsu *et al.*, 2013).

As MPS são classificadas de acordo com as 11 deficiências enzimáticas que dão origem a 7 tipos de MPS e correspondem a nove fenótipos clínicos: Hurler, Hurler-Scheie, Scheie, Hunter, Sanfilippo, Morquio, Maroteaux-Lamy, Sly e Natowicz. A classificação das MPS está apresentada na tabela 1 (Neufeld, E. F. and Muenzer, J., 2001; Muenzer, 2004).

Tabela 1: Classificação das MPS.

MPS	Epônimo	Enzima Deficiente	Sigla	GAGs na urina	Herança	Localização do gene
I	Hurler, Hurler-Scheie, Scheie	α -L-iduronidase	<i>IDUA</i>	Dermatan e Heparan Sulfato	Autossômica recessiva	4p16.3
II	Hunter	Iduronato-2-sulfatase	<i>IDS</i>	Dermatan e Heparan Sulfato	Ligada ao X recessiva	Xq28
IIIA	Sanfilippo A	Heparan- <i>N</i> -sulfatase	<i>SGSH</i>	Heparan Sulfato	Autossômica recessiva	17q25.3
IIIB	Sanfilippo B	α -N-acetilglicosaminidase	<i>NAGLU</i>	Heparan Sulfato	Autossômica recessiva	17q21
IIIC	Sanfilippo C	AcetilCoA: α -glicosamina acetiltransferase	<i>HGSNAT</i>	Heparan Sulfato	Autossômica recessiva	8q11-8p11
IIID	Sanfilippo D	<i>N</i> -acetilglicosamina-6-sulfatase	<i>GNS</i>	Heparan Sulfato	Autossômica recessiva	12q14
IVA	Morquio A	<i>N</i> -acetilgalactosamina-6-sulfatase	<i>GALNS</i>	Queratan Sulfato	Autossômica recessiva	16q24.3
IVB	Morquio B	B-galactosidase	<i>GLB1</i>	Queratan Sulfato	Autossômica recessiva	3p21.33
VI	Maroteaux-Lamy	<i>N</i> -acetilgalactosamina-4-sulfatase	<i>ARSB</i>	Dermatan Sulfato	Autossômica recessiva	5q13-q14
VII	Sly	β -glicuronidase	<i>GUSB</i>	Dermatan e Heparan Sulfato	Autossômica recessiva	7q21.11
IX	Natowicz	Hialuronidase	<i>HYAL1</i>	Ácido Hialurônico	Autossômica recessiva	3p21.2-p21.3

A maioria dos pacientes é assintomático ao nascimento, com aparecimento posterior de sinais e sintomas clínicos. A idade de início dos sintomas e a gravidade clínica da doença podem variar significativamente. São caracterizadas pelo envolvimento de diversos sistemas, incluindo: sistema respiratório, cardiopulmonar, músculo-esquelético, gastrointestinal e neurológico (Muenzer, 2014).

São doenças consideradas raras, porém apresentam uma incidência mundial conjunta estimada em mais de 1:25.000 nascidos vivos (Tomatsu, *et al.*, 2015). No Brasil os dados sobre a incidência das MPS são escassos, porém existe no país uma parceria de centros brasileiros que atendem pacientes com MPS (Rede MPS Brasil), com o centro coordenador localizado no Serviço de Genética Médica (SGM) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

De acordo com os dados disponibilizados pela Rede MPS Brasil, até novembro de 2015, foram diagnosticados 1.056 pacientes brasileiros com MPS, sendo: 217 com MPS I, 330 com MPS II, 115 com MPS III (IIIA: 48, IIIB: 79, IIIC: 48), 141 com MPS IVA, 14 com MPS IVB, 223 com MPS VI e 16 com MPS VII. O enfoque deste trabalho será a MPS IVA.

2.4.1 Mucopolissacaridose IVA

Dentro do grupo das MPS está a Mucopolissacaridose IV (MPS IV, Síndrome de Morquio), que é causada pela deficiência de duas diferentes enzimas que dão origem a dois subtipos (A e B). A atividade deficiente da *N*-acetilgalactosamina-6-sulfatase causa a MPS IVA (OMIM 253000) e a atividade deficiente da β -galactosidase causa a MPS IVB (OMIM 256540) (Neufeld, E. F. and Muenzer, J., 2001; Tomatsu *et al.*, 2005).

A MPS IVA, também conhecida como Síndrome de Morquio A, foi descrita pelo pediatra Luis Morquio (Morquio, 1929) no Uruguai e pelo radiologista James Brailsford (Brailsford, 1929) na Inglaterra, aproximadamente ao mesmo tempo. É uma doença monogênica com herança autossômica recessiva, causada por mutações no gene que codifica a enzima *N*-acetilgalactosamina-6-sulfatase (GALNS, EC 3.1.6.4), resultando na atividade deficiente desta enzima lisossômica (Neufeld, E. F. and Muenzer, J., 2001).

A GALNS é uma das sulfatases essenciais para degradação dos GAGs (QS) (C6S) (Neufeld, E. F. and Muenzer, J., 2001; Tomatsu *et al.*, 2011). Sua deficiência tem como consequência o acúmulo progressivo dos substratos não degradados ou parcialmente degradados no interior dos lisossomos de diversos tecidos. Estes GAGs também são excretados em grande quantidade na urina (Tomatsu *et al.*, 1997; Tomatsu *et al.*, 1998; Khedhiri *et al.*, 2011; Tomatsu *et al.*, 2011).

A enzima GALNS é um oligômero com massa molecular de 120 kDa, sendo composta por polipeptídios de 40 e 15 kDa que são ligados por pontes dissulfeto (Masue *et al.*, 1991). Ela é responsável por clivar as ligações éster de sulfato, removendo os grupos sulfatos da porção terminal do QS e C6S. Através desta hidrólise, os grupos sulfatos são removidos a partir de uma *N*-acetilgalactosamina-6-sulfato ou galactose-6-sulfato de C6S e QS respectivamente (Figura 2). (Tomatsu *et al.*, 1991; Tomatsu *et al.*, 2011; Rivera-Colon *et al.*, 2012).

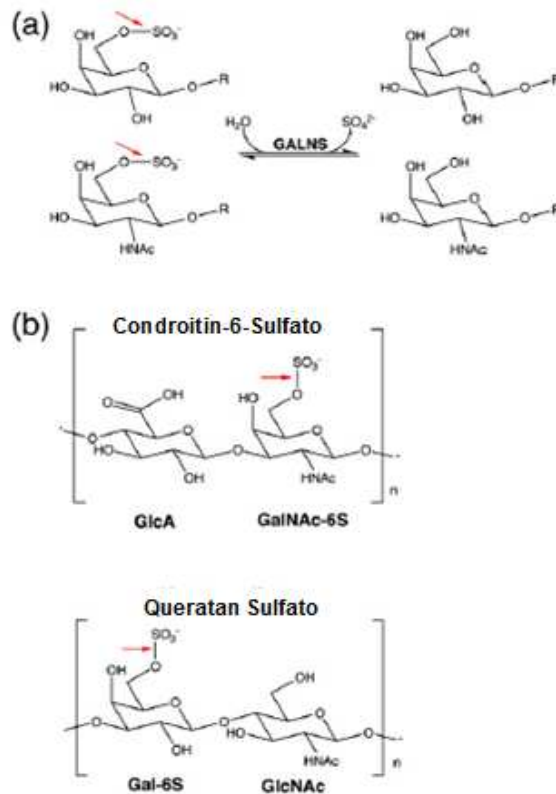


Figura 2: Sítio de clivagem dos grupos sulfato pela enzima GALNS.

(a) GALNS cliva os grupos sulfato (6S) dos dissacarídeos Gal e GalNac. (b) Os substratos desta enzima incluem o C6S e o QS. As setas em vermelho indicam a localização onde ocorrem as clivagens (Adaptado de Rivera-Colon 2012).

Com base na estrutura terciária da enzima foi realizado o mapeamento das mutações causadoras da doença. As alterações são classificadas em 3 categorias (Figura 3): mutações que alteram o sítio ativo, enovelamento anormal da proteína e exposição da superfície. Assim, sugere-se que tratamentos potenciais dependeriam do genótipo do paciente (Sukegawa *et al.*, 2000; Rivera-Colon *et al.*, 2012).

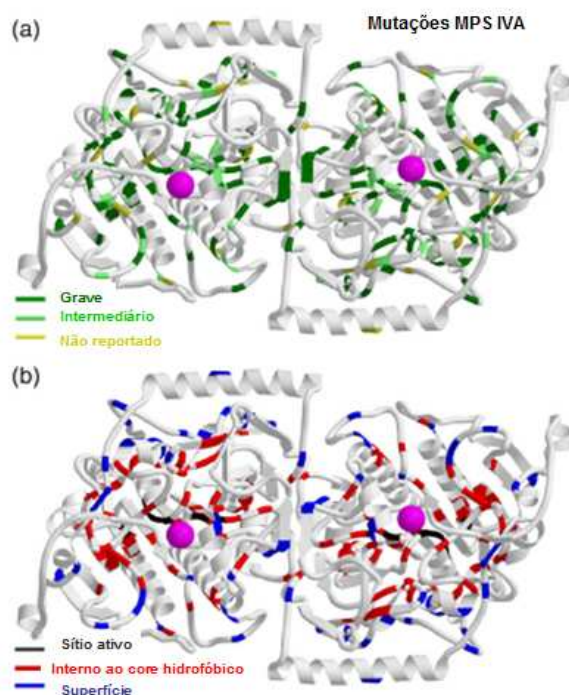


Figura 3: Modelo da estrutura terciária da GALNS indicando os tipos de alterações causadoras da doença (Adaptado de Rivera-Colon, 2012).

2.4.1.1 Manifestações Clínicas

Os aspectos clínicos variam de acordo com a atividade residual da enzima, portanto, o acúmulo de QS e C6S resulta na apresentação clínica da doença (Laradi *et al.*, 2006; Montano *et al.*, 2007; Hendriksz, *et al.*, 2013). Os tecidos ricos nestes GAGs são predominantemente afetados, como as cartilagens, córneas e válvulas cardíacas (Dvorak-Ewell *et al.*, 2010; Hendriksz, *et al.*, 2013).

A doença é caracterizada pelo envolvimento multissistêmico, incluindo os sistemas esquelético, visual, auditivo e cardiopulmonar (Northover *et al.*, 1996; Camelier *et al.*, 2011; Hendriksz, *et al.*, 2013). Entre as principais manifestações está a displasia esquelética levando a baixa estatura. O desenvolvimento cognitivo e mental é normal (Montano *et al.*, 2007).

Geralmente é possível distinguir esta MPS das outras por apresentar manifestações ósseas características e inteligência preservada (Northover *et al.*, 1996). Os pacientes parecem normais

ao nascimento, porém progridem para um estágio avançado da doença em poucos anos. A maioria dos pacientes (mais de 70%) apresenta manifestações clínicas iniciais a partir dos primeiros anos de vida (Montano *et al.*, 2007; Tomatsu *et al.*, 2011).

Existe um amplo espectro de manifestações clínicas, desde a forma clássica (grave) até fenótipos mais leves (forma atenuada), que resultam provavelmente da grande heterogeneidade alélica das mutações causadoras da doença (Bunge *et al.*, 1997; Dieter *et al.*, 2007; Dũng *et al.*, 2013; Hendriksz *et al.*, 2013). Além disso, fatores genéticos adicionais, ambientais e metabólicos também podem estar envolvidos na grande variabilidade fenotípica da doença (Wood *et al.*, 2013).

Os pacientes com a forma clássica da doença possuem expectativa de vida de 20 a 30 anos, desenvolvem graves anomalias esqueléticas e articulares, além de outras manifestações, incluindo: doenças respiratórias, compressão da medula espinhal, doença cardíaca, diminuição da visão, perda da audição, hepatomegalia entre outras (Northover *et al.*, 1996; Montano *et al.*, 2007; Harmatz *et al.*, 2013; Hendriksz *et al.*, 2015).

A forma atenuada da doença começa a se manifestar tardiamente e apresenta envolvimento esquelético leve, além de uma expectativa de vida de 70 anos de idade (Tomatsu *et al.*, 2011; Hendriksz, C. J. *et al.*, 2013). A figura 4 apresenta os diferentes espectros fenotípicos.



Figura 4: Manifestações clínicas de MPS IVA: Aparência típica de pacientes com MPS IVA - baixa estatura com pescoço curto e anormalidades esqueléticas (esquerda) e um paciente com fenótipo leve - apresentando estatura normal (direita) (Hendriksz *et al.*, 2015).

2.4.1.2 Incidência

A MPS IVA é uma doença rara e a incidência varia entre as diferentes populações de 1:76.000 para 1:640.000 nascidos vivos (Hendriksz *et al.*, 2013). Sendo 1:76.000 nascidos vivos na Irlanda do Norte, 1:450.000 na Holanda e Portugal, 1:640.000 no Oeste da Austrália (Hendriksz,*et al.*, 2013; Morrone *et al.*, 2014).

2.4.1.3 Diagnóstico

De acordo com a suspeita clínica são realizados exames laboratoriais a fim de diagnosticar a doença. Realiza-se inicialmente a análise de GAGs na urina, incluindo testes quantitativos, para medir a concentração de GAGs total presentes na amostra, que é aumentada em pacientes com MPSs, e testes qualitativos, para identificar os tipos de GAGs encontrados (Neufeld, E. F. and Muenzer, J., 2001; Lehman *et al.*, 2011; Wood *et al.*, 2013).

Estes exames são utilizados como testes de triagem para as MPSs, porém estão associados a resultados falso-positivos e falso-negativos. Eles servem para orientar a direção de testes enzimáticos específicos a serem realizados. No caso da MPS IVA, o GAG encontrado em concentração aumentada é o QS (Camelier *et al.*, 2011; Hendriksz *et al.*, 2013; Tomatsu *et al.*, 2013).

O diagnóstico definitivo de MPS IVA é realizado através do ensaio enzimático da GALNS em leucócitos ou fibroblastos, demonstrando a atividade deficiente da enzima. Existe também a possibilidade de se realizar previamente o ensaio enzimático em amostras de sangue impregnadas em papel filtro (SIPF), porém o resultado deste teste depende da estabilidade da enzima e das condições de armazenamento da amostra (Wood *et al.*, 2013).

Além disso, deve-se excluir a possibilidade de ocorrer deficiência de outras enzimas que podem ter deficiência da GALNS secundária, como mucopolidose II, III, MPS VI e deficiência múltipla de sulfatases. É possível também realizar a análise molecular do gene para a identificação das mutações causadoras da doença. (Hendriksz, *et al.*, 2013). A figura 5 apresenta o algoritmo de diagnóstico para MPS IVA.

Como se trata de uma doença progressiva, o diagnóstico precoce pode ser crucial para os pacientes, pois permite a detecção antecipada de complicações, além da utilização de medidas de suporte e tratamento, como a Terapia de Reposição Enzimática (TRE). Assim, é possível uma grande melhora na qualidade de vida dos pacientes além de adiar/prevenir o desenvolvimento de quadro clínico irreversível (Lehman *et al.*, 2011; Hendriksz, *et al.*, 2013).

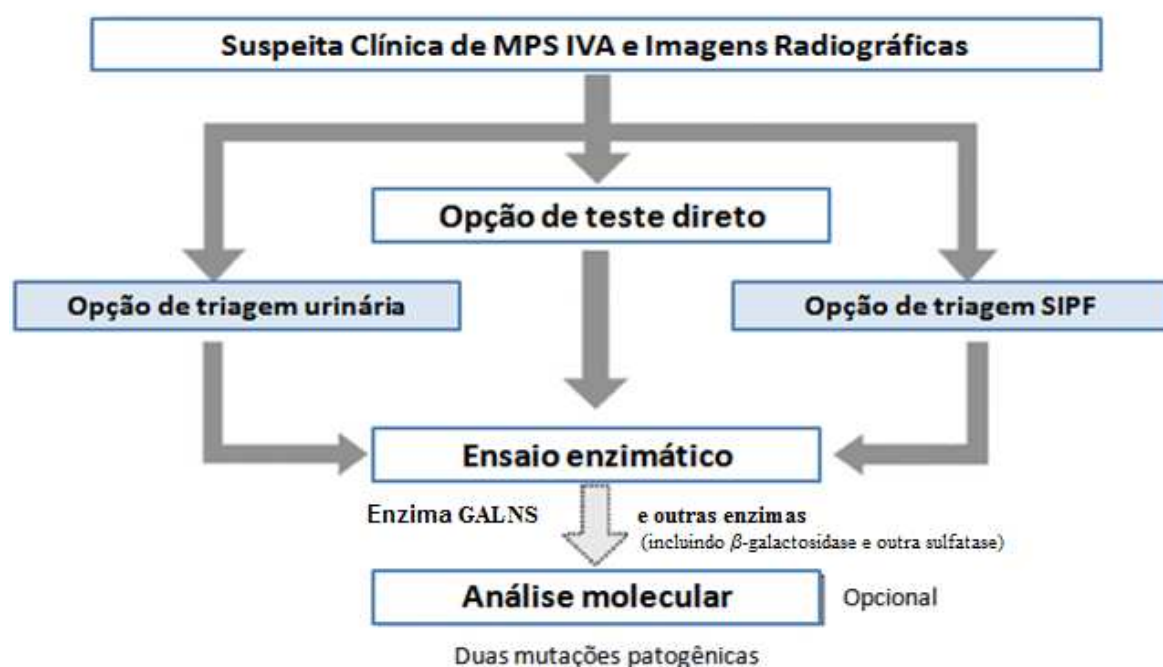


Figura 5: Algoritmo de diagnóstico para MPS IVA (Adaptado de Wood *et al.*, 2013).

2.4.1.4 Tratamento

Até pouco tempo atrás os tratamentos para MPS IVA limitavam-se a medidas paliativas e de suporte a fim de minimizar os sintomas e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Devido à grande diversidade das manifestações clínicas, é necessária uma abordagem multidisciplinar

para tratar os sintomas da doença, incluindo: ortopedistas, pneumologistas, cardiologistas, entre outros (Hendriksz *et al.*, 2015; Algahim and Almassi, 2013).

Atualmente os tratamentos propostos são o Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas (TCTH), Terapia de Reposição Enzimática (TRE) e futuramente a Terapia Gênica (TG) que ainda está em investigação (Tomatsu *et al.*, 2015). A TRE para MPS IVA foi recentemente aprovada em muitos países e consiste em infusões intravenosas regulares da enzima recombinante GALNS humana (elosulfase alfa) (Algahim and Almassi, 2013; Hendriksz *et al.*, 2015). Pacientes tratados com TRE apresentam uma melhora das manifestações clínicas, além de proporcionar uma melhor qualidade de vida principalmente quando o tratamento é realizado no estágio inicial da doença (Tomatsu *et al.*, 2015).

2.4.1.5 Aspectos Genéticos e Moleculares

A análise molecular pode ser utilizada para confirmar o diagnóstico da MPS IVA, além de ser útil para o aconselhamento genético, pois são detectadas as mutações causadoras da doença (Morrone *et al.*, 2014; Wood *et al.*, 2013). A doença é causada por mutações no gene que codifica a enzima *N*-acetilgalactosamina-6-sulfatase (GALNS: E.C.3.1.6.4) (Tomatsu *et al.*, 1991)

Como se trata de uma doença autossômica recessiva, para um indivíduo ser afetado, é necessário que ambos os alelos deste gene contenham mutações que alteram a função da enzima (Wood *et al.*, 2013). O gene *GALNS* está localizado no braço longo do cromossomo 16, na região 16q24.3 (figura 6). Tem tamanho aproximado de 50 Kb, sendo composto por 14 éxons e 13 íntrons, sendo transcrito em um cDNA de 1566 pb que codifica uma proteína de 522 aminoácidos. (Tomatsu *et al.*, 1991; Nakashima *et al.*, 1994).

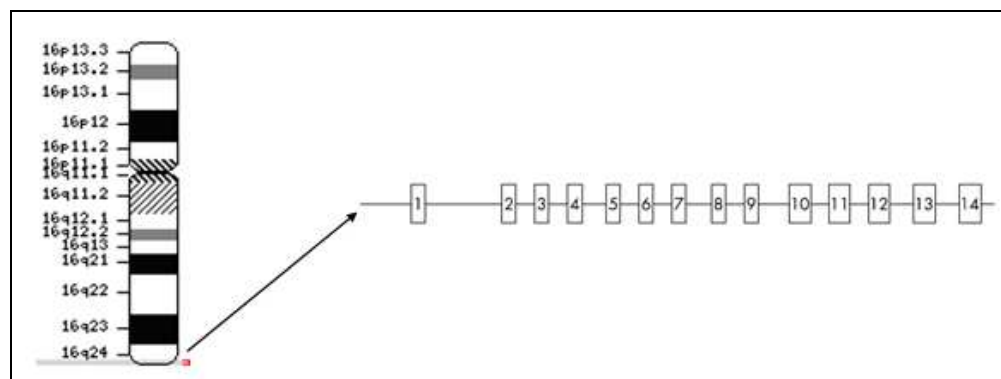


Figura 6: Localização cromossômica e estrutura do gene *GALNS*.

Este gene pertence à família das sulfatases, das quais já foram clonados 13 genes humanos. Os produtos gênicos de todas as sulfatases são extremamente relacionados, apresentando 20-30% de similaridade em nível de aminoácidos (Sukegawa *et al.*, 2000; Dierks *et al.*, 2003; Tomatsu *et al.*, 2005).

As mutações estão distribuídas ao longo de todo o gene e já foram identificados diversos tipos de alterações. Até o momento, foram descritas 319 diferentes mutações (HGMD), incluindo *missense*, *nonsense*, em sítio de *splicing*, pequenas e grandes deleções, pequenas e grandes inserções e rearranjos complexos, conforme apresenta a tabela 2. As mutações *missense* são as mais frequentes, sendo: p.Arg386Cys, p.Gly301Cys e p.Ile113Phe as mais recorrentes no mundo inteiro (Morrone *et al.*, 2014).

Tabela 2: Tipos de mutações identificadas no gene *GALNS*

Tipo de Mutação	Número de mutações
<i>Missense/ Nonsense</i>	239
Em sítio de <i>splicing</i>	29
Pequenas deleções	31
Pequenas inserções	5
Pequenas indels	2
Grandes deleções	8
Grandes inserções/duplicações	2
Rearranjos Complexos	3

Esta grande heterogeneidade das mutações pode dificultar a detecção e a interpretação dos resultados dos testes moleculares, pois mutações novas e variantes de significado incerto são detectadas frequentemente e muitas mutações são identificadas em um paciente ou família. Entretanto, algumas destas mutações, apesar de serem raras, são consideradas recorrentes dependendo da população estudada (Morrone *et al.*, 2014; Caciotti *et al.*, 2015).

Por exemplo, a mutação c.120+1G>A é a quarta alteração do gene mais frequente no mundo, mas a maioria dos relatos é apenas de pacientes da Tunísia. A alteração *missense* c.337A>T (p.Ile113Phe) é a segunda mais frequente, de acordo com dados publicados, porém é encontrada com maior frequência apenas nas Ilhas Britânicas. Portanto, até mesmo as mutações encontradas com alta frequência são raras, embora algumas sejam mais prevalentes em determinadas regiões e subpopulações de grupos étnicos, possivelmente devido a um efeito fundador (Morrone *et al.*, 2014).

No Brasil, as mutações p.Gly139Ser, p.Gly116Ser, p.Asn164Thr, p.Leu307Pro e p.Ser341Arg, foram identificadas com uma alta frequência (Tomatsu *et al.*, 2004; Tomatsu *et al.*, 2005). A mutação p.Ser341Arg foi encontrada apenas em pacientes do Nordeste, sendo a maioria do estado da Paraíba, conforme estudos já realizados (Kubaski, 2012), sugerindo a existência de um *cluster* da doença devido a um possível efeito fundador, o que será investigado mais profundamente no presente estudo.

Além das mutações, mais de 20 polimorfismos já foram descritos neste gene até o momento (Bidchol *et al.*, 2014). Diversos estudos realizaram a análise de haplótipos utilizando polimorfismos intragênicos através de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) como um método indireto para detectar portadores e para o diagnóstico pré-natal nas famílias em que a mutação causadora da doença ainda não tenha sido identificada (Iwata *et al.*, 1995; Rezvi *et al.*, 1996; Khedhiri *et al.*, 2011).

A análise de haplótipos também é importante para estudo de ancestralidade através da identificação da origem de determinadas mutações, pois o haplótipo é um conjunto de alelos situados em um segmento cromossômico que tendem a ser transmitidos em blocos na genealogia, enquanto não desfeitos por recombinação. Sendo assim, torna-se possível identificar se determinada mutação recorrente esta associada ao mesmo haplótipo, o que tornaria possível o entendimento da origem destas mutações e a identificação de possíveis efeitos fundadores

(Tomatsu *et al.*, 2005; Laradi *et al.*, 2006; Khedhiri *et al.*, 2011; Pajares *et al.*, 2012; Khedhiri *et al.*, 2014).

2.5 Casamentos consanguíneos e Isolados

Casamentos consanguíneos são definidos pela união entre indivíduos que tenham pelo menos um ancestral em comum, sendo por tanto, indivíduos biologicamente relacionados (Bittles, 2001). A prevalência de casamentos consanguíneos depende de diversos fatores, incluindo fatores culturais, socioeconômicos, religiosos, além de fatores demográficos (Bronberg *et al.*, 2015).

A principal consequência destas uniões é o aumento do risco da ocorrência de doenças autossômicas recessivas raras (Freire-Maia 1974; Bronberg *et al.*, 2015). Quanto maior o grau de consanguinidade, ou seja, quanto mais próximo for o parentesco entre os indivíduos, maior a chance de os filhos terem doenças autossômicas recessivas (Woods 2006).

Isolado geográfico pode pressupor um isolado genético, (*cluster*) sendo definido pela taxa de prevalência mais alta do que o esperado de determinada doença em uma área geográfica definida por um longo período de tempo. Para doenças genéticas, o que deve ser considerado é a frequência de determinados alelos mutantes. Devido à maioria das sub-populações geneticamente isoladas, por razões geográficas ou culturais, também serem consanguíneas, é esperado observar um número maior de doenças autossômicas recessivas. (Castilla e Schuler-Faccini, 2014).

2.5.1 Isolados genéticos no Brasil

Muitos clusters geográficos de doenças genéticas já são conhecidos no Brasil há muitas décadas. O Nordeste tem o maior número de isolados genéticos comprovados e também de clusters geográficos suspeitos de doenças genéticas (rumores) identificados pelo CENISO (Censo Nacional de Isolados) (Castilla e Schuler-Faccini, 2014).

Como já se sabe, o Nordeste tem a maior prevalência de consanguinidade do país (Weller, 2012; Machado, 2013), isto provavelmente seja resultado de diversos fatores, incluindo o baixo nível de urbanização em muitos locais e as tradições culturais (Weller, 2012). Como exemplo

disso, já foi identificado um *cluster* na cidade de Monte Santo, localizada no interior da Bahia, onde foi observado um elevado número de pacientes com Mucopolissacaridose tipo VI, e através da análise molecular foi detectado que todos estes pacientes apresentavam a mesma mutação em homozigose (Costa-Motta, 2011). A cidade de Monte Santo, assim como outros estados, por exemplo, a Paraíba apresenta uma forte tradição de casamentos consanguíneos, devido em parte ao isolamento geográfico e social (Weller, 2012).

3. JUSTIFICATIVA

- 1) O Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SGM-HCPA) é conhecido como centro de referência Nacional e Latino-Americano para as Doenças Lisossômicas (DLs), principalmente as Mucopolissacaridoses (MPSs).
- 2) Grande número de pacientes encaminhados para a Rede MPS Brasil edagnosticados com MPS IVA são oriundos da região Nordeste do Brasil.
- 3) Alta frequência de uma única mutação, já relatada em outros estudos, envolvendo pacientes da região Nordeste.
- 4) A caracterização genotípica desses pacientes é fundamental para predizer uma correlação genótipo-fenótipo, possibilitar aconselhamento genético bem como diagnóstico pré-natal.
- 5) A escassez de estudos sobre a caracterização molecular e sobre a epidemiologia da doença, principalmente na América do Sul.
- 6) A existência de tratamento disponível que é eficaz para muitas manifestações clínicas da doença quando diagnosticada precocemente

4. OBJETIVOS

Objetivo principal

- Análise do gene *GALNS* e caracterização do genótipo de pacientes com MPS IVA e identificação da causa de sua alta incidência no Nordeste do Brasil.

Objetivos Secundários

- Calcular a frequência de mutações encontradas em pacientes brasileiros e comparar com aquelas identificadas em outras populações mundiais;

- Caracterizar o haplótipo dos pacientes;

- Contribuir com orientações sobre manejo, tratamento, seguimento e aconselhamento genético, uma vez que a identificação molecular dos pacientes e seu seguimento sistemático produzirão dados sobre os efeitos das intervenções, que podem ser relevantes para a elaboração de linhas de cuidado para esta doença.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Algham, M. F.; Almassi, G. H. Current and emerging management options for patients with Morquio A syndrome. *Ther Clin Risk Manag*, v. 9, p. 45-53, 2013.

Bidchol, A. M. et al. GALNS Mutations in Indian Patients With Mucopolysaccharidosis IVA. *Am J Med Genet A*, 164A:2793–2801, 2014

Bittles A.H.; Consanguinity and its relevance to clinical genetics. *ClinGenet* 60:89–98, 2001.

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

Brand, G. D. et al. Diagnosing lysosomal storage diseases in a Brazilian non-newborn population by tandem mass spectrometry. *Clinics*, v. 68, n. 11, p. 1469-1473, 2013.

Bronberg, R. et al. Biosocial correlates and spatial distribution of consanguinity in South America. *Am. Jornal of Human Biology*, 2015

Bunge, S. et al. Identification of 31 novel mutations in the N-acetylgalactosamine-6-sulfatase gene reveals excessive allelic heterogeneity among patients with Morquio A syndrome. *Human Mutation*, v. 10, n. 3, p. 223-232, 1997.

Byers, S. et al. Glycosaminoglycan accumulation and excretion in the mucopolysaccharidoses: Characterization and basis of a diagnostic test for MPS. *Molecular Genetics and Metabolism*, v. 65, n. 4, p. 282-290, 1998.

Caciotti, A. et al. Optimizing the molecular diagnosis of GALNS: novel methods to define and characterize Morquio-A syndrome-associated mutations. *Hum Mutat*, v. 36, n. 3, p. 357-68, 2015.

Camelier, M. V. et al. Practical and reliable enzyme test for the detection of Mucopolysaccharidosis IVA (Morquio Syndrome type A) in dried blood samples. *Clinica Chimica Acta*, v. 412, n. 19-20, p. 1805-1808, 2011.

Castilla E. E., Schuler-Faccini L.; From rumors to genetic isolates. *Genet Mol Biol* 186-193, 2014.

Costa-Motta, F.M.M. et al. Genetic studies in a cluster of Mucopolysaccharidosis type VI patients in Northeast Brazil. *Mol Genet Metab*, v. 104, p. 603-607, 2011.

Dierks, T. et al. Multiple sulfatase deficiency is caused by mutations in the gene encoding the human C-alpha-formylglycine generating enzyme. *Cell*, v. 113, n. 4, p. 435-444, May 16 2003.

Dieter, T. et al. Common N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase (GALNS) exon mutations in Brazilian patients with mucopolysaccharidosis IVA (MPS IVA). *Genetics and Molecular Biology*, v. 30, n. 3, p. 524-528, Sep 2007.

Dvorak-ewell, M. et al. Enzyme Replacement in a Human Model of Mucopolysaccharidosis IVA In Vitro and Its Biodistribution in the Cartilage of Wild Type Mice. *Plos One*, v. 5, n. 8, 2010.

Dũng, V. C. et al. Mucopolysaccharidosis IVA: correlation between genotype, phenotype and keratan sulfate levels. *Mol Genet Metab*, v. 110, n. 1-2, p. 129-38, 2013.

Filocamo, M.; Morrone, A. Lysosomal storage disorders: molecular basis and laboratory testing. *Hum Genomics*, v. 5, n. 3, p. 156-69, 2011.

Freire-Maia, et al. Genetics of acheiropodia (the handless and footless families of Brazil). Formal Genetic analysis. *Am. J. Hum. Genet.* 27:521–527, 1975.

Gieselmann, V. Lysosomal storage diseases. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, v. 1270, n. 2-3, p. 103-136, Apr 24 1995.

Harmatz, P. et al. The Morquio A Clinical Assessment Program: Baseline results illustrating progressive, multisystemic clinical impairments in Morquio A subjects. *Molecular Genetics and Metabolism*, v. 109, n. 1, p. 54-61, 2013.

Hendriksz, C. J. et al. International Guidelines for the Management and Treatment of Morquio A Syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*, v. 167A, n. 1, p. 11-25, 2015.

Hendriksz, C. J. et al. Review of clinical presentation and diagnosis of mucopolysaccharidosis IVA. *Molecular Genetics and Metabolism*, v. 110, n. 1-2, p. 54-64, 2013.

HGMD - The Human Gene Mutation Database www.hgmd.org, 2015.

Iwata, H. et al. Mucopolysaccharidosis IVA: polymorphic haplotypes and informative RFLPs in the Japanese population. *Hum Genet*, v. 95, n. 3, p. 257-64, Mar 1995.

Kadali, S. et al. The Relative Frequency of Lysosomal Storage Disorders: A Medical Genetics Referral Laboratory's Experience From India. *Journal of Child Neurology*, v. 29, n. 10, p. 1377-1382, Oct 2014.

Khedhiri, S. et al. Mutations and polymorphisms in N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase gene in Turkish Morquio A patients. *Pathologie Biologie*, v. 62, n. 1, p. 38-40, Feb 2014.

Khedhiri, S. et al. Polymorphisms in Tunisian patients with N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase gene deficiency: Implication in Morquio A disease. *Diagnostic Pathology*, v. 6, Jan 2011.

Kubaski, F. Padronização de um protocolo para identificação de mutações no gene da GALNS em pacientes com MPS IVA através das técnicas de PCR-ARMS (Amplification Refractory Mutation System) e sequenciamento. Porto Alegre, 2012. Dissertação (mestrado). Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Lampe, C. et al. Mucopolysaccharidoses and other lysosomal storage diseases. *Rheum Dis Clin North Am*, v. 39, n. 2, p. 431-55, May 2013.

Laradi, S. et al. Mucopolysaccharidosis type IV: N-acetylgalactosamine-6-sulfatase mutations in Tunisian patients. *Molecular Genetics and Metabolism*, v. 87, n. 3, p. 213-218, Mar 2006.

Lehman, T. J. A. et al. Diagnosis of the mucopolysaccharidoses. *Rheumatology*, v. 50, p. V41-V48, Dec 2011.

Machado, T. M. B. et al. Types of marriages, population structure and genetic disease. *J. Biosoc. Sci.* 45:461-470, 2013.

Mak, C. M. et al. Inborn errors of metabolism and expanded newborn screening: review and update. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, v. 50, n. 6, p. 142-162, Nov-Dec 2013.

Masue, M. et al. N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase in human placenta - purification and characteristics. *Journal of Biochemistry*, v. 110, n. 6, p. 965-970, Dec 1991.

Montano, A. M. et al. International Morquio A registry: Clinical manifestation and natural course of Morquio A disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, v. 30, n. 2, p. 165-174, Apr 2007.

Morrone, A. et al. Molecular testing of 163 patients with Morquio A (Mucopolysaccharidosis IVA) identifies 39 novel GALNS mutations (vol 112, pg 160, 2014). *Molecular Genetics and Metabolism*, v. 113, n. 3, p. 237-237, Nov 2014.

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

Muenzer, J. The mucopolysaccharidoses: a heterogeneous group of disorders with variable pediatric presentations. *J Pediatr*, v. 144, n. 5 Suppl, p. S27-34, May 2004.

Muenzer, J. Early initiation of enzyme replacement therapy for the mucopolysaccharidoses. *Molecular Genetics and Metabolism*, v. 111, n. 2, p. 63-72, Feb 2014.

Nakashima, Y. et al. Mucopolysaccharidosis-iva - molecular-cloning of the human n-acetylgalactosamine-6-sulfatase gene (galns) and analysis of the 5'-flanking region. *Genomics*, v. 20, n. 1, p. 99-104, Mar 1994.

Neufeld, E. F.; Muenzer. *The Mucopolysaccharidoses*. New York: :Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. 2001.

Northover, H.; Cowie, R. A.; Wraith, J. E. Mucopolysaccharidosis type IVA (Morquio syndrome): A clinical review. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, v. 19, n. 3, p. 357-365, 1996.

Pajares, S. et al. Molecular analysis of mucopolysaccharidosis IVA (Morquio A) in Spain. *Molecular Genetics and Metabolism*, v. 106, n. 2, p. 196-201, Jun 2012.

Parkinson-lawrence, E. J. et al. Lysosomal Storage Disease: Revealing Lysosomal Function and Physiology. *Physiology*, v. 25, n. 2, p. 102-115, Apr 2010.

Rezvi, G. M. et al. Mucopolysaccharidosis IVA: a comparative study of polymorphic DNA haplotypes in the Caucasian and Japanese populations. *J Inherit Metab Dis*, v. 19, n. 3, p. 301-8, 1996.

Rivera-colon, Y. et al. The Structure of Human GALNS Reveals the Molecular Basis for Mucopolysaccharidosis IV A. *Journal of Molecular Biology*, v. 423, n. 5, p. 736-751, Nov 2012.

Ruivo, R. et al. Molecular and cellular basis of lysosomal transmembrane protein dysfunction. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, v. 1793, n. 4, p. 636-649, Apr 2009.

Saudubray, J. M. Clinical Approach to Inborn Errors of Metabolism. *Pediatrics. Inborn Metabolic Diseases: Diagnosis and treatment*. 5^a edição, Springer, p.4-5, 2012.

Sukegawa, K. et al. Biochemical and structural analysis of missense mutations in N-acetylgalactosamine-6-sulfate-sulfatase causing mucopolysaccharidosis IVA phenotypes. *Human Molecular Genetics*, v. 9, n. 9, p. 1283-1290, May 2000.

Tomatsu, S. et al. Morquio-disease - isolation, characterization and expression of full-length cDNA for human n-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 181, n. 2, p. 677-683, 1991.

Tomatsu, S. et al. Fourteen novel mucopolysaccharidosis IVA producing mutations in GALNS gene. *Human Mutation*, v. 10, n. 5, p. 368-375, 1997.

Tomatsu, S. et al. Fifteen polymorphisms in the N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase (GALNS) gene: Diagnostic implications in Morquio disease. *Human Mutation*, p. S42-S46, 1998.

Tomatsu, S. et al. Identification of a common mutation in mucopolysaccharidosis IVA: correlation among genotype, phenotype, and keratan sulfate. *Journal of Human Genetics*, v. 49, n. 9, p. 490-494, 2004.

Tomatsu, S. Mutation and polymorphism spectrum of the GALNS gene in mucopolysaccharidosis IVA (Morquio A). *Human Mutation*, v. 26, n. 6, p. 500-512, 2005.

Tomatsu, S. et al. Mucopolysaccharidosis Type IVA (Morquio A Disease): Clinical Review and Current Treatment: A Special Review. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, v. 12, n. 6, p. 931-945, 2011.

Tomatsu, S. et al. Newborn screening and diagnosis of mucopolysaccharidoses. *Molecular Genetics and Metabolism*, v. 110, n. 1-2, p. 42-53, 2013.

Tomatsu, S. Impact of enzyme replacement therapy and hematopoietic stem cell transplantation in patients with Morquio A syndrome. *Drug Des Devel Ther*, v. 9, p. 1937-53, 2015.

Tomatsu, S. et al. Establishment of glycosaminoglycan assays for mucopolysaccharidoses. *Molecular Genetics and Metabolism*, v. 114, n. 2, p. S115-S115, 2015.

Vellodi, A. Lysosomal storage disorders. *British Journal of Haematology*, v. 128, n. 4, p. 413-431, 2005.

Viola, M. et al. Glycosaminoglycans metabolism. *Biochem Res Int*, v. 2012, p. 245792, 2012.

Wilcox, W. R. Lysosomal storage disorders: The need for better pediatric recognition and comprehensive care. *Journal of Pediatrics*, v. 144, n. 5, p. S3-S14, 2004.

Winchester, B.; Vellodi, A.; Young, E. The molecular basis of lysosomal storage diseases and their treatment. *Biochemical Society Transactions*, v. 28, p. 150-154, Feb 2000.

Wood, T. C. et al. Diagnosing mucopolysaccharidosis IVA. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, v. 36, n. 2, p. 293-307, 2013.

Wraith, J. E. The mucopolysaccharidoses - a clinical review and guide to management. *Archives of Disease in Childhood*, v. 72, n. 3, p. 263-267, 1995.

Wraith, J. E. Lysosomal disorders. *Seminars in Neonatology*, v. 7, n. 1, p. 75-83, 2002.

Weller, M. et al. Consanguineous unions and the burden of disability: a population-based study in communities of Northeastern Brazil. *Am. J. Hum. Biol.* 24:835-840, 2012.

6. ARTIGO

(artigo a ser submetido à revista Molecular Genetics and Metabolism)

Mucopolysaccharidosis IVA: Genotype and haplotype analysis of Brazilian patients

Aline Nemetz Bochernitsan^{a,b}, Ana Carolina Brusius-Facchin^{a,c}, Rowena Rubim Couto^a, Francyne Kubaski^{d,f}, Paula Frassinetti Vasconcelos de Medeiros^{d,e}, Roberto Giugliani^{a,b,c,d,g}, Sandra Leistner-Segal^{a,b,d}.

a - Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre-HCPA, RS, Brazil;

b - Postgraduate Program in Medicine: Medical Sciences, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil;

c - Post-Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil;

d - National Institute on Population Medical Genetics – INAGEMP, Brazil;

e - Hospital Universitário Alcides Carneiro, Universidade Federal de Campina Grande, Campo Grande, PB, Brazil.

f - Department of Biological Sciences, University of Delaware, Nemours/ Alfred I. duPont Children Hospital

g - Department of Genetics, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

Corresponding Author: Prof. Dr. Sandra Leistner-Segal, PhD, Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil; Tel.: +55 51 33598011; e-mail: ssegal@hcpa.ufrgs.br

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

Abstract

Mucopolysaccharidosis type IVA (MPS IVA) is an autosomal recessive disorder caused by mutations in the gene that encodes the lysosomal enzyme *N*-acetylgalactosamine-6-sulfatase, resulting in enzyme deficiency and no degradation of the substrate. To date, 319 mutations have been identified in the *GALNS* gene. In this study, 18 different mutations were identified among 45 Brazilian patients and identified 5 common mutations. Of the 18 alterations, 4 were novel mutations. Bioinformatics analysis, in 2 different softwares, predicted these mutations as being

probably pathogenic. To evaluate the possibility that this alteration was a polymorphism we checked the allele frequencies in the 1000 genomes and dbSNP databases. The bioinformatics findings together with the observation that these alterations are not present in the databases, suggests that they are disease-causing mutations, and were correlated with biochemical findings. Additionally, we performed haplotype analysis to identify the existence of association between any particular mutation and the intragenic polymorphisms studied. We identified 14 different haplotypes, and 8 were found only in controls. We observed that the mutation p.Ser341Arg, which is present only in the Brazilian population showed the same haplotype in all patients studied. Thus, we suggest that a possible founder effect for this mutation could exist.

Key words: Mucopolysaccharidosis IVA, Haplotype analysis, *GALNS*, Morquio A syndrome

1. Introduction

Mucopolysaccharidosis type IVA (MPS IVA; OMIM 253000) is an autosomal recessive lysosomal disorder caused by deficiency of *N*-acetylgalactosamine-6-sulfatase (*GALNS*; E.C. 3.1.6.6), which leads to accumulation of the GAGs keratan sulfate (KS) and chondroitin-6-sulfate (C6S) in lysosomes and, consequently, cell dysfunction and clinical manifestations [1].

MPS IVA patients exhibit a broad spectrum of severity, ranging from a classical form with severe skeletal dysplasia, corneal clouding, heart involvement, hepatosplenomegaly, to mild non-classical phenotypes (mild and intermediate phenotype) with mild bone e visceral involvement. In contrast to other MPSs, it has not be associated with cognitive impairment [2,3].

The disease is extremely rare, with incidence rates ranging from 1 in 76,000 live births in Northern Ireland to 1 in 640,000 live births in Western Australia [3]. The *GALNS* gene, located on chromosome 16q24.3, contains 14 exons and 13 introns spanning 50kb, and is transcribed into a 1566 pb cDNA, which encodes a 522-residue glycopeptide [4,5].

To date, 319 different mutations in the *GALNS* gene have been described (HGMD, 2015); including point mutations, splice-site mutations, deletions and insertions. This heterogeneity is very likely to be responsible for the clinical variability [6]. Even the most frequently detected

mutations are relatively uncommon, although some are more prevalent in certain regions and sub-populations of ethnic groups, possibly due to a founder effect [7].

In the present study, we present the molecular analysis of *GALNS* gene in 45 Brazilian patients with MPS IVA, including mutation and haplotype analysis to investigate a possible cluster of the disease in the northeast of Brazil. Additionally, we report 4 novel mutations which were found to be disease-causing.

2. Materials and Methods

2.1 Subjects

In this study, 45 patients from different regions of Brazil (Northeast, Southeast and South). The patients were recruited by the MPS Brazilian Network at the Medical Genetics Service (SGM) of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). This study was approved by the Ethics Committee of the Institution (#11-0214), which is recognized by the Office for Human Research Protections as an Institutional Review Board (IRB0000921). After obtaining consent, blood samples were collected for laboratory analysis. Twenty eight subjects without MPS and not related to MPS patients were used as controls.

2.2 Biochemical assay

2.2.1 Glycosaminoglicans measure

The GAGs were measured by the dimethylmethyleneblue method, according De Jong *et al.*,1992 [8].

2.2.2 GALNS enzyme assay

Leukocytes were separated from 10 ml of heparinized peripheral blood according to the method described by Skoog and Beck.,1956, and stored at -20°C until analysis. The leukocytes were diluted in distilled water and were lysed via ultrasonication for biochemical assay. For the

measurement of proteins in leukocytes, we used the method described by Lowry *et al.*, 1951 [9]. The *GALNS* enzyme assay was performed as described by Van Diggelen *et al.*, 1990 [10], using the substrate 4-methylumbelliferyl- β -D-galactoside-6-sulphate.

2.3 *GALNS* mutation analysis

Genomic DNA was isolated from blood following the salt precipitation method [11]. For mutation analysis, the polymerase chain reaction (PCR) was performed with amplification of the whole coding region and exon/intron boundaries of *GALNS* gene. The primers used were described by Tomatsu (2004) [12] which amplify 5 regions including the 14 exons of the *GALNS* gene. The Expand Long Template PCR System (Roche Applied Science) was used, which is effective for the amplification of fragments as long as 20 kb.

After amplification, PCR products were purified from excess primers and dNTPs with Exonuclease I (USB, Cleveland, USA) and Shrimp Alkaline Phosphatase (USB, Cleveland, USA) and were sequenced according to the Sanger method using specific internal primers in order to characterize the genotype for each patient.

2.4 Bioinformatics analysis

The bioinformatics analysis were conducted with 2 different softwares: Polyphen-2 (Polymorphism Phenotyping v.2), an online tool that can predict possible impact of an amino acid substitution on the structure and function of a human protein using straightforward physical and comparative considerations [13]; and SIFT based on sequence homology and the physical properties of amino acids [14].

2.5 1000 Genome samples and variant datasets

We obtained *GALNS* variants from Integrated Variant Set release of the 1000 Genomes Project from 1,092 subjects of 14 ethnicities originated from four continents.

The 14 ethnicities are: Yoruba in Ibadan, Nigeria (YRI); African Americans in Southwest US (ASW); Luhya in Webuye, Kenya (LWK); Mexican Ancestry in Los Angeles (MXL); Colombian

in Medellin Colombia (CLM); Puerto Rican in Puerto Rico (PUR); Han Chinese in Beijing (CHB); Han Chinese in South China (CHS); Japanese in Tokyo (JPT); Utah residents with Northern and Western European ancestry (CEU); Finish from Finland (FIN); English from Great Britain (GBR); Iberian in Spain (IBS), and Toscani in Italy (TSI).

2.6 Haplotype analysis

Haplotype analysis was performed by Real time PCR using the *TaqMan*® methodology with a probe designed and customized for each polymorphic site. The polymorphisms selected for this study were based on the frequency reported in previous studies using PCR-RFLP. Each polymorphic site provided the A/a (rs3784883), B/b (rs1064315), C/c (rs2303269), D/d (rs2303271), E/e (rs749979032) or H/h (rs1107672) genotypes. The nomenclature used for these polymorphisms are described according to previous studies.[15,16,17].

3. Results

3.1 Biochemical analysis

The six patients included in this study had low or undetectable levels of GALNS activity (reference range: 0.44-1.89 I/h/mg protein). The results of other enzymes (β -glucuronidase, Hexosaminidase A, Chitotriosidase, Arylsulfatase B, α -L-iduronidase, β -galactosidase, Iduronate-2-sulfatase) were normal, excluding Multiple Sulfatase Deficiency.

3.2 Mutation analysis in *GALNS* gene

The molecular analysis was performed on 45 Brazilian patients with MPS IVA. We found 18 different mutations amongst the 45 patients, including four novel mutations: p.Gly115Arg;

p.Asn45Gly; p.Thr394Ala and c.759-2A>G, found in three different exons and one intron (table 1).

To rule out the possibility that these novel mutations were polymorphisms we checked the allele frequencies in the 1000 genomes database and in the dbSNP. All mutations were not described, indicating that the variants are very rare.

SIFT predicts whether an amino acid substitution affects protein function based on sequence homology and the physical properties of amino acids [14]. Thus, if a score is smaller than 0.05, the corresponding neutral substitutions (NS) are predicted as “damaging”, while if it is greater, the NS are predicted as “tolerated”. Mutations p.Thr394Ala, p.Gly115Arg and p.Asn45Gly were predicted as damaging (Table 1).

PolyPhen2 is an automatic tool for prediction based on several features, including the sequence, phylogenetic and structural information characterizing the substitution [13]. The score of PolyPhen2 ranges from 0 to 1, and the corresponding prediction is “probably damaging” (coded as “D” if the score is greater than 0.85); “possibly damaging” (coded as “P” if it is between 0.85 and 0.15) and “benign” (coded as “B” if it is smaller than 0.15). Mutation p.Thr394Ala was predicted as possibly damaging with score of 0.5-0.7. The other mutations were predicted as probably damaging with a score of 1.00 (Table 1).

Table 1: Mutation prediction using bioinformatics tools.

Mutation	Prediction	
	Polyphen	SIFT
p.Gly115Arg	probably damaging	Damaging
p.Asn45Gly	probably damaging	Damaging
p.Thr394Ala	possibly damaging	Damaging

All the identified mutations and their allelic frequencies are summarized in table 2. In this population, five recurrent mutations were found with higher frequency: p.Ser341Arg, p.Gly301Cys, p.Arg386Cys, p.Arg94Leu and p.Gly116Ser with frequencies of 18.88% (17/90),

16.66% (15/90), 13.33% (12/90), 11.11% (10/90) and 11.11% (10/90) of the total mutant alleles, respectively.

Table 2 Mutations detected in the GALNS gene for Brazilian patients with MPS IVA.

Nucleotide change	Amino acid change	Exon	Detected alleles (n=90)	Allelic frequencies (%)
c.46T>A	p.Val16Glu	I	2	2.22
c.135A>C	p.Asn45Gly	II	1	1.11
c.151G>A	p.Glu51Lys	II	2	2.22
c.281G > T	p.Arg94Leu	III	10	11.11
c.342G>A	p.Gly115Arg	IV	1	1.11
c.346G > A	p.Gly116Ser	IV	10	11.11
c.415G > A	p.Gly139Ser	IV	1	1.1
c.452C>T	p.Pro151Leu	V	1	1.1
c.491A > C	p.Asn164Thr	V	5	5.55
c.492G > A	p.Cys165Tyr	V	2	2.22
c.715G > T	p.Val239Phe	VII	6	6.66
c.759-2A>G	-	Intron VI	1	1.11
c.901G > T	p.Gly301Cys	IX	15	16.66
c.920T > C	p.Leu307Pro	IX	1	1.11
c.1023C > G	p.Ser341Arg	X	17	18.88
c.1156C > T	p.Arg386Cys	XI	12	13.33
c.1157G > A	p.Arg386His	XI	2	2.22
c.1180A>G	p.Thr394Ala	XI	1	1.11

GenBank: NM_000512.3

Novel mutations are given in bold.

3.3 Haplotype analysis and geographic distribution in Brazil

We performed the haplotype analyses in 42 patients with defined genotypes (Table 3). In seven patients, it was not possible to determine the haplotypes, because patients were heterozygous for more than one polymorphism and the parental samples were not available. Patients are distributed in Northeast (n=19), Southeast (n=11) and South (n=12) regions of Brazil. Here, we showed the results for the five frequent mutations detected.

All patients with the p.Ser341Arg mutation in homozygosis (n=7), showed a unique haplotype (a/b/h/c/d/e). Two patients were compound heterozygous for this mutation and for one of them it was possible to define the same haplotype. This mutation was detected in the Northeast amongst 8 patients, most of them from the state of Paraíba, and also in 1 patient from the Southeast.

The p.Gly301Cys mutation was detected in homozygosis in the three studied regions of Brazil, and all showed the same haplotype a/b/H/c/D/e. Furthermore, two heterozygous patients for this mutation were also identified, but the haplotype could not be defined. The a/b/H/c/D/e haplotype was also found in a patient with p.Arg386Cys in homozygosis. The p.Arg386Cys mutation was also observed in other homozygous patients with haplotypes A/b/h/c/d/e and A/B/h/c/d/e in three regions of Brazil. Two patients showed this mutation in heterozygosis and it was possible to detect the A/b/h/c/d/e haplotype in only one patient.

The p.Arg94Leu mutation was associated with the haplotype a/b/h/c/d/e. It was found in the south and southeast and all this patients were homozygous. The p.Gly116Ser mutation was identified in homozygosis, in patients from the South and all showed the A/B/h/c/d/E and A/b/h/c/d/E haplotypes.

Table 3. Haplotypes and mutations detected within the studied patients.

Number of patients	Allele 1	Allele 2	Haplotype	Patients per State
7	p.Ser341Arg	p.Ser341Arg	abhcdE/abhcdE	PB=5 PE=1 ES=1
4	p.Arg386Cys	p.Arg386Cys	AbhcdE/AbhcdE	PE=3 PB=1
1	p.Arg386Cys	p.Arg386Cys	abHcdE/abHcdE	RJ=1
6	p.Gly301Cys	p.Gly301Cys	abHcdE/abHcdE	AL=1 PB=1 RJ=1 SP=1 RS=1
3	p.Gly116Ser	p.Gly116Ser	ABhcdE/AbhcdE	RS=1 PR=1 SC=1
5	p.Arg94Leu	p.Arg94Leu	abhcdE/abhcdE	SC=2 SP=1 MG=1 PR=1
1	p.Ser341Arg	p.Arg386Cys	abhcdE/AbhcdE	RN=1
1	p.Ser341Arg	p.Gly301Cys	aa/bb/Hh/cc/Dd/ee	PB=1
1	p.Gly116Ser	p.Arg386Cys	AA/Bb/hh/cc/dd/Ee	RS=1
3	p.Val239Phe	p.Val239Phe	ABhcdE/AbhcdE	PB=1 CE=2
1	p.Arg386His	p.Arg386His	abHcdE/abHcdE	RJ=1
1	p.Cys165Tyr	p.Cys165Tyr	abHcdE/abHcdE	MG=1
2	p.Asn164Thr	p.Asn164Thr	abHcdE/abHcdE	RS=2
1	p.Asn164Thr	p.Gly139Ser	aa/bb/HH/cc/Dd/ee	RS=1
1	p.Gly115Arg	p.Pro151Leu	aa/bb/Hh/Cc/Dd/ee	SP=1
1	p.Val16Glu	p.Val16Glu	AA/Bb/hh/cc/dd/EE	ES=1

1	p.Glu51Lys	p.Glu51Lys	AA/Bb/hh/cc/dd/EE	CE=1
1	p.Asn45Gly	p.Thr394Ala	abHcDe/abHcDe	PE=1
1	p.Gly116Ser	p.Gly301Cys	Aa/bb/Hh/cc/Dd/Ee	RS=1

Regions/States of Brazil: Northeast/ AL= Alagoas, CE= Ceará, RN= Rio Grande do Norte, PB= Paraíba, PE= Pernambuco. Southeast/ ES= Espírito Santo, RJ= Rio de Janeiro, SP= São Paulo, MG= Minas Gerais. South/ PR= Paraná, RS= Rio Grande do Sul, SC= Santa Catarina.

For 36 out of 42 patients for whom haplotypes were determined, we detected 6 different haplotypes, and among the 27 controls, 14 different haplotypes were detected. In table 4 we list the number and frequency of haplotypes detected in this study. The most frequent haplotype among patients was 1 (34.72%) and 2 (33.33%). The haplotype 2 was the most common among our controls (51.9%).

Table 4 Haplotypes detected and haplotype frequencies of mutant and normal alleles.

Haplotype		MPS IVA alleles	Normal alleles
		(n=72) Number (%)	(n=54) Number (%)
1	a/b/h/c/d/e	25 (34.72)	2 (3.7)
2	a/b/H/c/D/e	24 (33.33)	28 (51.9)
3	A/b/h/c/d/e	5 (6.66)	2 (3.7)
4	A/B/h/c/d/E	6 (6.94)	2 (3.7)
5	A/b/h/c/d/E	6 (6.94)	4 (7.4)
6	A/B/h/c/d/e	4 (5.55)	1 (1.9)
7	a/b/h/c/D/e	0 (0)	3 (5.6)
8	a/b/H/c/d/e	0 (0)	1 (1.9)
9	A/b/H/c/d/e	0 (0)	2 (3.7)
10	A/b/h/c/D/E	0 (0)	1 (1.9)
11	a/b/h/c/d/E	0 (0)	3 (5.6)
12	a/b/h/C/d/e	0 (0)	1 (1.9)
13	a/b/h/C/d/E	0 (0)	2 (3.7)
14	a/b/H/C/d/e	0 (0)	2 (3.7)

4. Discussion

This study evaluates the molecular aspects of MPS IVA amongst Brazilian patients which allowed us to identify four novel mutations, illustrating the genetic heterogeneity underlying this disease at the molecular level. SIFT and Polyphen2 bioinformatics tools predicted a potential deleterious effect for all mutations. However, it was not possible to perform functional studies on the newly identified mutations, therefore we cannot predict the true implications of this variant in the function of the protein. Nevertheless, the low frequency of all mutated alleles, in different populations, and the bioinformatics tools used, corroborate with its pathogenicity and characterize them as disease-causing mutations.

Mutation and haplotype analyses for MPS IVA have been performed previously in several studies in various ethnic population [12,15,16,18,19]. Here, we performed the first haplotype analyses in Brazilian patients. Among the six polymorphisms analyzed for construction of the haplotype in this study, rs2303269 (C/c), rs1064315 (B/b) and rs49979032 (E/e) were not in Hardy-Weinberg equilibrium probably related to the endogamic characteristic of the population.

Haplotype analysis revealed that p.Ser341Arg mutation, the most frequent in Brazil (21,25%), occurred only in the haplotype a/b/h/c/d/e. This mutation is unique for the Brazilian population [6]. Thus, we suggest that a possible founder effect for this mutation could exist. This mutation was probably derived from a common ancestor in the northeast of Brazil in the state of Paraíba. Individuals from a common ancestor are likely to have inherited both copies of the mutated gene and thus rare genotypes are maintained [18].

The presence of a specific mutation in a cluster was already observed in MPS VI in the northeast of Brazil [20]. There is a high frequency of inbreeding in the state of Paraíba [21,22]. According to the history of the population occupation of Paraíba, Portuguese families with a strong tradition of consanguineous unions were the main colonizing the region. The high frequency of the same mutation (with the same haplotype) and high rate of parental consanguinity are strong evidence for the hypothesis of a founder effect [23].

The mutations p.Gly301Cys and p.Arg386Cys were identified with 16.66% and 13.33% frequency respectively in Brazil and it was detected in patients from North, Southeast and South regions. These two mutations have been identified in various populations and together with p.Ile113Phe, are the most frequent worldwide [24,25]. All patients with p.Gly301Cys with

defined haplotype, showed the haplotype a/b/H/c/D/e, which was also the most common haplotype among controls. Some patients with p.Arg386Cys also showed this same haplotype while others showed haplotypes A/b/h/c/d/e and A/B/h/c/d/e. Thus, our results suggest at least three different origins for this mutation, in a similar way, more than one origin was identified for this mutation in other populations (Japanese, British, Italian, Turkish, German, Polish, and Mexican) [12,24].

The p.Arg94Leu mutation was associated with the haplotype a/b/h/c/d/e, the same haplotype found in patients with p.Ser341Arg mutation, however, this mutation was found in the south and southeast. All these patients were homozygous, thus suggesting only one origin for p.Arg94Leu. To date, this mutation was only observed in one Tunisian patient [6].

The p.Gly116Ser mutation showed two different haplotypes, A/B/h/c/d/E and A/b/h/c/d/E.. This mutation was observed only in patients of south region and has also been found in other population [6,25].

The frequent haplotype identified in this study in normal individuals and the second more frequent in patients was a/b/H/c/D/e, in contrast with other studies, were the most frequent haplotype in controls was a/b/h/c/D/E [6]. This haplotype was not detected within our population (patients and normal controls).

Associations between a specific mutation and a specific haplotype can be demonstrated in genetic disorders. To understand the origin of a mutation, it is very useful to identify whether a certain recurrent mutation is associated with the same haplotype [19]. A frequent mutation can be explained by founder effect, as individuals descending from a common ancestor are likely to have inherited both copies of the mutated gene and, consequently share the same haplotype which would be transmitted to offspring [18].

We believe that our results will make an important contribution for the understanding of the molecular basis of MPS IVA, taking into account its rarity and distribution worldwide. There is a wide spectrum of mutations/polymorphisms reported in the *GALNS* gene, which highlights the importance of its identification, especially for purposes of diagnosis, carrier identification, genetic counseling and the use of new therapeutic strategies.

5. Conclusions

Most patients in this study were homozygous for the same mutation suggesting a high rate of consanguinity among relatives of these patients. In addition, there is a low rate of migration in this population corroborating with the hypothesis of a founder effect.

We could identify five recurrent mutations among Brazilian patients. The p.Ser341Arg mutation was detected with the highest frequency, being more prevalent (and almost exclusive) in the northeast, mainly in the state of Paraíba, where it was possible to observe a cluster of this mutation. The finding of the same haplotype on the p.Ser341Arg mutation suggests that it was derived from the same ancestor.

Our findings are relevant for the prevalence estimative of these mutations in different regions of Brazil, which is important for epidemiological studies, genetic counseling and genotype-phenotype correlation. Also, early detection of affected family members may contribute to better outcomes of the existing treatment.

Acknowledgements

This study was supported by the following funds: FIFE-HCPA (grant # 11-0214), Brazilian Institute for Population Medical Genetics (INAGEMP), CNPq Universal (grant# 479162/2013-1). ACBF is supported by CAPES post-doc scholarship. SLS and RG receive Research Grants from CNPq.

References

- [1] Neufeld, E. F.; Muenzer. The Mucopolysaccharidoses. New York: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. 2001.
- [2] Harmatz, P. et al. The Morquio A Clinical Assessment Program: Baseline results illustrating progressive, multisystemic clinical impairments in Morquio A subjects. *Molecular Genetics and Metabolism*, v. 109, n. 1, p. 54-61, May 2013.
- [3] Hendriksz, C. J. et al. Review of clinical presentation and diagnosis of mucopolysaccharidosis IVA. *Molecular Genetics and Metabolism*, v. 110, n. 1-2, p. 54-64, Sep-Oct 2013.
- [4] Nakashima, Y. et al. Mucopolysaccharidosis-iva - molecular-cloning of the human n-acetylgalactosamine-6-sulfatase gene (galns) and analysis of the 5'-flanking region. *Genomics*, v. 20, n. 1, p. 99-104, Mar 1994.
- [5] Tomatsu, S. Morquio-disease - isolation, characterization and expression of full-length cDNA for human n-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 181, n. 2, p. 677-683, Dec 16 1991.
- [6] Tomatsu, S. Mutation and polymorphism spectrum of the GALNS gene in mucopolysaccharidosis IVA (Morquio A). *Human Mutation*, v. 26, n. 6, p. 500-512, Dec 2005.
- [7] Morrone, A. et al. Molecular testing of 163 patients with Morquio A (Mucopolysaccharidosis IVA) identifies 39 novel GALNS mutations (vol 112, pg 160, 2014). *Molecular Genetics and Metabolism*, v. 113, n. 3, p. 237-237, Nov 2014.

- [8] De Jong JGN, Wevers R.A. Liebrand-van Sambeek R., 1992. Measuring urinare glycosaminoglecans in the presence of protein: an improved screening procedure for Mucopolysaccharidosis based on dimethelmethelene blue. *Clin Chem.* 38(6), 803-807.
- [9] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL. et al., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193-265.
- [10] Van Digglen OP, Zhao H, Kleijer WJ et al., 1990. A fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of Morquio disease type A. *Clin Chim Acta.* 187,131-40.
- [11] Miller, S. A.; et al. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, v. 16, n. 3, p. 1215, 1988.
- [12] Tomatsu, S. et al. Identification of a common mutation in mucopolysaccharidosis IVA: correlation among genotype, phenotype, and keratan sulfate. *Journal of Human Genetics*, v. 49, n. 9, p. 490-494, 2004.
- [13] Adzhubei IA, Schimidt S, Peshkin L et al., 2010. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat methods.* 7(4), 1-2.
- [14] Henikoff S.,2003. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res.* (13):3812-4.
- [15] Iwata, H. et al. Mucopolysaccharidosis IVA: polymorphic haplotypes and informative RFLPs in the Japanese population. *Hum Genet*, v. 95, n. 3, p. 257-64, Mar 1995.
- [16] Rezvi, G. M. et al. Mucopolysaccharidosis IVA: a comparative study of polymorphic DNA haplotypes in the Caucasian and Japanese populations. *J Inherit Metab Dis*, v. 19, n. 3, p. 301-8, 1996.

- [17] Tomatsu, S. et al. Fifteen polymorphisms in the N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase (GALNS) gene: Diagnostic implications in Morquio disease. *Human Mutation*, p. S42-S46, 1998.
- [18] Khedhri, S. et al. Polymorphisms in Tunisian patients with N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase gene deficiency: Implication in Morquio A disease. *Diagnostic Pathology*, v. 6, Jan 2011.
- [19] Khedhiri, S. et al. Mutations and polymorphisms in N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase gene in Turkish Morquio A patients. *Pathologie Biologie*, v. 62, n. 1, p. 38-40, Feb 2014.
- [20] Costa-Motta, F.M.M. et al. Genetic studies in a cluster of Mucopolysaccharidosis type VI patients in Northeast Brazil. *Mol Genet Metab*, v. 104, p. 603-607, 2011.
- [21] Weller, M. et al. Consanguineous unions and the burden of disability: a population-based study in communities of Northeastern Brazil. *Am. J. Hum. Biol.* 24:835-840, 2012.
- [22] Santos S. et al. As causas da deficiência física em municípios do Nordeste brasileiro e estimativa de custos de serviços especializados. *Cien Saude Colet*; 19(1):1-2, 2013.
- [23] Silva T. O. et al. Prevalência de Mucopolissacaridose IVA na Paraíba: um Efeito Fundador? XX Engene – Encontro de genética do nordeste. Campina Grande, PB, 2014.
- [24] Pajares, S. et al. Molecular analysis of mucopolysaccharidosis IVA (Morquio A) in Spain. *Molecular Genetics and Metabolism*, v. 106, n. 2, p. 196-201, Jun 2012.
- [25] Tomatsu, S. et al. Mucopolysaccharidosis IVA: Identification of a Common Missense Mutation I113F in the N-Acetylgalactosamine-6-Sulfate Sulfatase Gene. *Am. J. Genet.* 57:556-563, 2004.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A análise de 45 pacientes com a Síndrome de Morquio A possibilitou a identificação de 18 mutações, sendo 14 previamente descritas na literatura como causadoras da doença. Destas, 5 apresentaram uma alta frequência na população brasileira.

Ao compararmos a frequência das mutações encontradas em nossa população com a da população mundial, as mutações p.Gly301Cys e p.Arg386Ser apresentaram alta frequência em ambas as populações. A mutação p.Ser341Arg foi encontrada apenas em nossos pacientes, sendo a maioria (n=8) originária da região Nordeste do Brasil. Apenas um caso foi identificado no Espírito Santo (n=1), a informação sobre sua ancestralidade será investigada, afim de verificar uma possível origem comum.

Após a genotipagem foi realizado a análise de haplótipos com o objetivo de identificar a origem das mutações, bem como relacionar o achado da alta frequência da mutação p.Ser341Arg com um possível efeito fundador. Identificamos 14 haplótipos distintos, dentre pacientes e controles, sendo que 8 haplótipos estavam presentes apenas na população controle.

O segundo haplótipo mais frequente encontrado nos pacientes foi o mais frequente encontrado entre os controles. O haplótipo a/b/h/c/d/e foi observado apenas nos pacientes que apresentaram as mutações p.Ser341Arg e p. Arg94Leu (n=14). Além da caracterização dos 40 pacientes, foi possível identificar 4 novas mutações em 3 pacientes não relacionados. As variantes foram classificadas como patogênicas após análise em ferramentas de predição, que levam em conta o possível impacto da troca de aminoácidos na estrutura e função da proteína. Além disso, bancos de dados foram utilizados para verificação da frequência dos alelos mutantes, em diferentes populações, e todas não foram encontradas, sendo consideradas raras.

Quatorze pacientes não foram incluídos nos estudos, por ainda não terem a análise molecular finalizada. Será dada continuidade nas análises através de sequenciamento de nova geração. As variantes novas encontradas serão validadas pelo método de Sanger (padrão-ouro). Esta nova metodologia será empregada, pois já foi padronizada em nosso laboratório e apresentou ser um método mais rápido e de menor custo.

8. ANEXOS

Anexo I

Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) da Rede MPS



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

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

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

Nome do paciente: _____

Endereço: _____

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

Email: _____

Responsável: _____ Idade: _____

RG: _____ Grau de parentesco: _____

Justificativa e objetivos do estudo:

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

Procedimentos a que serão submetidos os pacientes

Os pacientes com suspeita de apresentar uma mucopolissacaridose serão submetidos a uma avaliação clínica. Caso a suspeita persista, serão coletadas amostras de urina para análise bioquímica e amostras de sangue para análises bioquímica e/ou molecular. A investigação molecular inclui a análise de DNA, RNA e proteínas para identificação das alterações presentes nas mucopolissacarídeos. Em alguns casos será necessária a repetição dos exames e mesmo a coleta de uma biópsia de pele para o completo esclarecimento do caso. Alguns procedimentos adicionais, como exames de imagens, testes de função pulmonar, testes de mobilidade articular, testes de resistência, estudo do sono, entre outros, poderão

Comitê de Ética em Pesquisa
GPPGEM
VERSÃO APROVADA
26 / 04 / 2013
17-03066 EB

CPA/GPPG
HEMEDIC
17 JUL 2013
2013

Armazenamento de dados e amostras

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

Benefícios esperados

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

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

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

Data: ____ / ____ / ____

Paciente ou responsável: _____

Responsável pelo estudo: _____

HCPA / GPPG
RESOLUÇÃO APROVADA
21 / 07 / 09
Nº 03066 198