

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**ANÁLISE DE MUTAÇÕES NO GENE ARILSULFATASE
B EM PACIENTES COM MUCOPOLISSACARIDOSE
TIPO VI DO BRASIL: DEFINIÇÃO DE UMA POSSÍVEL
ORIGEM COMUM EM MONTE SANTO/BA**

FABIANA MAIA MOURA COSTA MOTTA

Orientadora: Sandra Leistner-Segal

Tese de Doutorado

2011

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

ANÁLISE DE MUTAÇÕES NO GENE ARILSULFATASE
B EM PACIENTES COM MUCOPOLISSACARIDOSE
TIPO VI DO BRASIL: DEFINIÇÃO DE UMA POSSÍVEL
ORIGEM COMUM EM MONTE SANTO/BA

FABIANA MAIA MOURA COSTA MOTTA

Orientadora: Sandra Leistner-Segal

Tese de Doutorado

2011

CIP - Catalogação na Publicação

Maia Moura Costa Motta, Fabiana
ANÁLISE DE MUTAÇÕES NO GENE ARILSULFATASE B EM
PACIENTES COM MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO VI DO BRASIL:
DEFINIÇÃO DE UMA POSSÍVEL ORIGEM COMUM EM MONTE
SANTO/BA / Fabiana Maia Moura Costa Motta. -- 2011.
170 f.

Orientadora: Sandra Leistner-Segal.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2011.

1. Mucopolissacaridose Tipo VI. 2. Síndrome de
Marateaux-Lamy. 3. Arilsulfatase B. I. Leistner-
Segal, Sandra, orient. II. Título.

Dedico este trabalho a minha mãe,
Rita Maria Maia Moura Costa,
eternamente presente nos meus
pensamentos e no meu coração.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Sandra Leistner-Segal, juntamente com sua família, pela oportunidade a mim conferida e, pelos seus ensinamentos como profissional e ser humano;

À Dra. Angelina Xavier Acosta, minha coorientadora, pela confiança e por continuar me apoiando mesmo morando longe;

Ao Dr. Roberto Giugliani, exemplo de profissional;

Ao Serviço de Genética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelos ensinamentos e amizades conquistadas;

Ao grupo do Projeto Genética no Sertão pelas colaborações prestadas durante este trabalho;

Aos pacientes de Monte Santo e seus responsáveis, motivo maior deste estudo;

À Universidade Católica de Pelotas, pela oportunidade de iniciar uma carreira profissional como docente de nível superior;

Aos amigos de Salvador, em especial a Sara Passos e Adriane Garcia, por deixarem claro que a distância não afasta os verdadeiros amigos;

Aos amigos de Porto Alegre, em especial a Pâmela, Luciane Gloeden e Ilza Schnarndorf, juntamente com suas famílias, por criarem um novo ambiente familiar para mim e minha família;

Aos amigos de Pelotas, em especial a Magali e Gerson, que nos receberam sempre com muito carinho;

À Ana Carolina, Fernanda e Laila, colegas de trabalho que se tornaram amigas, irmãs, companheiras para todas as horas;

À Dona Vera e Iolanda, pois, nos momentos em que estive longe dos meus filhos por causa desse trabalho, cuidaram deles e da minha casa como se fossem delas;

Às famílias Maia e Moura Costa por fazerem parte da minha caminhada;

Às famílias Campos e Motta por terem me acolhido com muito amor;

À Angela Schwonke, amiga do coração, que está sempre pronta para me ajudar;

À Eleonora Motta e família pelo apóio e carinho;

À Silvia Campos e família pelos vários momentos de entretedimento, tão necessários para continuarmos sempre de bom humor;

À Zulce por ter me acolhido como uma filha e ter feito com muita dedicação a revisão deste trabalho;

Aos meus irmãos, Claudio e Marcelo e, suas famílias, sempre presentes no meu desenvolvimento pessoal;

À Eraldo, meu pai, profissional exemplar que me ensinou a ser justa, sem preconceitos e por sempre me apoiar;

Ao meu marido Luiz Henrique pelo amor e paciência durante esses quatro anos em que passava mais tempo na frente do computador do que ao seu lado;

Aos meus filhos Paulo Henrique e Pedro por estarem sempre de braços abertos quando eu chegava em casa, me dando forças para continuar esse trabalho.

SUMÁRIO

1. ÍNDICE DE TABELAS	4
2. ÍNDICE DE FIGURAS	5
3. ÍNDICE DE QUADROS	6
4. ABREVIATURAS	7
5. RESUMO	9
6. ABSTRACT	10
7. INTRODUÇÃO	11
8. REVISÃO DA LITERATURA	13
8.1. Erros Inatos do Metabolismo	13
8.2. Doenças lisossômicas	15
8.3. Mucopolissacaridoses	17
8.4. Mucopolissacaridose tipo VI	19
8.4.1. História	19
8.4.2. Herança	20
8.4.3. Epidemiologia	20
8.4.4. Manifestações clínicas	21
8.4.5. Diagnóstico	27
8.4.6. Tratamento	30
8.5. Biologia celular e molecular da Mucopolissacaridose tipo VI	32
8.5.1. Lisossomo	32
8.5.2. Glicosaminoglicanos	34

8.5.3. Enzima <i>N</i> -acetilgalactosamina-4-sulfatase	36
8.5.4. Gene Arilsulfatase B	40
8.5.5. Mutações	42
8.5.6. Polimorfismos	45
8.5.7. Correlação genótipo-fenótipo.....	47
8.6. Genética Médica Populacional	51
8.6.1. Casamentos consanguíneos	51
8.6.2. Efeito fundador.....	55
8.6.3. Haplótipos	55
8.7. Rede MPS Brasil.....	56
8.8. Monte Santo	57
8.8.1. Histórico	57
8.8.2. Informações sócio-econômicas	60
8.8.3. Projeto Genética no Sertão.....	61
8.8.4. Mucopolissacaridose tipo VI em Monte Santo	65
9. OBJETIVOS.....	67
10. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA	68
11. ARTIGO 1 – Publicado na revista <i>Molecular Genetics and Metabolism</i> em 2011.....	77
11.1. Versão em português	89
12. ARTIGO 2.....	103
12.1. Versão em português	120
13. ARTIGO 3	137

14. CONSIDERAÇÕES FINAIS	155
15. ANEXOS	157
15.1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	157
15.2. Modelo do laudo entregue aos pacientes e familiares de Monte Santo com o resultado do exame molecular	159
15.3. Aula ministrada em maio de 2010 para os familiares dos pacientes com MPS VI em Monte Santo/BA por Fabiana Moura Costa Motta	160
15.4. Heredogramas	164
16. FONTES FINANCIADORAS DO PROJETO.....	171

1. ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Classificação das Mucopolissacaridoses	18
Tabela 2 - Relação das mutações de sentido trocado “ <i>missense</i> ” descritas no gene arilsulfatase B nos pacientes com MPS VI	43
Tabela 3 - Relação das mutações sem sentido “ <i>nonsense</i> ” descritas no gene arilsulfatase B nos pacientes com MPS VI	44
Tabela 4 - Relação das deleções e inserções descritas no gene arilsulfatase B nos pacientes com MPS VI	44
Tabela 5 - Relação das mutações em sítios de <i>splicing</i> descritas no gene arilsulfatase B nos pacientes com MPS VI	44
Tabela 6 - Relação dos polimorfismos descritos no gene arilsulfatase B	46
Tabela 7 - Descrição dos fenótipos relacionados com as mutações no gene ARSB dos pacientes com MPS VI	49

2. ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Via metabólica mostrando as possíveis consequências causadas pelas deficiências enzimáticas específicas ou decorrentes de falhas no transporte de proteínas	14
Figura 2 - Esquema proposto da patologia das doenças de acúmulo lisossômico	15
Figura 3 - Modelo de herança autossômica recessiva observado na MPS VI	20
Figura 4 - A: Foto do rosto de paciente com MPS VI; B: Foto do olho de paciente com MPS VI; C: Foto da mão de paciente com MPS VI	26
Figura 5 - Degradação de glicosaminoglicanos	28
Figura 6 - Síntese das enzimas lisossomais	33
Figura 7 - Polissacarídeo dermatan sulfato	35
Figura 8 - Etapas de degradação do dermatan sulfato	36
Figura 9 - Alinhamento das sequências de aminoácidos das sulfatases humanas	37
Figura 10 - Diagrama topológico do polipeptídeo arilsulfatase B	38
Figura 11 - Estrutura molecular da arilsulfatase B	39
Figura 12 - Esquema do polipeptídeo arilsulfatase B	39
Figura 13 - Sequência de nucleotídeos do gene arilsulfatase B e dos respectivos aminoácidos da proteína <i>N</i> -acetilgalactosamina-4-sulfatase	41
Figura 14 - Representação da estrutura do gene arilsulfatase B	42
Figura 15 - Correlação do genótipo com os níveis de GAGs urinários e a idade	50
Figura 16 - Mapa do estado da Bahia mostrando a localização do município de Monte Santo	57
Figura 17 - Mapa com os municípios vizinhos ao de Monte Santo	58
Figura 18 - Foto do morro em dia de procissão para a Capela de Santa Cruz	59
Figura 19 - Povoados do município de Monte Santo	61
Figura 20 - Irmãos com MPS VI que estimularam a pesquisa em Monte Santo	62
Figura 21 - Equipe integrante da primeira viagem para Monte Santo	63
Figura 22 - Equipe integrante da quarta viagem para Monte Santo	63
Figura 23 - Equipe integrante da quinta viagem para Monte Santo	64
Figura 24 - Atividades desenvolvidas em Monte Santo pela equipe multidisciplinar.	65
Figura 25 - Fotos dos 13 pacientes com MPS VI de Monte Santo	66

3. ÍNDICE DE QUADROS

	Página
Quadro 1 - Classificação dos Erros Inatos do Metabolismo segundo Saudubray & Charpentier, 1995	14
Quadro 2 - Principais doenças lisossômicas	16

4. ABREVIATURAS

A – Adenina

ALK – Fosfatase Alcalina

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APAE – Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais

ARSB – Arilsulfatase B ou *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatase

ARSA ou ASA – Arilsulfatase A

BA – Bahia

C – Citosina

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

cDNA – DNA complementar

CHO – *N*-glicosilação

cm – Centímetro(s)

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

D-GalNAc – *N*-acetil-D-galactosamina

DL – Doenças Lisossômicas

DNA – *DeoxyriboNucleic Acid* (ácido desoxirribonucleico)

DS – Dermatan Sulfato

EIM – Erro(s) Inato(s) do Metabolismo

EMA – *European Medicines Agency*

F – Coeficiente de endocruzamento

FDA – *Food and Drug Administration*

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

°C – Grau(s) Celsius

G – Guanina

GEMEPO – Genética Médica Populacional

GAGs – Glicosaminoglicanos

GAL6S – *N*-acetilgalactosamina-6-sulfatase

GLU6S – *N*-acetilglucosamina-6-sulfatase

HGMD – *Human Gene Mutation Database*

HS – Heparan Sulfato

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

INAGEMP – Instituto Nacional de Genética Médica Populacional

Kb – Kilobases

KDa – Quilodalton
 Km – Quilômetro(s)
 µg/mg – Microgramas por miligramas
 M6-P – Manose-6-fosfato
 MPS – Mucopolissacaridose(s)
 MPS I – Mucopolissacaridose tipo I
 MPS VI – Mucopolissacaridose tipo VI
 mRNA – RNA mensageiro
 OMIM – *Online Mendelian Inheritance in Man*
 pb – Par(es) de Base
 PIB – Produto Interno Bruto
 r – Coeficiente de consaguinidade
 RE – Retículo Endoplasmático
 RER – Retículo Endoplasmático Rugoso
 RJ – Rio de Janeiro
 RNA – *RiboNucleic Acid* (ácido ribonucleico)
 RS – Rio Grande do Sul
 SNPs – *Single Nucleotide Polymorphism* (polimorfismos de sequência única)
 STS – Sulfatase Esteróide
 T – Timina
 TMO/TCTH – Transplante de Medula Óssea / Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas
 TRE – Terapia de Reposição Enzimática

Abreviatura dos aminoácidos					
Alanina	A	Ala	Leucina	L	Leu
Arginina	R	Arg	Lisina	K	Lys
Asparagina	N	Asn	Metionina	M	Met
Ácido Aspártico	D	Asp	Fenilalanina	F	Phe
Cisteína	C	Cys	Prolina	P	Pro
Glutamina	Q	Gln	Serina	S	Ser
Ácido Glutâmico	E	Glu	Treonina	T	Thr
Glicina	G	Gly	Triptofano	W	Trp
Histidina	H	His	Tirosina	Y	Tyr
Isoleucina	I	Ile	Valina	V	Val

5. RESUMO

Mucopolissacaridose tipo VI é uma doença lisossômica causada pela deficiência de arilsulfatase B. A incidência de MPS VI é muito baixa, geralmente menos de 1 caso para cada 1.000.000 recém-nascidos. Até o presente momento, 133 mutações e 13 polimorfismos foram identificados no gene da arilsulfatase B. Entretanto, a maioria dos alelos mutantes ou está presente somente em um indivíduo ou em poucos pacientes, o que demonstra a grande heterogeneidade alélica da MPS VI. No município de Monte Santo, Nordeste do Brasil, foram identificados treze pacientes com MPS VI. O objetivo deste trabalho foi identificar a(s) mutação(ões) presente(s) nos pacientes com MPS VI de Monte Santo/BA e os heterozigotos nas famílias; definir haplótipos utilizando *SNPs* para identificação de uma possível origem comum do alelo mutado nesta população e permitir aconselhamento genético eficiente, bem como orientações sobre a doença aos familiares com indivíduos afetados. Os 13 pacientes com MPS VI apresentavam a mutação p.H178L em homozigose e o mesmo haplótipo para os *SNPs* intragênicos. Nas viagens realizadas até o município durante este trabalho foram coletadas 236 amostras de sangue dos familiares, a mutação p.H178L foi detectada em 98 (20,8%) alelos, sendo 41,5% da amostra composta por indivíduos heterozigotos. Com base em dados atuais, a prevalência de MPS VI nesta região é estimada em 1:5.000 recém-nascidos. As análises dos heredogramas indicam a presença de vários indivíduos com chance de 25% ou até 50% de serem heterozigotos. Monte Santo é uma região pequena e isolada e, os altos índices de endogamia fazem com que o alelo p.H178L permaneça frequente nesta região. Estes resultados, juntamente com a análise dos heredogramas, sugerem um efeito fundador, o que reforça a necessidade de um programa abrangente de genética comunitária para esta área, incluindo uma triagem neonatal e estudos com os membros das famílias para promover um aconselhamento genético.

6. ABSTRACT

Mucopolysaccharidosis type VI is a lysosomal disease caused by deficiency of arylsulfatase B. The incidence of MPS VI is very low, usually less than 1 case for every 1,000,000 newborns. To date, 133 mutations and 13 polymorphisms were identified in the arylsulfatase B gene. However, the majority of mutant alleles are present only in one individual or in a few patients, demonstrating the allelic heterogeneity of MPS VI. In the county of Monte Santo, northeast Brazil, thirteen patients with MPS VI were identified. The objective of this study was to characterize the mutation(s) present(s) in MPS VI patients from Monte Santo/BA and to detect heterozygous within the families. We also aimed to define haplotypes using SNPs to identify a possible common origin of the mutant allele in this population and allow efficient genetic counseling and assistance regarding the disease to families with affected individuals. The 13 MPS VI patients showed the p.H178L mutation in homozygosis and the same haplotype for intragenic SNPs. During field trips to Monte Santo along this study we collected 236 blood samples from family members, p.H178L mutation was detected in 98 (20.8%) alleles, and 41.5% of the samples were heterozygous individuals. Based on current data, the prevalence of MPS VI in this region is estimated at 1:5,000 newborns. Pedigree analysis indicates the presence of many individuals with a 50% and 25% chance of being heterozygous. Monte Santo is a small, isolated region and the high levels of inbreeding allows for p.H178L allele to remain common in this region. These results, together with the analysis of pedigrees suggest a founder effect, which reinforces the need for a comprehensive program of community genetics in this area, including a neonatal screening and studies of family members to promote a genetic counseling.

7. INTRODUÇÃO

As doenças lisossômicas (DL) são caracterizadas pela deficiência de enzimas lisossomais e constituem um grupo de aproximadamente 50 tipos distintos (Wraith, 2002). As DL estão envolvidas em uma via de degradação metabólica, levando ao acúmulo de substrato no interior dos lisossomos e excreção de produtos parcialmente degradados pela urina. A incidência das DL, em conjunto, é estimada em 1:5.000 recém nascidos vivos (Meikle *et al.*, 1999) e podem ser classificadas conforme o tipo de substrato acumulado em mucopolissacaridoses (MPS), glicoproteínoses, esfingolipidoses, glicogenoses e outras (Gieselmann, 1995).

As MPS são um grupo de doenças hereditárias causadas pela deficiência de uma das onze enzimas lisossomais envolvidas na degradação dos glicosaminoglicanos (GAGs) (Neufeld e Muenzer, 2001). Os GAGs são polímeros longos, não ramificados, formados por unidades alternadas de ácido urônico e hexosamina, sendo classificados em cinco diferentes grupos: condroitin sulfato, dermatan sulfato, heparan sulfato, ácido hialurônico e queratan sulfato (Byers *et al.*, 1998).

A atividade deficiente de qualquer uma das onze enzimas envolvidas na rota de degradação dos GAGs causa o acúmulo de substrato parcialmente degradado no interior dos lisossomos e aumento da excreção urinária dos GAGs, levando aos diferentes tipos de MPS. A classificação das MPS está baseada no defeito enzimático, correspondendo aos seguintes fenótipos clínicos: Hurler, Hurler-Scheie, Scheie, Hunter, Sanfilippo, Morquio, Maroteaux-Lamy e Sly. A incidência total de MPS é de 1:22.000 a 1:50.000 (Poorthuis *et al.*, 1999; Applegarth *et al.*, 2000) recém nascidos vivos.

A mucopolissacaridose tipo VI (MPS VI) ou síndrome de Maroteaux-Lamy é uma doença autossômica recessiva, causada pela deficiência da enzima *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatase ou arilsulfatase B (ARSB). A MPS VI é caracterizada pelo armazenamento intralisossomal e excreção urinária de elevados níveis de dermatan sulfato. No Brasil, a

incidência de MPS VI ainda não foi relatada, mas se acredita que seja rara, principalmente quando comparada com a MPS I que é o tipo mais frequente no Brasil, com uma incidência estimada em 1:106.000 nascidos (Matte, 2001).

O gene da ARSB está localizado no braço longo do cromossomo 5, na região 5q13.3 – 5q14.1 (Litjens *et al.*, 1989). O isolamento e sequenciamento do cDNA da ARSB humana, realizado por Peters e colaboradores em 1990, possibilitou a caracterização da proteína ARSB, a qual é composta por 533 resíduos de aminoácidos.

A partir da descrição da primeira mutação por Wicker e colaboradores em 1991, uma série de outras mutações foram sendo identificadas. Até o presente momento, 133 mutações foram identificadas no gene ARSB. Entretanto, a maioria dos alelos mutantes ou está presente somente em um indivíduo ou em poucos pacientes, o que demonstra a grande heterogeneidade alélica da MPS VI. Até o momento, já foram descritos 13 polimorfismos no gene ARSB (HGMD; Litjens & Hopwood, 2001; Karageorgos *et al.*, 2004, 2007; Petry *et al.*, 2003, 2005).

Incluído totalmente no “Polígono das Secas”, o Município de Monte Santo – Bahia compreende uma área de 3.298 Km² e está a uma distância de 352 km de Salvador, capital do estado. A população de Monte Santo é de aproximadamente 52.338 habitantes, com 850 nativos registrados em 2009 (IBGE - 2010). Nesse município, têm sido diagnosticadas diversas doenças genéticas (monogênicas) autossômicas recessivas em pacientes de várias famílias residentes. Esta observação sugere uma estrutura reprodutiva endogâmica da população que pode ser relacionada com outras patologias crônicas, incluindo tanto as doenças raras monogênicas como as doenças comuns poligênicas, susceptíveis de prevenção primária e terciária.

Entre estas doenças foram identificados 13 pacientes com MPS VI, havendo a possibilidade da existência de outros casos não registrados nesta região. Através de levantamento familiar, surgiram relatos de vários indivíduos que já foram a óbito com características similares.

8. REVISÃO DA LITERATURA

8.1. Erros Inatos do Metabolismo

O termo Erro Inato do Metabolismo (EIM) designa um conjunto de doenças decorrentes de falhas nos processos de síntese, degradação, transporte e/ou armazenamento de moléculas no organismo. O termo foi proposto, inicialmente, por Garrot, em 1908, para caracterizar quatro situações que estudava: alcaptonúria, albinismo, pentosúria e cistinúria. Inicialmente, ele relacionou a ocorrência de alcaptonúria ao acúmulo de ácido homogentísico no organismo e, depois estudando a cistinúria, o albinismo e a pentosúria, ele sugeriu que esse grupo de doenças eram ocasionadas por um bloqueio metabólico. Reunindo suas observações com o fato dos casos ocorrerem mais frequentemente em irmãos, filhos de pais consanguíneos, estabeleceu uma ligação com as então recém descobertas Leis de Mendel (Garrot & Lond, 1908).

Os EIM são compostos por quase 500 enfermidades (Neufeld & Muenzer, 2001), representando 10% de todas as doenças genéticas. A maioria dos EIM é herdada de forma autossômica recessiva, havendo um grupo com herança ligada ao sexo e raros exemplos com herança autossômica dominante (Giuglani, 1998).

Os EIM compõem um vasto grupo de distúrbios genéticos, ocasionados por deficiências enzimáticas específicas ou decorrentes de falhas no transporte de proteínas, que podem levar ao acúmulo de substâncias normalmente presentes em pequena quantidade, a deficiência de produtos intermediários críticos, a deficiência de produtos finais específicos ou ainda o excesso nocivo de vias metabólicas acessórias (Figura 1) (Karam *et al.*, 2001).

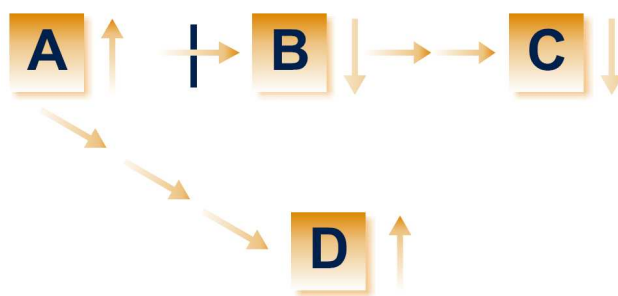


Figura 1 – Via metabólica mostrando as possíveis consequências causadas pelas deficiências enzimáticas específicas ou decorrentes de falhas no transporte de proteínas como: acúmulo de substâncias normalmente presentes em pequena quantidade (A), a deficiência de produtos intermediários críticos (B), a deficiência de produtos finais específicos (C) ou ainda o excesso nocivo de vias metabólicas acessórias (D).

Os EIM têm incidência individual pequena, mas em conjunto chegam a afetar até 1:1.000 recém-nascidos (Giugliani, 1998). Applegarth e colaboradores, em 2000 no Canadá, encontraram uma incidência de EIM de 1:2.500. Na América do Sul, há poucos estudos descrevendo a frequência dos EIM em grupos de pacientes de alto risco. Em dois, com amostras mais significativas, a frequência encontrada foi de aproximadamente 6,5% (Chamoles *et al.*, 1994; Coelho *et al.*, 1997).

Os EIM podem ser classificados em três grandes grupos, segundo Saudubray & Charpentier, 1995, utilizando o fenótipo clínico das doenças (Quadro 1).

Quadro 1 – Classificação dos Erros Inatos do Metabolismo segundo Saudubray & Charpentier, 1995.

Grupos	Características	Doenças
Defeitos de síntese ou catabolismos de moléculas complexas	Sinais e sintomas permanentes e progressivos	Lisossomais e peroxissomiais
Defeito no metabolismo intermediário	Intoxicação aguda e crônica	Aminoácidos, ácidos orgânicos, ciclo da uréia e intolerância aos açúcares
Defeito na produção/ utilização de energia	Metabolismo intermediário de fígado, músculo e cérebro	Depósito de glicogênio, Hiperlaticemias congênitas, Mitocondriais e defeito de β -oxidação de ácidos graxos

8.2. Doenças lisossômicas

As Doenças Lisossômicas (DL) são erros inatos do metabolismo que tem como característica comum a deficiência de uma proteína lisossômica de uma via de degradação metabólica. Essa falha causa um acúmulo de um substrato específico, parcialmente degradado, no interior dos lisossomos, perturbando a fisiologia normal da célula (Matte, 1998). O acúmulo progressivo de macromoléculas não digeridas no interior dos lisossomos gera uma disfunção celular, como apresentado na figura 2.

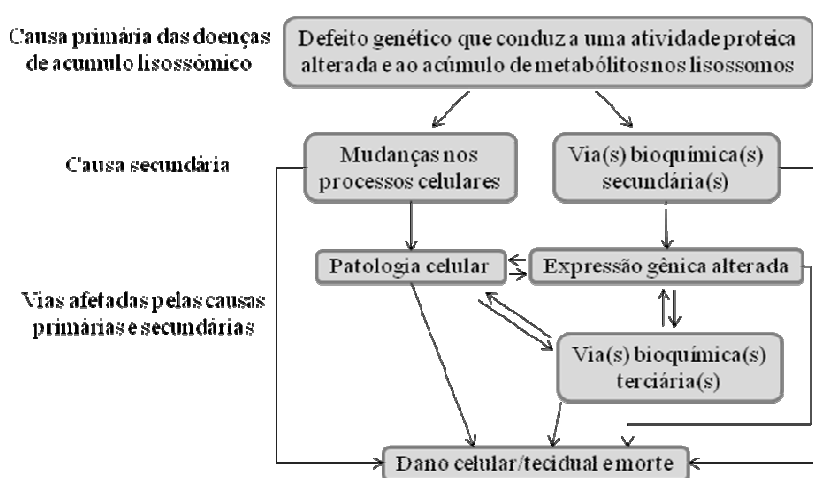


Figura 2 - Esquema proposto da patologia das doenças de acúmulo lisossômico. A causa primária da doença é o acúmulo intralisossomal de substratos não metabolizados, mas a ampla classificação e variedade dos sintomas indicam que devem haver vias bioquímicas e celulares secundárias ativadas que provocam a patologia celular, a alteração na expressão gênica e a ativação das vias bioquímicas terciárias (Adaptado de Futerman & van Meer, 2004).

As DL são causadas por uma ou mais mutações em cerca de 40 genes diferentes que codificam proteínas de hidrólise e transporte de componentes celulares (Wenger *et al.*, 2002). As DL compreendem um grupo de mais de 50 doenças diferentes que podem ser classificadas de acordo com a via afetada e a natureza do substrato acumulado em esfingolipídoses, mucopolissacarídoses, glicoproteinoses e outras (Futerman & van Meer, 2004). As principais estão resumidas no quadro 2.

Quadro 2 - Principais Doenças Lisossômicas (Adaptado de Futerman & van Meer, 2004).

Doença	Proteína defeituosa	Principais materias armazenados
Esfingolipídioses		
Fabry	α -Galactosidase A	Globotriaosilceramida
Gaucher	β -Glucosidase	Glucosilceramida
Niemann-Pick A e B	Esfingomielinase	Esfingomielina
Gangliosídeos GM1	β -Galactosidase	Gangliosídeo GM1
Gangliosídeos GM2 (Tay-Sachs)	β -Hexosaminidase A	Gangliosídeo GM2 e glicolípídeos relacionados
Gangliosídeos GM2 (Sandhoff)	β -Hexosaminidase A e B	Gangliosídeo GM2 e glicolípídeos relacionados
Gangliosídeos GM2 (Deficiência do ativador de GM2)	Proteína ativadora de GM2	Gangliosídeo GM2 e glicolípídeos relacionados
Mucopolissacarídioses		
MPS I (Hurler, Scheie, Hurler/ Scheie)	α -Iduronidase	Dermatan Sulfato e Heparan Sulfato
MPSII (Hunter)	Iduronidato-2-Sulfatase	Dermatan Sulfato e Heparan Sulfato
MPS IIIA (Sanfilippo A)	Heparan N-Sulfatase	Heparan Sulfato
MPS IIIB (Sanfilippo B)	N-Acetil- α -glucosaminidase	Heparan Sulfato
MPS IIIC (Sanfilippo C)	Acetil-CoA: α -glucosamida N-acetiltransferase	Heparan Sulfato
MPS IIID (Sanfilippo D)	N-Acetilglucosamina-6-sulfatase	Heparan Sulfato
MPS IV (Morquio A)	N-Acetilgalactosamina	Queratan Sulfato e Controitin Sulfato
MPS IV (Morquio B)	β -Galactosidase	Queratan Sulfato
MPS VI (Maroteaux-Lamy)	N-Acetilgalactosamina-4-sulfatase (Arilsulfatase B)	Dermatan Sulfato
MPS VII (Sly)	β -Glucuronidase	Heparan Sulfato, Dermatan Sulfato e Controitin Sulfato
Oligosacarídioses e glicoproteínioses		
Pompe	α -Glucosidase	Glicogênio
Doenças causadas por defeitos em proteínas integrais da membrana		
Cistinose	Cistinosina	Cistina
Doença de Danon	LAMP2	Restos citoplasmáticos e glicogênio
Mucolipidose (ML) IV	Mucolipina-1	Lípídios e mucopolissacarídeos ácidos
Niemann-Pick C (NPC)	NPC 1 e 2	Colesterol e esfingolípídeos
Outras		
Galactosialídioses	Catepsina A	Sialiloligosacarídeos
Deficiência Múltipla de Sulfatases	Enzima geradora de α -formilglicina	Sulfatídeos
Lipofuscina Ceroide Neuronal (NCL1)	Proteína palmitoiltoesterase-1	Tioésteres lipídicos
Lipofuscina Ceroide Neuronal (NCL2)	Tripeptidil Amino Peptidase-1	Subunidade c da ATP sintetase mitocondrial
Lipofuscina Ceroide Neuronal (NCL3)	Transportador de Arginina	Subunidade c da ATP sintetase mitocondrial

As DL tem incidência estimada de 7-14:100.000 nascimentos, de modo geral variando conforme a procedência da amostra estudada: Meikle e colaboradores (1999), na Austrália, descreveram uma incidência de 13:1.000.000 nascimentos; Poorthuis e colaboradores (1999), na Holanda, uma incidência de 14:100.000 nascimentos; Applegarth e colaboradores (2000), no Canadá, uma incidência de 7,6:100.000 nascimentos; Tylhi-Szymanska e colaboradores (2001), na Polônia, uma incidência de 0,5 a 2:100.000 recém nascidos vivos. No Brasil,

Coelho e colaboradores (1997), encontraram uma frequência relativa de DL de 59,8% entre pacientes de risco.

8.3. Mucopolissacaridoses

As Mucopolissacaridoses (MPS) são um grupo de DL causadas pela deficiência de uma das onze enzimas lisossomais envolvidas na degradação de glicosaminoglicanos (GAGs) que se acumulam, parcialmente degradados, nos lisossomos. São doenças progressivas que apresentam ampla heterogeneidade clínica, inclusive para uma mesma deficiência enzimática (Neufeld & Muenzer, 2001).

As MPS foram descritas clinicamente pela primeira vez em 1917, por Hunter, mas as bases bioquímicas só foram elucidadas entre as décadas de 50 a 60 e, só mais recentemente, as bases moleculares e os subtipos foram descritos (Wraith, 1996). Em 1952, Brante isolou e identificou a substância acumulada nos pacientes com gargolismo, denominação dada aos indivíduos com as características faciais típicas dos pacientes com MPS, como sendo mucopolissacarídeos (ou GAGs) e propôs o termo mucopolissacaridose para essa doença. Em 1968, demonstraram que o acúmulo desses GAGs é resultante da degradação ineficiente e não de uma síntese excessiva ou de uma redução na secreção (Matte, 1998).

Os GAGs são formados por cadeias polissacarídicas ácidas, não ramificadas, compostas por repetições de dissacarídeos. De acordo com o resíduo de açúcar, o tipo de ligação entre eles, o número e localização dos grupos sulfato, são definidos cinco grupos de GAGs: ácido hialurônico, condroitin sulfato, dermatan sulfato, heparan sulfato e queratan sulfato. Dependendo da enzima deficiente, o catabolismo de um desses GAGs pode ser bloqueado de forma individual ou em combinação (Neufeld & Muenzer, 2001).

Os GAGs são componentes da matriz extracelular, formando glicoproteínas macromoleculares (proteoglicanos) que dão elasticidade aos tecidos e os capacita a manter sua formação característica. Existe uma contínua renovação celular de proteoglicanos, sendo

que a sua degradação se inicia pela clivagem por proteases extracelulares e, depois pela ação sequencial das enzimas lisossomais que produzem monossacarídeos e sulfato inorgânico (Matte, 1998).

O acúmulo intralisossomal de GAGs parcialmente degradados interfere com a função celular normal, causando apoptose de alguns grupos celulares, o que está parcialmente relacionado com as manifestações clínicas típicas desse grupo de doenças. Esses GAGs também são excretados em excesso na urina dos pacientes afetados (Wraith, 1996).

As MPS são classificadas em sete principais tipos, de acordo com a enzima deficiente e quanto ao substrato que se acumula (Tabela 1) (Neufeld & Muenzer, 2001).

Tabela 1 – Classificação das Mucopolissacaridoses.

MPS	Enzima Deficiente	Sigla	Epônimo	GAGs acumulados
I	α -L-iduronidase	IDUA	Hurler, Hurler-Scheie, Scheie	Dermatan e Heparan Sulfatos
II	Iduronato-L-sulfatase	IDS	Hunter	Dermatan e Heparan Sulfatos
IIIA	Heparan-N-sulfatase	SGSH	Sanfilippo A	Heparan Sulfato
IIIB	α -N-acetilglicosaminidase	NAGLU	Sanfilippo B	Heparan Sulfato
IIIC	AcCoA: α -glicosamina acetiltransferase	GNAT	Sanfilippo C	Heparan Sulfato
IIID	N-acetilglicosamina 6-sulfatase	G6S	Sanfilippo D	Heparan Sulfato
IVA	Galactose 6-sulfatase	GALNS	Morquio A	Queratan e Condroitin Sulfatos
IVB	β -galactosidase	GLB1	Morquio B	Queratan Sulfatos
VI	N-acetilgalactosamina 4-sulfatase	ARSB	Maroteaux-Lamy	Dermatan Sulfato
VII	β -glicuronidase	GUSB	Sly	Dermatan, Queratan e Condroitin Sulfatos
IX	Hialuronidase	HYAL1	Natowicz	Ácido Hialurônico

Nelson (1997), na Irlanda do Norte, descreve uma incidência conjunta das MPS estimada em 1,3:100.000 nascidos vivos; Meikle e colaboradores (1999), na Austrália, uma incidência de 4,4:100.000 (35% das DL diagnosticadas); Poorthuis e colaboradores (1999), na Holanda, uma incidência de 4,5:100.000 nascimentos; Applegarth e colaboradores (2000), no Canadá, uma incidência de 1,8:100.000 nascimentos.

8.4. Mucopolissacaridose tipo VI

8.4.1. História

A Mucopolissacaridose Tipo VI (MPS VI), ou Síndrome de Maroteaux-Lamy (OMIM 253200), foi descrita pela primeira vez em 1963 pelos médicos franceses Pierre Maroteaux e Maurice Emile Joseph Lamy como uma síndrome semelhante à síndrome de Hurler (MPS I), mas com inteligência preservada e excreção urinária de dermatan sulfato (DS) não acompanhada de heparan sulfato (HS) (Neufeld & Muenzer, 2001; Nyhan & Ozand, 1998).

O primeiro teste enzimático para o diagnóstico direto da MPS VI, mediante a determinação diferencial de glicosaminoglicanos na urina, esteve disponível em 1969. Posteriormente, foram sendo desenvolvidos outros sistemas de detecção (Fernández, 2008). No início dos anos 70, determinou-se que a enzima deficiente nesta doença era a arilsulfatase B (Baron & Neufeld, 1972; Stumpf *et al.*, 1973), contra a qual Gibson e colaboradores purificaram o primeiro anticorpo monoclonal em 1987.

O primeiro modelo animal descrito foi um gato siamês que apresentava a forma natural da MPS VI (Jezyk *et al.*, 1977). Posteriormente foram descrevendo-se outros modelos animais como ratos e camundongos (Yoshida *et al.*, 1993; Evers *et al.*, 1996).

O gene da ARSB humana foi localizado e caracterizado em 1990 por Peters e colaboradores, mas até vários anos mais tarde não se conhecia com precisão sua extensão e os limites entre os éxons e íntros (Modaressi *et al.*, 1993). A partir dessa data, sucederam-se os estudos de análise mutacional em pacientes com MPS VI em diversas populações.

Em 1997, foi publicada a estrutura cristalográfica da proteína (Bond *et al.*, 1997), totalizando quatro sulfatases com estrutura tridimensional determinada até essa data. Paralelamente, estudavam-se as primeiras abordagens para terapia gênica com fibroblastos de pacientes (Anson *et al.*, 1992) e a terapia de reposição enzimática, mediante administração exógena de ARSB humana recombinante em modelos animais (Brooks *et al.*, 1997;

Yogalingam *et al.*, 1997). Em 2006, foi aprovada a comercialização da enzima Naglazyme® (galsulfase) como terapia de reposição enzimática a longo prazo para a MPS VI.

8.4.2. Herança

A Síndrome de Maroteux-Lamy apresenta uma herança monogênica autossômica recessiva (Figura 3). Em cada gestação, o risco de recorrência para casais que já possuem filhos com MPS VI é de 25% para filhos afetados, 50% para filhos portadores e 25% para filhos normais não portadores.

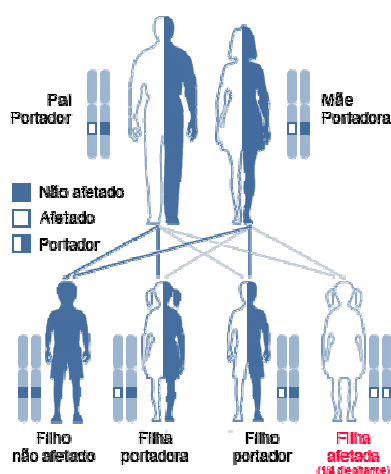


Figura 3 - Modelo de herança autossômica recessiva observado na Mucopolissacaridose tipo VI.

8.4.3. Epidemiologia

A incidência, estimada a nível mundial para a MPS VI, varia de 1:238.095 a 1:1.300.000 nascidos vivos entre as diferentes populações (Lowry *et al.*, 1990, na colúmbia britânica; Meikle *et al.*, 1999, na Austrália; Poorthuis *et al.*, 1999, na Holanda; Pinto *et al.*, 2004, em Portugal; Baehner *et al.*, 2005, na Alemanha). No Brasil e em Portugal, entre as DL em geral, a MPS VI parece ser relativamente frequente com o dobro de prevalência da Austrália e Holanda (Coelho *et al.*, 1997; Pinto *et al.*, 2004).

Calcula-se que pode haver em torno de 1.100 indivíduos afetados com MPS VI em todo o mundo, dos quais só 10% tem sido estudados do ponto de vista bioquímico e genético

(Swiedler *et al.*, 2005; Karageorgos *et al.*, 2007). Embora não exista uma incidência disponível para a população brasileira, uma triagem seletiva de uma população de alto risco no Brasil mostrou que 19% dos pacientes identificados com mucopolissacaridose tinham MPS VI (Coelho *et al.*, 1997). Albano e colaboradores (2000), em um estudo realizado em São Paulo, encontraram 47,3% de diagnóstico de MPS VI entre todos os casos de MPS diagnosticados.

A MPS VI foi considerada uma das mucopolissacaridoses mais raras (Poorthuis *et al.*, 1999; Meikle *et al.*, 1999). Na Austrália, relatou-se uma incidência para MPS VI de 0,4:100.000 nascimentos (Meikle *et al.*, 1999). Na Irlanda do Norte, com dados de 25 anos (mais de 800.000 nascimentos), não foram encontrados casos diagnosticados de MPS VI, assim como no Canadá, com dados de 24 anos (mais de 1.000.000 de nascimentos) (Nelson, 1997; Applegarth *et al.*, 2000).

Alguns autores descrevem diferentes frequências relativas dentro das demais DL: Michelakakis e colaboradores (1995), na Grécia, com dados de 13 anos, descrevem a MPS VI como sendo responsável por 8,3% de todas as DL diagnosticadas; Coelho e colaboradores (1997), no Brasil, acharam dado igual a 6%, sendo nesse estudo considerada, junto com a MPS I, um dos tipos mais frequentes; Poorthuis e colaboradores (1999), na Holanda, descrevem a MPS VI em 0,2% (para MPS I seria de 0,8%). Embora não exista nenhuma associação da MPS VI com algum grupo étnico, locais com efeito fundador têm sido sugerido para o Norte de Portugal e regiões do Brasil (Giugliani *et al.*, 2007).

8.4.4. Manifestações clínicas

Os sintomas clínicos da MPS VI variam muito com a idade de início e a taxa de progressão da doença. Um estudo transversal, com um grupo de 121 pacientes com MPS VI que não estavam em tratamento, sugeriu a classificação da MPS VI em dois grandes grupos, baseada na altura e nos níveis de GAGs urinários (Swiedler *et al.*, 2005).

Altos níveis de GAGs urinários (>200 µg/mg de creatinina) foram associados com um curso clínico avançado em relação a idade caracterizado por baixa estatura (entre 80 a 120 cm), baixo peso corporal, resistência diminuída ao teste de caminhada, comprometimento da função pulmonar e redução da amplitude de movimento. Pacientes com idade superior a 20 anos foram raramente encontrados com GAGs urinários em níveis acima de 100 µg/mg de creatinina, sugerindo que GAG < 100 µg/mg de creatinina pode prever uma maior sobrevida. Os pacientes com progressão lenta da doença tendem a ter alturas acima de 140 cm e níveis de GAGs urinários abaixo de 100 µg/mg de creatinina (Valayannopoulos *et al.*, 2010).

Embora sistemas de classificação descritiva, em sua maioria, mostrem pacientes progredindo rapidamente (com sintomas graves) ou lentamente (com sintomas leves ou atenuados), um estágio intermediário também tem sido descrito (Pilz *et al.*, 1979; Paterson *et al.*, 1982; Tonnesen *et al.*, 1991; Wicker *et al.*, 1991; Isbrandt *et al.*, 1994; Swiedler *et al.*, 2005; Karageorgos *et al.*, 2007). Em comparação com a doença rapidamente progressiva, onde os sintomas graves ocorrem em vários sistemas ao mesmo tempo, pacientes com progressão lenta podem ter sintomas clinicamente significativos, mas em menor número de sistemas (Tonnesen *et al.*, 1991).

A MPS VI é uma doença clinicamente heterogênea, com as duas formas clínicas, lenta ou rapidamente progressiva, resultando em um declínio significativo do bem estar físico/funcional e diminuindo a vida útil destes pacientes (Giugliani *et al.*, 2007).

Os achados radiológicos característicos da MPS VI, de outras MPS, da mucopolidose e de outras doenças de depósito são denominados de "disostose múltipla". Achados radiológicos típicos incluem ossos do metacarpo curtos e alargados, ossos do carpo irregulares e hipoplásicos, ossos do tarso com contornos irregulares, cabeça do fêmur displásica, displasia grave do quadril, desenvolvimento anormal dos corpos vertebrais da coluna vertebral, costelas em forma achatada e curtas, clavículas irregulares e alargadas, porção distal da ulna e do rádio hipoplásicas e espessamento do espaço da díploe craniana. Pacientes com MPS VI de

progressão lenta podem não demonstrar todas as características de disostose múltipla apresentadas acima (Valayannopoulos *et al.*, 2010).

Na MPS VI, as doenças relacionadas à otorrinolaringologia muitas vezes envolvem distúrbios de audição e otite média. Além destes, estão presentes patologias orais, faríngeas e doenças obstrutivas das vias aéreas superiores. A fisiopatologia das doenças otorrinolaringológicas na MPS VI está relacionada à deposição de GAGs nas mucosas e em outras camadas de tecidos adjacentes, tais como os da língua e tonsilas, com progressivo estreitamento das vias aéreas na nasofaringe e orofaringe (Shih *et al.*, 2002).

O aumento de produção de muco leva à rinorréia, sinusite e otite média por oclusão da drenagem sinusal e bloqueio das trompas de Eustáquio. Perda de audição permanente é comum e acredita-se ser de natureza condutiva e neurossensorial. Obstrução das vias aéreas superiores levando à apnéia obstrutiva do sono é uma morbidade comum entre os pacientes com MPS VI (Valayannopoulos *et al.*, 2010).

Pacientes com MPS VI podem ter características de doença pulmonar obstrutiva e restritiva. A doença pulmonar obstrutiva está relacionado ao estreitamento dos brônquios e vias respiratórias, à traqueobroncomalácia, uma flacidez das estruturas que pode levar à obstrução aguda das vias aéreas ou até colapsorespiratório. Já a doença pulmonar restritiva é devida a uma caixa torácica pequena e rígida, distensão abdominal, combinadas com cifose, escoliose e aumento da lordose lombar (Semenza & Pyeritz, 1988). Complicações da doença incluem episódios recorrentes de pneumonia, por isso a vacinação contra patógenos respiratórios (especialmente influenza e pneumococo) deve ser considerada (Valayannopoulos *et al.*, 2010).

Anormalidades cardíacas são frequentes em pacientes com MPS VI e são uma importante causa de morbidade e mortalidade (Wippermann *et al.*, 1995; Swiedler *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2005). A doença cardíaca tem sido demonstrada através de sucessivas

ecocardiografias, mostrando que existe um agravamento progressivo com a idade, mesmo nos pacientes com progressão lenta (Chen *et al.*, 2005).

Avaliações cardíacas são recomendados a cada 1 ou 2 anos e devem incluir: a medida da pressão arterial, realização de eletrocardiograma e ecocardiograma para avaliar o ritmo cardíaco alterado ou anormalidade de condução, assim como possíveis alterações na estrutura ou função cardíaca (Valayannopoulos *et al.*, 2010). A hipertensão arterial sistêmica é comum em aproximadamente 20% dos pacientes com MPS I e pode ser considerada nos pacientes com MPS VI. A causa dessa hipertensão pode ser atribuída ao estreitamento das artérias aorta/renal ou, ainda, à hipóxia intermitente crônica (Giugliani *et al.*, 2007).

Ashworth e colaboradores, em 2006, publicaram uma revisão em oftalmologia nas MPS e observaram que os pacientes com MPS VI foram particularmente propensos a glaucoma (50%) e opacificação da córnea (95%), que necessitam tratamento com medicação e transplante de córnea, respectivamente.

A maioria dos pacientes com MPS VI tem desenvolvimento intelectual normal (Spranger *et al.*, 1970), ao contrário da MPS I (Hurler) ou MPS II grave (Hunter) (Neufeld & Muenzer, 2001). Apesar de ter sido relatado um atraso intelectual grave em duas famílias com deficiência de arilsulfatase B (Taylor *et al.*, 1978; Vestermark *et al.*, 1987), não ficou claro que fosse causado pela MPS VI (Neufeld & Muenzer, 2001).

Valayannopoulos e colaboradores, em 2009, relataram uma prevalência anormalmente elevada de déficit intelectual, ocorrendo em 4 de 6 pacientes franceses com MPS VI. A frequente perda de visão combinada com uma deficiência auditiva, devido à alteração condutiva e neurosensorial, podem levar à má interpretação de deficiência intelectual nos pacientes com MPS VI.

Os pacientes também podem desenvolver uma compressão da medula cervical, ferimentos causados por anormalidades ósseas e espessamento dural. A cirurgia de

descompressão da medula cervical pode ajudar e evitar a perda de função (Valayannopoulos *et al.*, 2010).

8.4.4.1. MPS VI com progressão rápida

A MPS VI com progressão rápida é caracterizada, na maioria dos casos, por um início dos sintomas antes dos 2 ou 3 anos de idade, mobilidade prejudicada em torno dos 10 anos, ausência ou atraso na puberdade, compressão da medula cervical e insuficiência respiratória. Pacientes com a forma rapidamente progressiva frequentemente foram a óbito por insuficiência cardíaca na 2ª ou 3ª década de vida (Neufeld & Muenzer, 2001). O crescimento muitas vezes diminui após o primeiro ano de vida, com a cessação completa aos 3 a 4 anos de idade (Swiedler *et al.*, 2005).

Outros achados físicos para MPS VI com progressão rápida podem incluir a deformidade torácica, rigidez articular, escoliose ou cifose, acrocefalia, hepatoesplenomegalia, abdômen saliente, hérnia umbilical e/ou inguinal, características faciais típicas (Figura 4): uma ponte nasal deprimida, língua alargada, hipertrofia gengival, erupção dentária retardada e hipertricose (Simmons *et al.*, 2005). Perda auditiva, envolvendo ambos os mecanismos condutivo e neurosensorial, é comum e pode levar à impressão de que o paciente pode ter atraso de desenvolvimento. A visão é muitas vezes comprometida pelo aumento gradativo da opacificação da córnea (Figura 4) (Koseoglu *et al.*, 2009).

Pacientes portadores de MPS VI com progressão rápida, maiores de 10 anos, podem apresentar complicações como obstrução pulmonar grave e insuficiência respiratória, podendo necessitar de traqueostomia (Harmatz, 2008); regurgitação ou estenose da válvula cardíaca que requerem substituição valvular; doença articular grave, especialmente do quadril, mão em garra (Figura 4), cifose grave da coluna vertebral e escoliose (Cardoso-Santos *et al.*, 2008). Estes sintomas graves ocorrendo juntos são típicos de doença rapidamente progressiva e

resultam em hospitalizações e procedimentos cirúrgicos múltiplos acompanhados de alto risco da anestesia (Giugliani *et al.*, 2007).

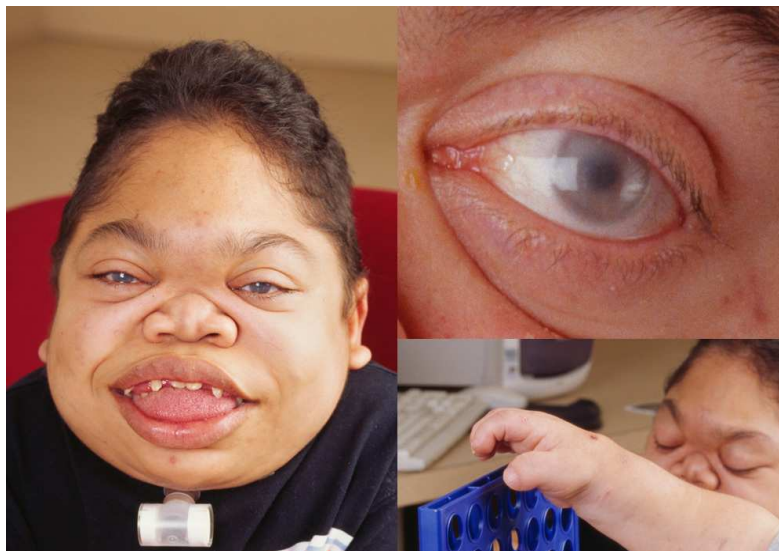


Figura 4 - A: Foto do rosto de paciente com MPS VI, 16 anos, com progressão rápida da doença, mostrando face característica: relevo frontal, língua alargada, lábios grossos, dentição anormal e hiperplasia gengival. B: Foto do olho de paciente com MPS VI, 30 anos, mostrando a opacificação da córnea. C: Foto da mão de paciente com MPS VI, 16 anos, mostrando a deformidade em garra (Valayannopoulos *et al.*, 2010).

8.4.4.2. MPS VI com progressão lenta

A MPS VI com progressão lenta é caracterizada por início tardio dos sintomas, devido a baixos níveis de sulfato de dermatan (Swiedler *et al.*, 2005). Os sinais clínicos podem não aparentar à primeira vista o padrão de MPS VI, mas com a progressão, geralmente na adolescência ou início da idade adulta, os sintomas mais leves podem ser observados levando ao diagnóstico (Neufeld & Muenzer, 2001; Miebach *et al.*, 2007; Lampe *et al.*, 2008). Apesar dos pacientes serem classificados como lentamente progressivos, podem desenvolver complicações ósseas, incluindo a doença do túnel do carpo, doença do quadril e uma diminuição em seu status funcional global nos últimos anos da adolescência (Swiedler *et al.*, 2005).

O diagnóstico geralmente ocorre após os cinco anos de idade e pode ser adiado até a 2ª ou 3ª década. No entanto, a maioria dos pacientes com MPS VI irá desenvolver manifestações

graves da doença em algum momento, incluindo a degeneração articular, doença valvular cardíaca, apnéia do sono, diminuição da função pulmonar e resistência reduzida (Miebach *et al.*, 2007).

Pacientes com características leves não são facilmente reconhecidos como portadores de MPS VI, até que se estabeleça um padrão de achados como os descritos anteriormente. A fisiopatologia é relacionada com o acúmulo progressivo dos GAGs que afeta a estrutura e a função dos órgãos envolvidos, mas há uma menor concentração de armazenamento do que nos pacientes com rápida progressão da doença e, conseqüentemente, uma progressão clínica mais lenta (Valayannopoulos *et al.*, 2010).

A evidência de resposta terapêutica após o tratamento com galsulfase em cinco pacientes adultos com a progressão lenta da doença foi relatado recentemente (Lampe *et al.*, 2008).

8.4.5. Diagnóstico

A maioria dos pacientes tem diagnóstico firmado em torno dos dois anos de idade quando, nas formas mais graves, já aparecem diversas alterações clínicas (Auclair *et al.*, 2003). O diagnóstico se confirma com a presença de dermatan sulfato na urina e a demonstração da deficiência da atividade catalítica da proteína ARSB e, posteriormente, com a análise molecular.

Com relação ao diagnóstico morfológico e histológico, o atraso no crescimento e as características faciais típicas são muitas vezes os primeiros indícios evidentes dessa doença. O acúmulo de GAGs nos lisossomos das células produz uma excessiva vacuolinização que pode ser detectada, histologicamente, em diversos tipos celulares e tecidos, principalmente em fibroblastos, células endoteliais e parenquimais, macrófagos e leucócitos (Figura 5) (Fernández, 2008).

Em 1957, quando foi identificada a presença de dermatan e heparan sulfatos na urina de pacientes com MPS I, as bases para um teste bioquímico de rotina para o diagnóstico da MPS foram estabelecidas (Matte, 1998). Há excreção aumentada na urina de tipos diferentes de GAGs, de acordo com a deficiência enzimática (Tabela 1) (Neufeld & Muenzer, 2001). Por isso, em geral, faz-se primeiro o teste de triagem na urina para orientar a escolha do ensaio enzimático a ser realizado (Schwartz *et al.*, 2001; Wraith, 1996; Beck, 2000).

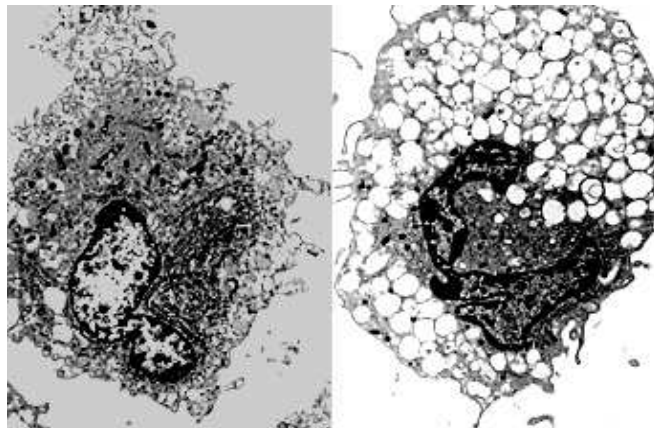


Figura 5 – Degradação de glicosaminoglicanos. Célula da esquerda com padrão normal e célula da direita com padrão anormal, com consequente acúmulo dentro dos lisossomos, fazendo com que apareçam grandes, redondos e edemaciados ao microscópio (Adaptado de Neufeld & Muenzer, 2001).

Esses testes urinários baseiam-se na detecção de mucopolissacaridúria em excesso, o que pode ser obtido por testes semiquantitativos baseados na turvação urinária (testes de agregação com sais pesados) ou na visualização de manchas metacromáticas em papel impregnado com corantes (teste do azul de toluidina) (Schwartz *et al.*, 2001; Wraith, 1996). Pode-se fazer, ainda, apenas a dosagem de GAGs urinários para confirmar a mucopolissacaridúria em excesso. Como estes testes estão sujeitos a resultados falso-positivos e falso-negativos, para complementar a investigação faz-se testes mais específicos (qualitativos) como a cromatografia em camada delgada e a eletroforese uni ou bidimensional, que identificam os tipos de GAGs aumentados, direcionando assim a análise enzimática a ser realizada (Schwartz *et al.*, 2001; Beck, 2000).

O padrão ouro para o diagnóstico das MPS é a medida da atividade da enzima que se supõe deficiente, associada com os achados clínicos. Na MPS VI, especificamente, o diagnóstico é realizado através de uma clínica compatível, com a constatação da mucopolissacaridúria em excesso e confirmado pela constatação da redução da atividade da enzima ARSB em leucócitos e/ou fibroblastos cultivados a partir de biópsia de pele (Azevedo, 2004). O valor da atividade da ARSB normal varia de acordo com os diferentes tecidos, em fibroblastos por exemplo é de 326 ± 136 nmol/h/mg aproximadamente (Fernández, 2008).

Deve-se excluir a possibilidade de deficiência múltipla de sulfatases, um diagnóstico diferencial importante. Neste caso, o indivíduo afetado pode ter um quadro clínico semelhante àquele dos indivíduos com MPS VI, mas laboratorialmente tem deficiência também de outras sulfatases, como a arilsulfatase A (Azevedo, 2004).

A análise da concentração de dermatan sulfato excretado em amostras de urina de 24 horas podem servir para monitorizar os níveis terapêuticos da enzima em amostras de pacientes com MPS VI que estão recebendo terapia de reposição enzimática. Até o momento, o único biomarcador para monitorizar a eficácia do tratamento era o nível de GAGs no sangue e urina, mas novos biomarcadores estão sendo investigados (Fuller, 2006).

Os altos valores de GAGs na urina tem sido correlacionados com uma menor estatura e menor peso corporal dos pacientes, assim como com parâmetros clínicos que indicam uma progressão mais rápida da doença. No entanto, não é possível prever a clínica baseado nos níveis enzimáticos residuais, pois indivíduos ao longo de todo espectro fenotípico mostram atividade similar da enzima endógena deficiente (Swiedler *et al.*, 2005).

A análise de mutações no gene ARSB se realiza a partir de DNA obtido de amostras de sangue ou outros tecidos como passo seguinte ao diagnóstico enzimático. Essa análise geralmente é realizada através do sequenciamento direto da região codificante do gene ARSB. O elevado número de alelos privados e a ausência de mutações altamente prevalentes dificultam a triagem populacional através de análise molecular.

A identificação do genótipo pode ser importante para prever o fenótipo (e para decisões terapêuticas em alguns casos), para possibilitar o aconselhamento genético na família e para auxiliar no diagnóstico pré-natal (Giugliani *et al.*, 2010).

Nas famílias com risco elevado de MPS VI, pode-se realizar o diagnóstico pré natal. Nesses casos, mede-se a atividade enzimática da ARSB em cultivo de vilosidade coriônica ou em amniócitos de forma semelhante como se realiza em leucócitos ou fibroblastos. Nas famílias onde já é conhecida a mutação, pode-se também fazer o diagnóstico molecular nos mesmos materiais biológicos utilizados para a medida da atividade enzimática.

8.4.6. Tratamento

Antes do advento de terapias dirigidas para a restauração da atividade da enzima deficiente, o tratamento das MPS I, II e VI tinha como principal foco a prevenção e o cuidado das complicações, aspectos ainda bastante importantes no manejo desses pacientes (Giugliani *et al.*, 2010).

Na década de 80, foi proposto o tratamento das MPS com transplante de medula óssea/transplante de células tronco hematopoiéticas (TMO/TCTH) (Krivit, 2004; Lange *et al.*, 2006), que ainda hoje é recomendado para pacientes com a forma grave da MPS I, diagnosticados antes dos dois anos de idade, pela possibilidade desta terapia prevenir ou retardar o dano cognitivo. De uma maneira geral, o TMO/TCTH não tem sido recomendado para as demais formas de MPS I e para os pacientes com MPS VI pelos altos riscos associados, o que o torna de indicação questionável em função da existência de terapia enzimática.

A Terapia de Reposição Enzimática (TRE) é um tratamento que consiste na administração periódica, por via venosa, da enzima específica deficiente no paciente. A realização do primeiro tratamento eficaz com TRE, em pacientes com a doença de Gaucher (Barton *et al.*, 1990), levou à busca de tratamentos semelhantes para outras doenças

lisossômicas. Na década de 90, começou o desenvolvimento da TRE, que se tornou uma realidade aprovada para uso clínico, em 2003 para MPS I, em 2005 para MPS VI e em 2006 para MPS II (Biomarin, 2009.1; Biomarin, 2009.2; Elaprase, 2009; Giugliani *et al.*, 2010).

A TRE para o tratamento da MPS VI é realizada pela administração intravenosa de galsulfase, uma forma recombinante da enzima N-acetilgalactosamina-4-sulfatase, sintetizada através de engenharia genética a partir de células de ovário de hamster chinês (Fuller *et al.*, 1998; Auclair *et al.*, 2003; Harmatz *et al.*, 2008). A comercialização e uso da galsulfase foi aprovada nos Estados Unidos em 2005 (FDA, 2009), na Comunidade Européia em janeiro de 2006 (EMEA, 2009), e em fevereiro de 2009 no Brasil, quando recebeu o registro da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) (ANVISA, 2009).

A TRE pode ser administrada a todos os pacientes sintomáticos com diagnóstico de MPS VI confirmado, sendo recomendável como primeira escolha terapêutica. Estudos demonstraram melhora no teste de caminhada e na capacidade de subir escadas (Harmatz *et al.*, 2006; Giugliani *et al.*, 2007;), melhora na doença óssea relacionada a MPS VI, assim como melhora no padrão de crescimento em um paciente tratado a partir da oitava semana de vida (McGill *et al.*, 2006). Sabe-se, entretanto, que alguns tecidos como a córnea, por sua menor perfusão, e o sistema nervoso central, pela barreira hematoencefálica, não são atingidos de forma significativa pela ação da enzima administrada por via intravenosa (Giugliani *et al.*, 2007; Clark, 2008). De forma objetiva, a TRE deve ser indicada para pacientes sintomáticos de qualquer idade e que apresentem pelo menos uma manifestação clínica que responda ao tratamento com TRE (Giugliani *et al.*, 2010).

Existem indicações de que a detecção mais precoce dos casos, eventualmente através de triagem neonatal, possa vir a contribuir para um melhor prognóstico. Uma cura definitiva talvez seja alcançada através da terapia gênica, mas há ainda um longo caminho a percorrer até esse momento (Giugliani *et al.*, 2010).

Um grande número de centros brasileiros, incluindo serviços de todas as regiões do país, já tem experiência com TRE para MPS I, II e VI. Essa experiência foi adquirida não só com o tratamento de pacientes como também com a participação de alguns grupos em ensaios clínicos que envolveram TRE para essas condições (Giugliani *et al.*, 2010).

8.5. Biologia celular e molecular da Mucopolissacaridose tipo VI

8.5.1. Lisossomo

Os lisossomos são compartimentos definidos por membranas e preenchidos por enzimas hidrolíticas utilizadas na digestão celular. Eles contêm cerca de 40 tipos de enzimas hidrolíticas digestivas que degradam organelas intracelulares mortas, bem como macromoléculas e partículas englobadas do exterior da célula por endocitose (Alberts *et al.*, 2004).

O lisossomo é apenas um componente de uma série de organelas intracelulares, aparentemente desconexas, conhecidas coletivamente como sistema endossomal-lisossomal ou aparelhos vacuolar, termo inventado por De Duve e Wattiaux em 1966 e que tem resistido ao tempo. Os vários componentes desse sistema foram descritos há mais de 30 anos por Novikoff (1973). Uma infinidade de termos confusos lhes tem sido aplicados; hoje, geralmente é aceito que os seus componentes principais são: o endossomo precoce situado na periferia da célula, o endossomo tardio que tende a ser perinuclear e os lisossomos. Eles formam uma cadeia que é responsável pelo tráfico e digestão de moléculas que passaram por endocitose. Até recentemente, essa foi considerada a única função desse sistema; no entanto, sabe-se agora que endossomos também participam ativamente na triagem e reciclagem (Vellodi, 2004).

As várias etapas envolvidas na síntese das enzimas lisossomais são resumidas na figura 6. As enzimas são sintetizadas no Retículo Endoplasmático Rugoso (RER) e na fase inicial estão inativas. Entram, então, através da membrana no Retículo Endoplasmático (RE) e

passam para o Complexo de Golgi, onde, adquirem um ligante de manose-6-fosfato (M6-P). A ligação de um marcador M6-P é importante, pois separa as glicoproteínas que serão destinadas para o lisossomo das glicoproteínas que serão secretadas. O complexo receptor-proteína se move para o endossomo tardio, onde o pH baixo faz com que eles se dissociem (Gonzalez-Noriega *et al*, 1980). As etapas finais na maturação da enzima lisossômica incluem proteólise, dobramento e agregação (Vellodi, 2004).

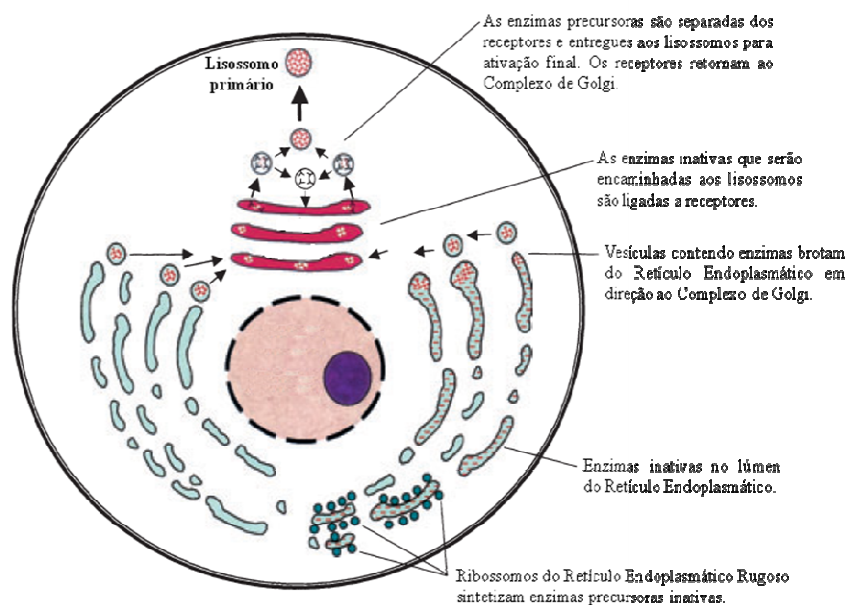


Figura 6 - Síntese das enzimas lisossomais (Adaptado de Vellodi, 2004).

Pelo menos sete diferentes sulfatases humanas foram descritas e, com exceção das sulfatases esteróides, enzimas microsossomais ligadas à membrana, todas as sulfatases estão localizadas nos lisossomos. Para uma ótima atividade, elas necessitam de um ambiente ácido e os lisossomos fornecem este ambiente, mantendo um pH de valor próximo a 5 no seu interior. Dessa maneira, os conteúdos do citosol são duplamente protegidos contra o ataque do sistema digestivo da própria célula. A membrana dos lisossomos normalmente mantêm as enzimas digestivas fora do citosol mas, mesmo que haja algum vazamento, elas causarão poucos danos, porque o pH citosólico é de aproximadamente 7 (Alberts *et al.*, 2004).

Assim como todas as outras organelas intracelulares, os lisossomos não apenas contêm uma coleção única de enzimas, mas também uma membrana circundante única. O transporte de proteínas através dessa membrana permite que os produtos finais de digestão de macromoléculas, como aminoácidos, açúcares e nucleotídeos, sejam transferidos para o citosol de onde podem ser excretados ou reutilizados pela célula (Alberts *et al.*, 2004).

8.5.2. Glicosaminoglicanos

As macromoléculas que constituem a matriz extracelular são, principalmente, produzidas localmente pelas células. Duas principais classes de macromoléculas extracelulares compõem essa matriz: (1) cadeias de polissacarídeos de uma classe denominada glicosaminoglicanos, as quais estão, na maioria das vezes, covalentemente ligadas a proteínas na forma de proteoglicanos e (2) as proteínas fibrosas, incluindo colágeno, elastina, fibronectina e laminina, que exercem funções adesivas e estruturais (Alberts *et al.*, 2004).

As moléculas de proteoglicanos no tecido conjuntivo formam uma substância semelhante a um gel, altamente hidratada, na qual estão embebidas as fibras protéicas. O gel de polissacarídeos resiste a forças de compressão na matriz, ao mesmo tempo em que permite a rápida difusão dos nutrientes, dos metabólitos e dos hormônios entre o sangue e as células dos tecidos (Alberts *et al.*, 2004).

Os glicosaminoglicanos são cadeias polissacarídicas não ramificadas compostas de unidades dissacarídicas repetidas (Figura 7). Elas são chamadas GAGs porque um dos açúcares no dissacarídeo repetido é sempre um amino açúcar (*N*-acetilglucosamina ou *N*-acetilgalactosamina) o qual, na maioria das vezes, é sulfatado. O segundo açúcar é, normalmente, um ácido urônico (glucurônico ou idurônico) (Alberts *et al.*, 2004).

Quatro principais grupos de GAGs são distinguidos de acordo com seus açúcares, o tipo de ligação entre os açúcares, o número e localização dos grupos sulfato. São eles: (1)

hialuronana, (2) sulfato de condroitina e sulfato de dermatan, (3) sulfato de heparana e (4) sulfato de queratana (Alberts *et al.*, 2004).

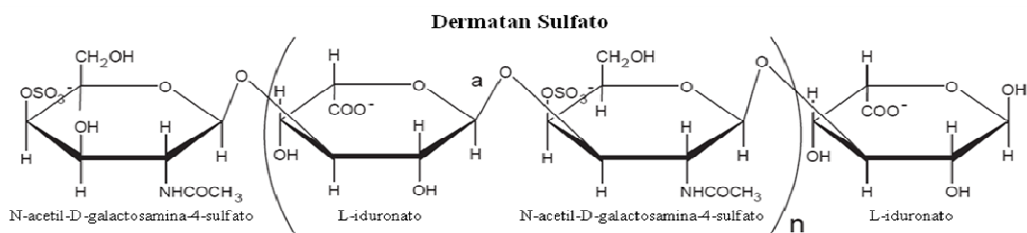


Figura 7 – Polissacarídeo dermatan sulfato.

O dermatan sulfato é um polímero linear heterogêneo formado por uma sequência de 70 a 200 unidades sucessivas de *N*-acetil-D-galactosamina (D-GalNAc) unidas por ligações β (1, 3) a resíduos de ácido *L*-idurônico. O dermatan sulfato contém aproximadamente um grupo O-sulfato para cada unidade de dissacarídeo, encontrando-se normalmente na posição 4 da D-GalNAc, em menor frequência na posição 6 da D-GalNAc e na posição 2 do ácido *L*-idurônico. O peso molecular do sulfato de dermatan varia entre 12 e 45 KDa, com um peso molecular médio entre 20 e 30 KDa (Fernández, 2008).

A enzima *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatase hidrolisa os grupos 4-sulfato da extremidade do polissacarídeo na terceira etapa da via de degradação do dermatan sulfato como apresentado na figura 8 (Neufeld & Muenzer, 2001).

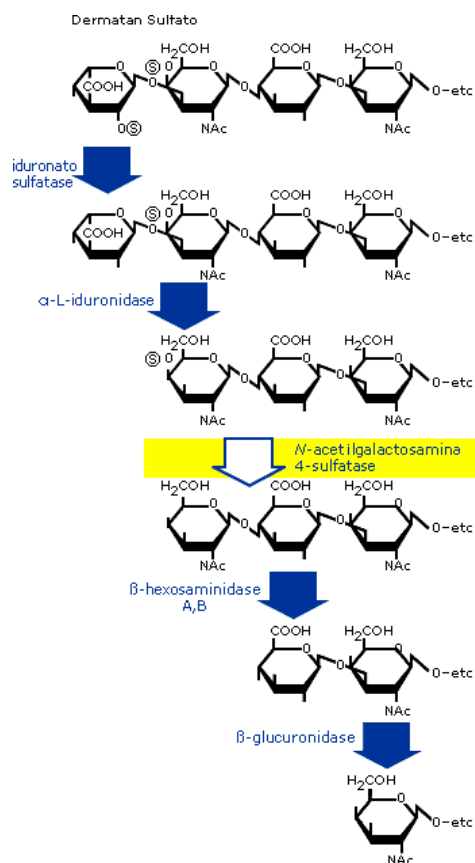


Figura 8 – Etapas de degradação do dermatan sulfato (Adaptado de Neufeld & Muenzer, 2001).

8.5.3. Enzima *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatase

A enzima *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatase ou arilsulfatase B (ARSB) hidroliza resíduos de éster sulfato da *N*-acetilgalactosamina do glicosaminoglicano dermatan sulfato (O'Brien *et al.*, 1974; Matalon *et al.*, 1974). Semelhanças substanciais nas estruturas primárias de quatro arilsulfatases humanas e uma arilsulfatase de um invertebrado sugerem conservação evolutiva de um gene ancestral comum (Peters *et al.*, 1990).

Após a determinação da sequência de aminoácidos da ARSB em 1990 (Peters *et al.*, 1990), as características estruturais da ARSB foram publicadas em 1996, onde os autores concluíram que, devido a uma sequência de homologia significativa na família das sulfatases (Figura 9), a estrutura de todas as sulfatases compartilham os recursos importantes encontrados na ARSB (Bond *et al.*, 1997).

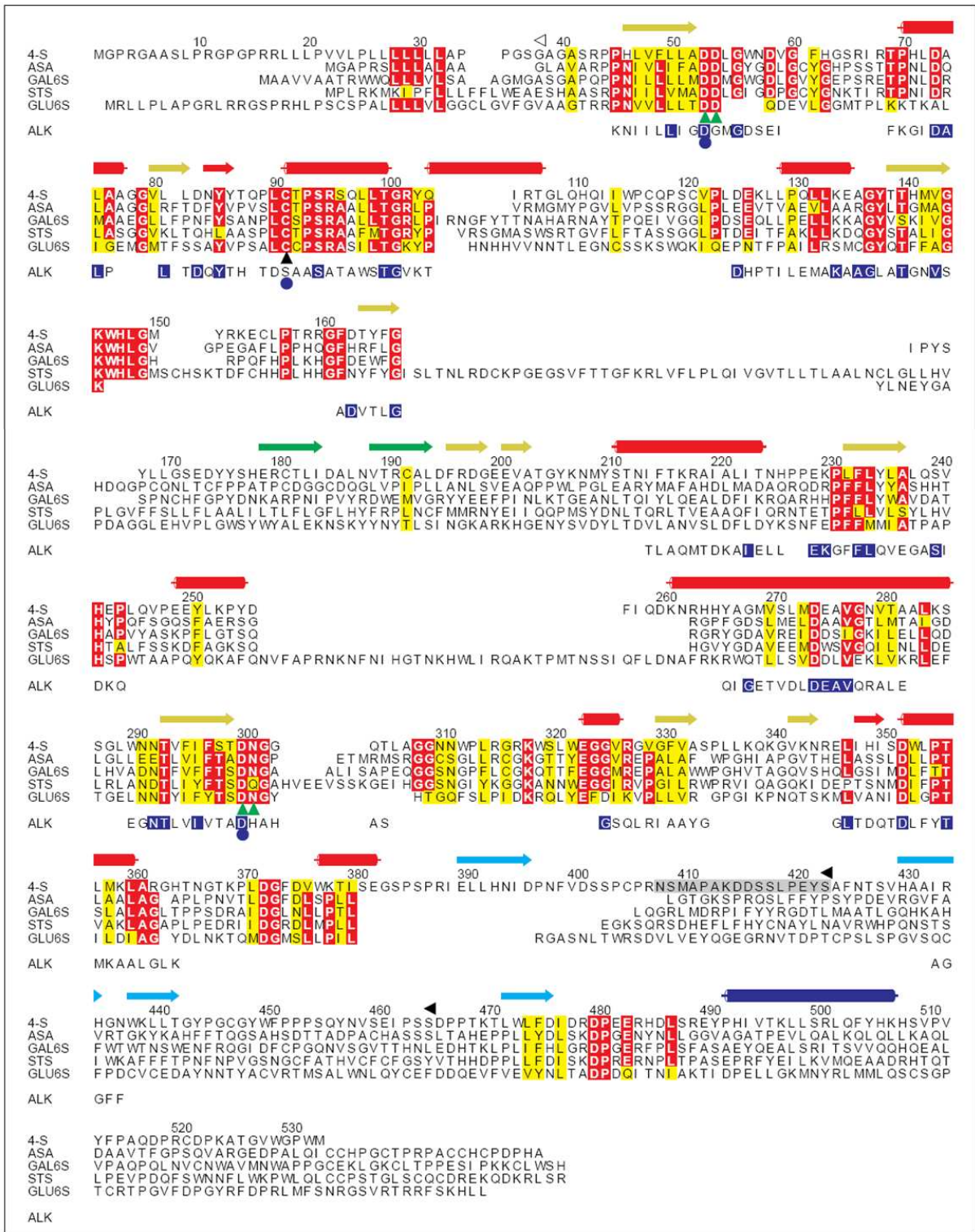


Figura 9 – Alinhamento das seqüências de aminoácidos das sulfatases humanas: *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatase (4-S/ARSB), galactose-3-sulfatase (ASA), *N*-acetilgalactosamina-6-sulfatase (GAL6S), sulfatase esteróide (STS) e *N*-acetilglucosamina-6-sulfatase (GLU6S). Resíduos idênticos em pelo menos quatro das cinco sulfatases são destacados em vermelho e, marcados em amarelo, os resíduos substituídos em regiões conservadas. A seqüência de 169 resíduos da fosfatase alcalina (ALK), que são estruturalmente equivalentes a ARSB, está na parte inferior. Resíduos idênticos em ALK e 4-S após o alinhamento estrutural são destacados em azul.

A ARSB é um monômero com dois domínios (Figura 10). O maior, domínio N-terminal, tem topologia α/β com 10 cadeias de folha- β flanqueadas por duas longas α -hélices amontoadas de um lado e um número de α -hélices menores do outro lado. O menor, domínio C-terminal, consiste em quatro cadeias antiparalelas de folhas- β com uma ortogonal α -hélice. A extremidade carboxila do domínio menor continua com uma longa sequência que cruza a molécula, inserindo uma volta de α -hélice que está ligada por uma ponte dissulfeto ao domínio maior perto da cadeia “e” da folha- β (Figura 10) (Bond *et al.*, 1997).

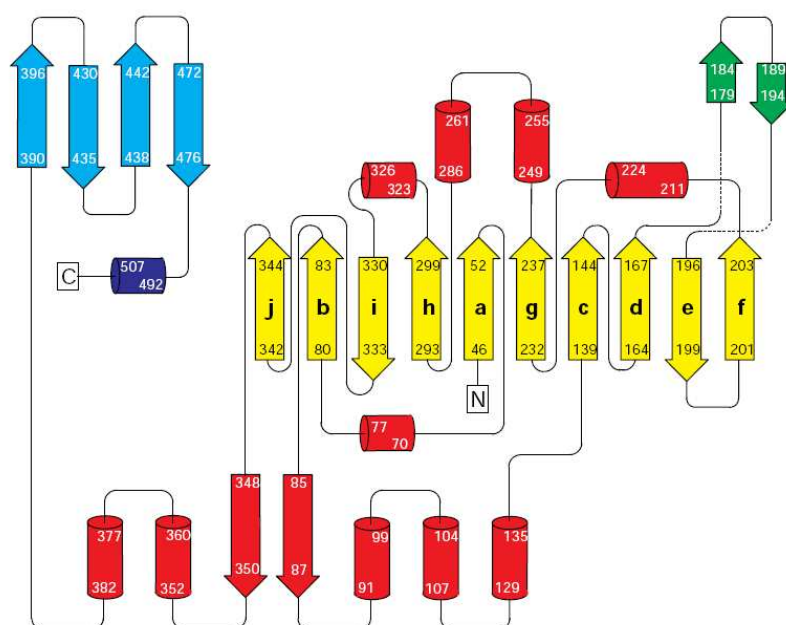


Figura 10 – Diagrama topológico do polipeptídeo arilsulfatase B com as folhas- β pregueadas indicadas pelas setas e as α -hélices pelos cilindros.

O sítio ativo da ARSB foi rapidamente localizado pela presença de um aglomerado de resíduos conservados em torno de um resíduo de cisteína (Cis91). Duas alterações neste resíduo (Cis91 \rightarrow Ser e Cis91 \rightarrow Thr), que demonstraram destruir a atividade enzimática, enfatizam a identificação do Cis91 como resíduo de cisteína essencial. Os resíduos conservados que fazem parte do sítio ativo são: Asp53, Asp54, Cis91, Pro93, Ser94, Arg95, Lis145, His147, His242, Asp300 e Lis318 (Figura 11) (Bond *et al.*, 1997).

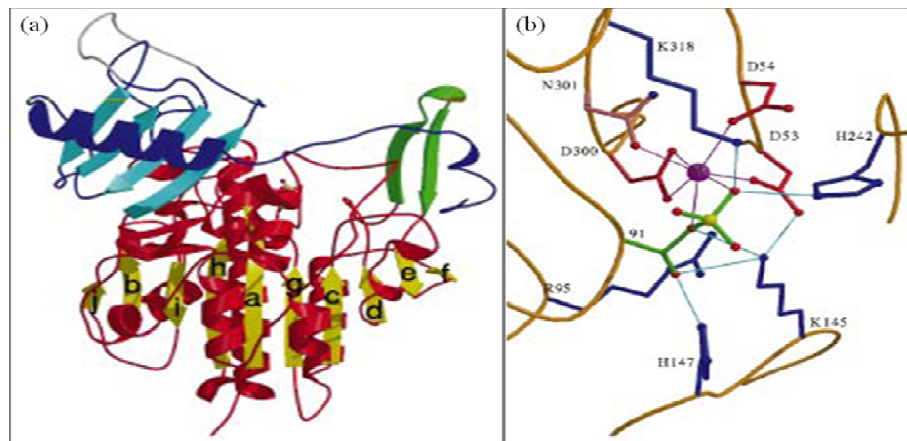


Figura 11 – Estrutura molecular da arilsulfatase B.

Existem cinco regiões consenso de sítios de glicosilação (Figura 12). Todos esses sítios estão na superfície da proteína e são de fácil acesso ao solvente. A massa do polipeptídeo, calculado a partir da sequência (resíduos 38-533), é de 56 kDa em comparação com 66 kDa calculada por eletroforese ou espectrometria de massa. A diferença de 10 kDa seria compatível com a presença dos cinco sítios de glicosilação (Bond *et al.*, 1997).

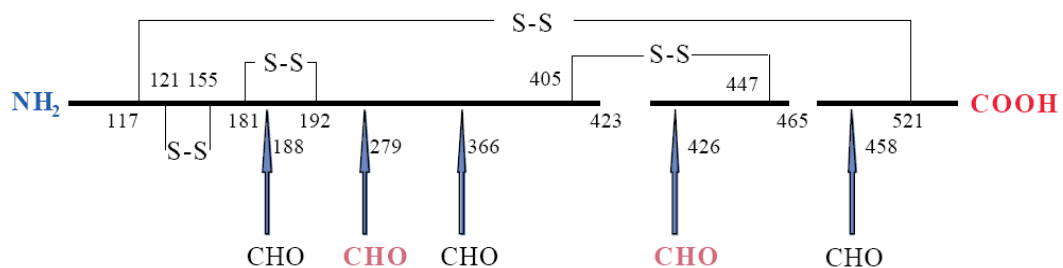


Figura 12 – Esquema do polipeptídeo arilsulfatase B mostrando a localização das pontes dissulfeto (S-S), as regiões de corte proteolítico na forma madura da enzima (lacunas no polipeptídeo) e as cinco posições consenso ligados a *N*-glicosilação (CHO). Os números indicam a posição dos aminoácidos.

A estrutura da ARSB revela regiões de ligações dissulfeto (Figura 12), onde já foram descritas mutações deletérias, que estabilizam a proteína na presença de proteases (Bond *et al.*, 1997).

8.5.4. Gene Arilsulfatase B

O gene que codifica a enzima ARSB, também se chama arilsulfatase B e foi mapeado no braço longo do cromossomo 5, na região q13-14 (Litjens *et al.*, 1989; Nyhan & Ozand, 1998). A sequência do cDNA da ARSB foi determinada por Peters e colaboradores em 1990 (Figura 13).

A caracterização do gene inteiro, com a identificação das divisões entre éxons e introns, foi apresentada por Modaressi e colaboradores em 1993. O gene possui 209 Kb (www.genome.ucsc.edu), com 8 éxons que variam de 71 a 312 pb (Figura 14), produz um mRNA com 2.228 bases que codifica a proteína ARSB com 533 aminoácidos (Karageorgos *et al.*, 2007).

cDNA Cloning of Human Arylsulfatase B

```

+1
-6  ACAAGGATGGGTCCGCGCGCGCGGAGCTTGCCCGAGGCCCGGACCTCGGCGGCTGCTCCTCCCGTCGCTCCCGTGCTGCTG
      M G P R G A A S L P R G P G P R R L L L P V V L P L L L 28

85  CTGCTGTTGTTGGCGCCGCCGGGCTCGGGCCCGGGGCGAGCCGGCCCGCCACCTGGTCTTCTTGGTGGCAGACGACCTAGGCTGGAAC
      L L L L A P P G S G A G A S R P P H L V F L L A D D L G W N 58
          ↑      ↑

175 GACGTGCGCTTCCACGGCTCCCGCATCCGCACGCCGACCTGGACGCGCTGGCGGCGGGGGTCTCCTGGACAACACTACTACACGCGAG
      D V G F H G S R I R T P H L D A L A A G G V L L D N Y Y T Q 88

265 CCGTGTGCACGCCGCTCGCGGAGCCAGCTGCTCACTGGCCGCTACCAGATCCGTACAGGTTTACAGCACCAATAATCTGGCCCTGCAG
      P L C T P S R S Q L L T G R Y Q I R T G L Q H Q I I W P C Q 118

355 CCCAGCTGTGTTCTCTGGATGAAAACTCCTGCCCCAGCTCCTAAAAGAAGCAGGTTATACTACCCATATGGTCGGAATAATGGCACCTG
      P S C V P L D E K L L P Q L L K E A G Y T T H M V G K W H L 148

445 GGAATGTACCCGAAAGAATGCCTTCCAACCCGCGGAGGATTGATACCTACTTTGGATATCTCCTGGTAGTGAAGATTATTATCCCAT
      G M Y R K E C L P T R R G F D T Y F G Y L L G S E D Y Y S H 178

535 GAACGCTGTACATTAATGACGCTCTGAATGTCACAGATGTGCTCTTGATTTTCGAGATGGCGAAGAAGTTGCAACAGGATATAAAAAAT
      E R C T L I D A L N V T R C A L D F R D G E E V A T G Y K N 208
          *

625 ATGTATTCAACAACATATTACCAAAAAGGGCTATAGCCCTCATAACTAACCATCCACCAGAGAAGCCTCTGTTTCTACCTTGCTCTC
      N Y S T N I F T K R A I A L I T N H P P E K P L F L Y L A L 238

715 CAGTCTGTGCATGAGCCCTTCAGGTCCTGAGGAATACTTGAAGCCATATGACTTTTCAAGACAAGAACAGGCATCACTATGCAGGA
      Q S V H E P L Q V P E E Y L K P Y D F I Q D K N R H H Y A G 268

805 ATGGTGTCCCTTATGGATGAAGCAGTAGGAATGTCACTGCAGCTTTAAAAAGCAGTGGGCTCTGGAACAACACGGTGTTCATCTTTTCT
      M V S L M D E A V G N V T A A L K S S G L W N N T V F I F S 298
          *

895 ACAGATAACGGAGGGCAGACTTTGGCAGGGGGTAATACTGGCCCTTCGAGGAAGAAAATGGAGCCTGTGGGAAGGAGGCGTCCGAGGG
      T D N G G Q T L A G G N N W P L R G R K W S L W R G G Y R G 328

985 GTGGGCTTTGTGGCAAGCCCTTGTCTGAAGCAGAAGGGCGTGAAGAACCAGGCTCATCCACATCTCTGACTGGCTGCCAACACTCGTG
      V G F V A S P L L K Q K G V K N R E L I H I S D W L P T L V 358

1075 AAGCTGGCCAGGGACACACCAATGGCACAAGCCCTCTGGATGGCTTCGACGTGGGAAAACCATCAGTGAAGGAAGCCCATCCCCAGA
      K L A R G H T N G T K P L D G F D V W K T I S E G S P S P R 388
          *

1165 ATTGAGCTGTCATAATATGACCCAACTTCGTGGACTCTTACCGTGTCCCGAAGCAGCATGGCTCCAGCAAAGGATGACTCTTCT
      I E L L H N I D P N F V D S S P C P R E N S H A P A K D D S S 418

1255 CTTCCAGAATATTCAGCCTTTAACACATCTGTCCATGCTGCAATTAGACATGGAAATGGAAACTCCTCAGCGCTACCCAGGCTGTGGT
      L P E Y S A F N T S V H A A I R H G N W K L L T G Y P G C G 448
          *

1345 TACTGGTCCCTCCACCGCTCAATACAATGTTTCTGAGATACCTCATCAGACCCACCAACCAAGCCCTCTGGCTCTTTGATATTGAT
      Y W F P P P S Q Y N V S E I P S S D P P T K T L W L F D I D 478
          *

1435 CGGGACCCCTGAAGAAAGACATGACCTGTCCAGAGAATATCCTCACATCGTCACAAAGCTCCTGTCCCGCCTACAGTCTACCATAAACAC
      R D P E E R H D L S R E Y P H I V T K L L S R L Q F Y H K H 508

1525 TCAGTCCCGGTGACTTCCCTGCACAGACCCCGCTGTGATCCCAAGGCCACTGGGGTGTGGGCCCTTGGATGTAGGATTCAGGGAG
      S V F V Y F P A Q D P R C D P K A T G V W G P W M 533

1615 GCTAGAAAACCTTTCAATTGGAAGTTGGACCTCAGGCCCTTTCTCACGACTCTTGTCTCATTTGTTATCCCAACCTGGTTCACCTGGCC
1705 CTTCTCTTGCTCTTAAACCACACCGAGGTGCTAATTTCAACCCCTAATGCATTTAAGAAGCTGATAAAATCTGCAACACTCCTGCTGTT
1795 GGCTGGAGCATGTGCTAGAGGTGGGGTGGCTGGGTTTATCCCCCTTCCCTAAGCCTTGGGACAGCTGGGAACCTTAACTTGAATAGGA
1885 AGTTCTCACTGAATCCTGAGGCTGGAACAGCTGGCTCTTTTAGACTCACAAGTCAGACGTTGATTCGCCCTCTGCCAATAGCCAGTTTT
1975 ATTGGAGTGAATCACATTTCTTACGCAAATGAAGGGAGCAGACAGTGATTAATGGTTCTGTTGGCCAAGGCTTCTCCCTGTCGGTGAAGG
2065 ATCATGTTACAGGCACTCCAAGTGAACACCCTCTGGTTCACCCCTTACTCACTTATCTCATCACAGAGCATAAGGCCCATTTTGTGTG
2155 TCAGGTCAACAGCAAAATGGCTGCACCATGACTGTGGCTTTTAAAATAAAGAAATGTGTTTTATCG
  
```

Figura 13 - Sequência de nucleotídeos do gene arilsulfatase B e dos respectivos aminoácidos da proteína *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatase. As flechas indicam possíveis terminações para o peptídeo; os aminoácidos sublinhados são sequências trípticas. Os asteriscos indicam possíveis sítios de *N*-glicosilação.

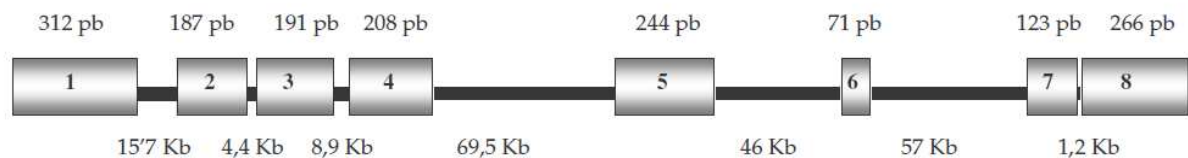


Figura 14 - Representação da estrutura do gene arilsulfatase B. Os éxons (retângulos) e os íntrons (barras pretas), com os respectivos tamanhos em pb (pares de base) e Kb (Kilobases).

8.5.5. Mutações

Os primeiros estudos de análise molecular em pacientes com MPS VI foram realizados em indivíduos com pais consaguíneos, pois o esperado é que estes filhos sejam homozigotos para o alelo mutado, o que facilita a análise (Kobayashi *et al.*, 1990; Paw *et al.*, 1990; Wicker *et al.*, 1991). A menos que um alelo mutante seja comum ou o paciente seja produto de um casamento consanguíneo, é incomum encontrar alelos iguais em pacientes com uma doença rara, como a MPS VI (Jin *et al.*, 1992).

Até o momento, já foram descritas 133 mutações patogênicas no gene ARSB e a maioria delas são privadas (HGMD – 05/11/2011) (Tabelas 2 a 5). As mutações que tem sido descritas, nos pacientes com MPS VI, foram encontradas em éxons (sentido trocado “*missense*”, Tabela 2; sem sentido “*nonsense*”, Tabela 3; deleções e inserções, Tabela 4) ou próximas aos éxons (sítio de *splicing* – Tabela 5).

A primeira mutação patogênica, descrita em um paciente com MPS VI (p.G137V), foi uma transversão de uma G para uma T no nucleotídeo 410, causando a substituição de um resíduo de glicina por uma valina na posição 137 da proteína (Wicker *et al.*, 1991). Esse mesmo estudo mostrou que polipeptídeos com essa alteração exibem baixa atividade residual. O aminoácido glicina na posição 137 da ARSB parece ser importante na estrutura desta enzima, visto que a glicina é evolutivamente conservada em todas as arilsulfatases conhecidas, incluindo a arilsulfatase do ouriço do mar que divergiu da ARSB humana há mais de 500 milhões de anos (Peters *et al.*, 1990).

Tabela 2 - Relação das mutações de sentido trocado “missense” descritas no gene arilsulfatase B nos pacientes com MPS VI.

Mutação	Nucleotídeo	Éxon	Referência	Mutação	Nucleotídeo	Éxon	Referência
p.A33V	g.98C>T	I	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007	p.I223V	g.667A>G	III	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007
p.D54N	g.160G>A	I	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007	p.L236P	g.707T>C	IV	Jin <i>et al.</i> , 1992
p.W57C	g.171G>C	I	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007	p.Q239R	g.716A>G	IV	Wu <i>et al.</i> , 2000
p.D59N	g.175G>A	I	Petry <i>et al.</i> , 2005	p.S240F	g.719C>T	IV	Garrido <i>et al.</i> , 2007
p.S65F	g.194C>T	I	Villani <i>et al.</i> , 1999	p.Y266C	g.797A>C	IV	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007
p.L72R	g.215T>G	I	Petry <i>et al.</i> , 2005	p.G268V	g.803G>T	IV	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007
p.L72Q	g.215T>A	I	Isbrandt <i>et al.</i> , 1996	p.I296N	g.887T>A	IV	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007
p.L82R	g.245T>G	I	Garrido <i>et al.</i> , 2007	p.D300E	g.900T>A	V	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007
p.D83Y	g.247G>T	I	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007	p.G302R	g.904G>A	V	Villani <i>et al.</i> , 1998
p.Q88H	g.264G>C	I	Petry <i>et al.</i> , 2005	p.G308R	g.924G>A	V	Garrido <i>et al.</i> , 2007
p.T92L	g.275C>A	I	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007	p.W312R	g.933T>C	V	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007
p.T92M	g.275C>T	I	Litjens <i>et al.</i> , 1996	p.W312C	g.936G>T	V	Karageorgos <i>et al.</i> , 2004
p.P93S	g.277C>T	I	Petry <i>et al.</i> , 2005	p.P313A	g.937C>G	V	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007
p.R95Q	g.284G>A	I	Litjens <i>et al.</i> , 1996	p.P313S	g.937C>T	V	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007
p.S96R	g.288C>G	I	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007	p.R315Q	g.944G>A	V	Villani <i>et al.</i> , 1999
p.L98Q	g.293T>A	I	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007	p.S320R	g.960C>G	V	Voskoboeva <i>et al.</i> , 2000
p.L98P	g.293T>C	I	Voskoboeva <i>et al.</i> , 2000	p.L321P	g.962T>C	V	Isbrandt <i>et al.</i> , 1994
p.R102H	g.305G>A	I	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007	p.G324V	g.971G>T	V	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007
p.R106H	g.317G>A	I	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007	p.K343M	g.1028A>T	V	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007
p.G108V	g.323G>T	I	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007	p.N344K	g.1032C>G	V	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007
p.P116H	g.347C>A	II	Villani <i>et al.</i> , 1999	p.W353R	g.1057T>C	V	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007
p.C117R	g.349T>C	II	Jin <i>et al.</i> , 1992	p.L360P	g.1079T>C	V	Voskoboeva <i>et al.</i> , 2000
p.P130L	g.389C>T	II	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007	p.H393P	g.1178A>C	VII	Litjens <i>et al.</i> , 1996
p.G137V	g.410G>T	II	Wicker <i>et al.</i> , 1991	p.F399L	g.1197C>G	VII	Yang <i>et al.</i> , 2001
p.Y138C	g.413A>G	II	Garrido <i>et al.</i> , 2007	p.C405Y	g.1214G>A	VII	Jin <i>et al.</i> , 1992
p.T140P	g.418A>C	II	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007	p.H430R	g.1289A>G	VII	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007
p.M142I	g.426G>C	II	Simonaro e Schuchman, 1995	p.R434I	g.1301G>T	VII	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007
p.G144R	g.430G>A	II	Isbrandt <i>et al.</i> , 1994	p.K439E	g.1315A>G	VII	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007
p.W146R	g.436T>C	II	Simonaro e Schuchman, 1995	p.T442M	g.1325C>T	VII	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007
p.W146S	g.437G>C	II	Simonaro e Schuchman, 1995	p.T442R	g.1325C>G	VII	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007
p.W146L	g.437G>T	II	Simonaro e Schuchman, 1995	p.G446R	g.1336G>C	VII	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007
p.R152W	g.454C>T	II	Voskoboeva <i>et al.</i> , 1994	p.C447F	g.1340G>T	VIII	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007
p.R160Q	g.479G>A	II	Voskoboeva <i>et al.</i> , 1994	p.C447S	g.1340G>C	VIII	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007
p.L170R	g.509T>G	II	Dou <i>et al.</i> , 2006	p.L472P	g.1415T>C	VIII	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007
p.G171S	g.511G>A	III	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007	p.P481L	g.1442C>T	VIII	Brooks <i>et al.</i> , 2005
p.G171D	g.512G>A	III	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007	p.R484G	g.1450A>G	VIII	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007
p.H178L	g.533A>T	III	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007	p.L498P	g.1493T>C	VIII	Litjens <i>et al.</i> , 1996
p.C192R	g.574T>C	III	Isbrandt <i>et al.</i> , 1994	p.C521Y	g.1562G>A	VIII	Isbrandt <i>et al.</i> , 1994
p.Y210C	g.629A>G	III	Litjens <i>et al.</i> , 1996	p.P531R	g.1592C>G	VIII	Villani <i>et al.</i> , 1999
p.T212I	g.635C>T	III	Sandberg <i>et al.</i> , 2008	p.X534Q	g.1600T>C	VIII	Arlt <i>et al.</i> , 1994

Estudos com a mutação p.Y210C, alelo mais comum entre pacientes com MPS VI, revelou que a proteína com essa alteração é sintetizada, apresentando tamanho e quantidade compatível com a proteína normal, porém ocorre um atraso no processamento, transporte e estabilidade da proteína mutante (Bradford *et al.*, 2002).

Tabela 3 - Relação das mutações sem sentido “nonsense” descritas no gene arilsulfatase B nos pacientes com MPS VI.

Mutação	Nucleotídeo	Éxon	Referência
p.Q97X	g.289C>T	I	Karageorgos <i>et al.</i> , 2004
p.W146X	g.438G>A	II	Voskoboeva <i>et al.</i> , 2000
p.R160X	g.478C>T	II	Voskoboeva <i>et al.</i> , 1994
p.R191X	g.571C>T	III	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007
p.R197X	g.592(589)C>T	III	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007
p.Y255X	g.765T>A	IV	Lam <i>et al.</i> , 2004
p.R315X	g.943C>T	V	Voskoboeva <i>et al.</i> , 2000
p.W322X	g.966G>A	V	Garrido <i>et al.</i> , 2007
p.R327X	g.979C>T	V	Karageorgos <i>et al.</i> , 2004
p.W377X	g.1130G>A	V	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007
p.E421X	g.1261G>T	VII	Xu, 1996
p.Q456X	g.1366C>T	VIII	Villani <i>et al.</i> , 1998
p.W473X	g.1419G>A	VIII	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007
p.Q503X	g.1507C>T	VIII	Villani <i>et al.</i> , 1999
p.Y513X	g.1539C>G	VIII	Voskoboeva <i>et al.</i> , 2000

Tabela 4 - Relação das deleções e inserções descritas no gene arilsulfatase B nos pacientes com MPS VI.

Nucleotídeo	Éxon	Referência	Nucleotídeo	Éxon	Referência
g.108-120del13	I	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007	g.629-635del	III	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007
g.114delG	I	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007	g.743delC	IV	Isbrandt <i>et al.</i> , 1996
g.116-123del8	I	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007	g.940del C	V	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007
g.219delC	I	Isbrandt <i>et al.</i> , 1996	g.1036delG	V	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007
g.221-230del10	I	Isbrandt <i>et al.</i> , 1996	g.1161-1162insC	VI	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007
g.237-243del7	I	Voskoboeva <i>et al.</i> , 1994	g.1279delA	VII	Petry <i>et al.</i> , 2005
g.245delY	I	Voskoboeva <i>et al.</i> , 2000	g.1285-1286insT	VII	Isbrandt <i>et al.</i> , 1994
g.256-258delTAC	I	Aelt <i>et al.</i> , 1994	g.1482delC	VIII	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007
g.338delG	I	Litjens <i>et al.</i> , 1992	g.1533del23	VIII	Petry <i>et al.</i> , 2003
g.427delG	II	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007	g.1577delC	VIII	Isbrandt <i>et al.</i> , 1994
g.489-491delTAC	II	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007	g.1582-1596del	VIII	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007

Tabela 5 - Relação das mutações em sítios de *splicing* descritas no gene arilsulfatase B nos pacientes com MPS VI.

Mutação	Nucleotídeo	Região	Referência
	g.312 G>C	Ex I - Int I	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007
IVS3-1g>a	g.691-1G>A	Intron III	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007
IVS5+1g>t	g.1142+1G>T	Intron V	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007
IVS5+2t>a	g.1142+2T>A	Intron V	Garrido <i>et al.</i> , 2007
IVS5-1g>c	g.1143-1G>C	Intron V	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007
IVS5-8t>g	g.1143-8T>G	Intron V	Petry <i>et al.</i> , 2005
IVS6+5g>a	g.1213+5G>A	Intron VI	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007
IVS6-2a>g	g.1214-2A>G	Intron VI	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007
IVS7+2t>g	g.1336+2T>G	Intron VII	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007

A maioria dos pacientes são heterozigotos compostos e provenientes de diferentes populações: Alemanha, Austrália, Brasil, Chile, China, Estados Unidos, França, Itália, Portugal e Rússia (Wicker *et al.*, 1991; Jin *et al.*, 1992; Arlt *et al.*, 1994; Isbrandt *et al.*, 1994; Simonaro e Schuchman, 1995; Litjens *et al.*, 1996; Villani *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2000; Voskoboeva *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2001; Petry *et al.*, 2003, 2005; Brooks *et al.*, 2005; Dou *et al.*, 2006; Karageorgos *et al.*, 2007).

O elevado número de alelos privados dificulta a análise rotineira de mutações na população geral, bem como o estabelecimento de correlações genótipo/fenótipo (Litjens & Hopwood, 2001). Contudo, tem sido descritos alguns alelos frequentes em determinadas populações como: p.R152W na Rússia, 25% dos 20 alelos mutados (Voskoboeva *et al.*, 2000); p.Y210C no mundo, 18% em 105 pacientes (Karageorgos *et al.*, 2007); p.H393P na Austrália e Inglaterra com 8% dos alelos mutantes em 25 pacientes (Litjens *et al.*, 1996); c.1533del23 no Brasil, ocorrendo em 23% dos 52 alelos estudados, essa mutação também ocorre em pacientes portugueses, embora a frequência seja desconhecida (Petry *et al.*, 2003, 2005).

Em 2007, Karageorgos e colaboradores realizaram a análise mutacional em 105 pacientes com MPS VI, o que representa aproximadamente 10% do número de pacientes de todo o mundo. Um total de 15 países participaram do estudo, principalmente a América do Norte, América do Sul, Europa e Australasia. Neste estudo, foram descritas 51 mutações de sentido trocado (38 novas), nove mutações sem sentido (5 novas), 13 deleções (11 novas), uma inserção nova e 9 mutações em sítios de splicing (7 novas) (Tabelas 2 a 5).

8.5.6. Polimorfismos

Um alelo com frequência entre 1% e 99% deve ser classificado como polimorfo, aquele com frequência inferior a 1% deve ser denominado alelo idiomorfo, enquanto um alelo com frequência superior a 99% deve ser classificado como monomorfo (Morton, 1976). Por

sua vez, os caracteres que resultam de locos que incluem pelo menos dois alelos polimórficos são denominados polimorfismos genéticos (Beiguelman, 2005).

O primeiro polimorfismo descrito no gene ARSB foi publicado em 1991 e demonstrou que a alteração p.V358M (troca de uma guanina por uma adenina no nucleotídeo 1072) estava presente em mais de 1% de caucasianos não relacionados, estando a guanina presente em 62% dos 110 indivíduos analisados, enquanto a adenina estava presente em 38% da amostra (Jin *et al.*, 1991).

A alteração p.V376M também foi considerada um polimorfismo, pois a expressão da proteína com essa substituição resultava em uma atividade similar à proteína normal (Wicker *et al.*, 1991). Os polimorfismos p.V358M e p.V376M ocorrem em regiões de α -hélices que geralmente são ocupadas por resíduos hidrofóbicos nas outras sulfatases. Não se sabe se essas substituições modificam a gravidade da doença e/ou a atividade da enzima in vivo. Os polimorfismos p.V358M, p.V376M e P376P são devidos a transições em ilhas CpG (Litjens e Hopwood, 2001).

Karageorgos e colaboradores, em 2007, descreveram 8 diferentes polimorfismos em 105 pacientes com MPS VI, sendo 4 novos. Atualmente existem 13 polimorfismos no gene ARSB descritos (Tabela 6).

Tabela 6 - Relação dos polimorfismos descritos no gene arilsulfatase B.

Polimorfismos	Alteração no DNA	Região no gene	Referência
p.L82L	g.246 G>A	Éxon I	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007
p.I114I	g.342 C>T	Éxon II	Villani <i>et al.</i> , 1999
p.L124L	g.370 C>T	Éxon II	Villani <i>et al.</i> , 1999
	g.691-22 T>C (IVS3-22t>c)	Intron III	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007
p.G324G	g.972 A>G	Éxon V	Villani <i>et al.</i> , 1999
p.T356T	g.1068 A>T	Éxon V	
p.V358M	g.1072 G>A	Éxon V	Jin <i>et al.</i> , 1991
p.V376M	g.1126 G>A	Éxon V	Wicker <i>et al.</i> , 1991
	g.1143-27 A>C (IVS5-27a>c)	Intron V	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007
p.S384N	g.1151 G>A	Éxon VI	Voskoboeva <i>et al.</i> , 2000
p.P397P	g.1191 A>G	Éxon VI	Schuchman <i>et al.</i> , 1990
p.P454P	g.1362 G>A	Éxon VIII	
p.Y505Y	g.1515 C>T	Éxon VIII	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007

Em 2000, Voskoboeva e colaboradores descreveram a alteração p.S384N como mutação patogênica. Em 2007, essa mutação foi encontrada em 12,4% dos pacientes com MPS VI do estudo de Karageorgos e colaboradores. Em 2009, essa alteração foi analisada em indivíduos normais sendo encontrada em 9% da amostra (200 indivíduos italianos), com isso, os autores concluíram que essa alteração não era patogênica. Esse estudo enfatiza a necessidade de analisar pelo menos 50 indivíduos controles antes de afirmar que uma mutação é patogênica (Zanetti *et al.*, 2009).

8.5.7. Correlação genótipo-fenótipo

Até 1991, uma correlação molecular da heterogeneidade clínica da MPS VI não era conhecida. O isolamento do cDNA e clones da enzima ARSB humana permitiram, a partir de então, o acesso ao gene para análise molecular dos defeitos genéticos subjacentes às diferentes formas da MPS VI (Wicker *et al.*, 1991).

Usando uma variedade de substratos artificiais (Humbel, 1976; Kolodny and Mumford, 1976) e naturais (Hopwood, 1986), pesquisadores mostraram que as atividades da ARSB, em culturas de fibroblastos de pacientes com as formas grave e leve, geralmente têm menos do que 10% da atividade normal. Em 1991, Brooks e colaboradores avaliaram os níveis de ARSB em culturas de fibroblastos em 16 pacientes com MPS VI não relacionados, que apresentavam fenótipos leve, intermediário ou grave. Todos os pacientes tinham menos que 10% de proteína ARSB normal e a maioria dos pacientes afetados gravemente tinham menos ARSB do que os pacientes com os fenótipos intermediário e leve. Esses resultados indicaram que a gravidade clínica pode ser correlacionada com a quantidade da enzima residual.

O primeiro estudo que mostrou uma correlação do genótipo com o fenótipo foi publicado em 1991, por Wicker e colaboradores. Nesse estudo, o paciente possuía a mutação p.G137V que foi associada a um fenótipo clínico intermediário, devido à baixa atividade

residual da ARSB. Os autores concluíram que se pode esperar que a forma grave da MPS VI é causada por mutações que não permitem a síntese do polipeptídeo ARSB, em contraste com as formas intermediária e leve da doença onde se pode esperar níveis residuais da enzima ARSB (Wicker *et al.*, 1991).

Dando sequência aos estudos de correlação, pesquisadores relacionaram a mutação p.C117R ao fenótipo grave com aproximadamente 2% de atividade normal da ARSB (Jin *et al.*, 1992). Em um segundo paciente neste mesmo estudo, com aproximadamente 7% de atividade normal da ARSB, foram encontradas duas diferentes mutações, p.L236P e p.C405Y, por isso, a conclusão foi de que uma ou as duas alterações podem ser responsáveis pela atividade residual da ARSB e o fenótipo intermediário deste paciente.

Correlações entre genótipo e fenótipo são difíceis de ser realizadas, pois a maioria dos alelos mutantes está presente em apenas um paciente ou em poucos e a maioria dos pacientes caracterizados são heterozigotos compostos. Nos pacientes em que ambos os alelos são nulos, como as mutações sem sentido ou pequenas deleções e inserções, é previsto que não haja uma proteína ARSB funcional e, portanto o paciente tenha um fenótipo grave. Mutações de sentido trocado são previstas para terem um efeito variável sobre a gravidade clínica do paciente, pois as substituições dos aminoácidos podem ter diferentes efeitos sobre a estrutura e/ou atividade da proteína de acordo com sua localização. Pacientes que são heterozigotos compostos para mutações de sentido trocado e mutações nulas são geralmente mais gravemente afetados do que os pacientes homozigotos para mutações de sentido trocado (Litjens e Hopwood, 2001).

Tabela 7 – Descrição dos fenótipos relacionados com as mutações no gene ARSB dos pacientes com MPS VI.

Mutação	Éxon	Fenótipo	Referência
p.S65F	I	Intermediário	Villani <i>et al.</i> , 1999
p.L72Q	I	Grave	Isbrandt <i>et al.</i> , 1996
p.Y86del	I	Grave	Karageorgos <i>et al.</i> , 2004
p.T92M	I	Leve	Litjens <i>et al.</i> , 1996
p.R95Q	I	Leve / Grave	Litjens <i>et al.</i> , 1996
p.L98P	I	Intermediário	Voskoboeva <i>et al.</i> , 2000
p.P116H	II	Grave	Villani <i>et al.</i> , 1999
p.C117R	II	Grave	Jin <i>et al.</i> , 1992
p.G137V	II	Intermediário	Wicker <i>et al.</i> , 1991
p.M142I	II	Intermediário	Simonaro e Schuchman, 1995
p.G144R	II	Grave	Isbrandt <i>et al.</i> , 1994
p.W146R	II	Grave	Simonaro e Schuchman, 1995
p.R152W	II	Intermediário	Voskoboeva <i>et al.</i> , 1994
p.R160Q	II	Intermediário	Voskoboeva <i>et al.</i> , 1994
p.C192R	III	Leve	Isbrandt <i>et al.</i> , 1994; Wu <i>et al.</i> , 2000; Yang <i>et al.</i> , 2001
p.Y210C	III	Leve / Intermediário	Litjens <i>et al.</i> , 1996; Karageorgos <i>et al.</i> , 2004
p.L236P	IV	Leve	Jin <i>et al.</i> , 1992; Karageorgos <i>et al.</i> , 2004
p.G302R	V	Grave	Villani <i>et al.</i> , 1998
p.W312C	V	Grave	Karageorgos <i>et al.</i> , 2004
p.R315Q	V	Intermediário	Villani <i>et al.</i> , 1999; Karageorgos <i>et al.</i> , 2004
p.S320R	V	Intermediário	Voskoboeva <i>et al.</i> , 2000
p.L321P	V	Intermediário	Isbrandt <i>et al.</i> , 1994; Karageorgos <i>et al.</i> , 2004
p.L360P	V	Leve	Voskoboeva <i>et al.</i> , 2000
p.H393P	VI	Intermediário / Grave	Litjens <i>et al.</i> , 1996
p.C405Y	VII	Leve	Jin <i>et al.</i> , 1992
p.Q456X	VIII	Grave	Villani <i>et al.</i> , 1998
p.L498P	VIII	Leve	Litjens <i>et al.</i> , 1996
p.Q503X	VIII	Intermediário	Villani <i>et al.</i> , 1999
p.C521Y	VIII	Intermediário / Grave	Isbrandt <i>et al.</i> , 1994; Voskoboeva <i>et al.</i> , 2000
p.P531R	VIII	Leve	Villani <i>et al.</i> , 1999
p.X534Q	VIII	Intermediário	Arlt <i>et al.</i> , 1994

O estudo de Karageorgos e colaboradores, em 2007, mostrou algumas mutações que geram na MPS VI uma progressão rápida, com início precoce do fenótipo grave. A Figura 15 apresenta a correlação do genótipo com os GAGs urinários e a idade (Karageorgos *et al.*, 2007).

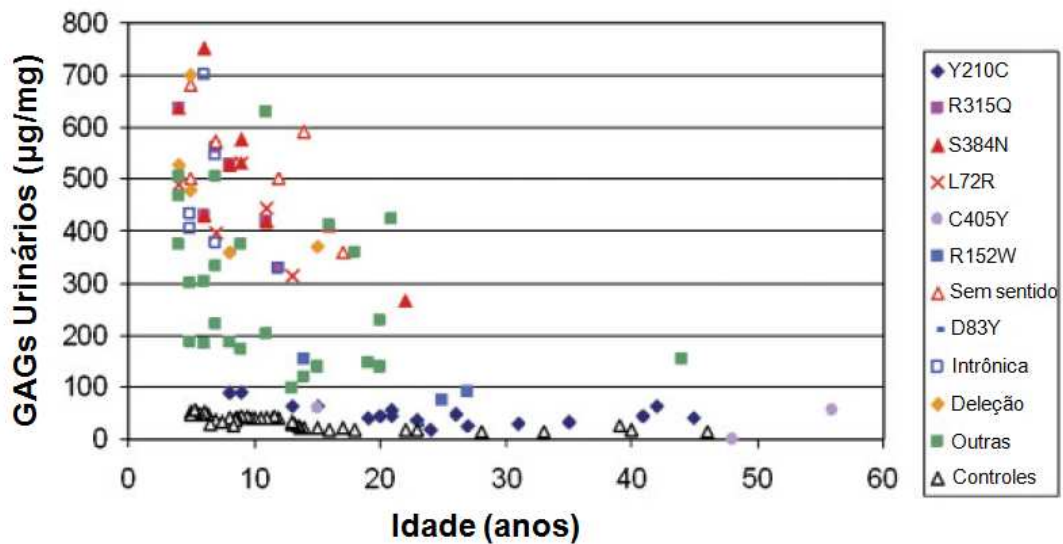


Figura 15 - Correlação do genótipo com os níveis de GAGs urinários e a idade. Os valores dos GAGs urinários ajustados para creatinina foram determinados e avaliados sobre a idade em anos.

A análise molecular dos 105 pacientes com MPS VI, relatados anteriormente, tem fornecido evidência para dar suporte a uma correlação entre genótipo, fenótipo e GAGs urinários. Mutações no sítio ativo da proteína, mutações sem sentido e mutações que resultam em uma proteína truncada por deleções e inserções, todas dão origem a doença de rápida progressão e início precoce do fenótipo grave (Karageorgos *et al.*, 2007). Esse estudo mostrou uma correlação entre o genótipo e os GAGs urinários que pode ser usada para prever os resultados clínicos.

8.6. Genética Médica Populacional

Genética de populações é o estudo quantitativo da distribuição da variação genética em populações e como as frequências de genes e genótipos são mantidas ou trocadas. A genética de populações está envolvida com fatores genéticos, tais como mutação e reprodução, e com fatores ambientais e sociais, tais como seleção e migração, que em seu conjunto, determinam a frequência e distribuição de alelos e genótipos em famílias e comunidades (Nussbaum *et al.*, 2008).

A Genética Médica Populacional (GEMEPO) é uma seção da Genética Médica que tem como objeto de estudo e atenção médica uma população, em vez de uma família como ocorre na genética clínica ou médica propriamente dita. A GEMEPO conjuga a genética clínica com: a genética de populações humanas, dedicada ao estudo das populações do ponto de vista de microevolução; a genética epidemiológica, tradicionalmente enfocada no estudo de doenças crônicas comuns de etiologia poligênica, excluindo as mendelianas; a genética sanitária ou comunitária, na interface com a saúde pública, fundamentando ações de saúde preventivas (INAGEMP, 2011).

O termo “isolado” é comumente empregado em genética para definir um conjunto humano que está separado dos outros por alguma barreira, seja ela geográfica, política, sócio-econômica, religiosa ou cultural que impede ou dificulta a troca de genes com outro conjunto. Nessa definição está implícito que, na espécie humana, também existem mecanismos de isolamento que impedem o intercâmbio de genes entre populações que vivem na mesma área geográfica (Beiguelman, 2005).

8.6.1. Casamentos consanguíneos

Os fundamentos para o entendimento do efeito dos casamentos consanguíneos, sobre a composição genotípica das populações, foram lançados por um número muito restrito de geneticistas, na primeira metade do século vinte. Dentre os trabalhos por eles publicados é

obrigatório destacar os de Wright (1921, 1922, 1951), Dahlberg (1929, 1938, 1948), Haldane e Moshinsky (1939) e Malécot (1948). No Brasil, os estudos sobre consanguinidade foram realizados, predominantemente, por Newton Freire-Maia que conduziu, sozinho ou com a colaboração de geneticistas oriundos de sua escola, numerosas pesquisas pioneiras nessa área, as quais foram revistas em boa parte em uma de suas obras publicada em 1974 (Beiguelman, 2005).

As restrições aos casamentos entre parentes existem não apenas nas sociedades civilizadas, mas também nas primitivas. Nem sempre os critérios para o impedimento dessas uniões têm ou tiveram por objetivo evitar o maior risco de manifestação de anomalias recessivas. De fato, o Código Civil brasileiro impede o casamento de ascendentes com descendentes e de consanguíneos colaterais até o terceiro grau, o que estende a restrição a irmãos, meios-irmãos, tios(as) e sobrinhos(as). Evidentemente, ao impedir esses casamentos o legislador tinha em mente apenas a organização e a proteção da família (Beiguelman, 2005).

Os critérios adotados para o impedimento de casamentos entre parentes nem sempre têm uma base lógica. Por exemplo, durante cerca de um milênio a Igreja Católica proibiu o casamento entre parentes até o sétimo grau, com base no preceito bíblico de que o mundo foi criado em sete dias. Mais tarde, ela passou a proibir os casamentos até o quarto grau, tomando como base os quatro elementos: terra, água, ar e fogo (Almström, 1958).

Nos países atingidos pelo movimento luterano, as leis canônicas foram abolidas e a proibição dos casamentos entre parentes consanguíneos passou a ser feita de acordo com o Levítico (18:6-18). Dessa maneira, tais proibições atingiram alguns consanguíneos (pai×filha, mãe×filho, irmão×irmã, meio-irmão×meia-irmã, avô×neta, tio×sobrinha, tia×sobrinho) e alguns não-consanguíneos com afinidade próxima (filho×madrasta, sobrinho×esposa do tio, sogro×nora, cunhado×cunhada). Visto que a Bíblia, surpreendentemente, não faz restrição aos casamentos entre primos, verificou-se que a frequência de casamentos entre primos em

primeiro grau aumentou rapidamente a partir do século dezesseis, nos países que aceitaram a reforma da Igreja (Beiguelman, 2005).

Apesar de existirem restrições aos casamentos consanguíneos, mesmo em sociedades primitivas, existe um fenômeno que nos leva a admitir a sua existência em alta proporção, em épocas remotas da história da humanidade: é o chamado fenômeno da perda dos ancestrais. De fato, se não existissem casamentos consanguíneos, todo indivíduo deveria ter dois genitores, quatro avós, oito bisavós, 16 trisavós, 32 tetravós, e, de uma maneira geral 2^n ancestrais, sendo “n” o número de gerações que antecedem o indivíduo. Se aceitarmos que em cada século houve em média quatro gerações, temos que admitir a existência de 40 gerações em um milênio, ou seja, 2^{40} (1.099.511.627.776 ancestrais para cada indivíduo) (Beiguelman, 2005).

Essa estimativa, entretanto, é inverossímil, em vista das informações que temos sobre a pequena população humana existente na Terra há um milênio. Portanto, a hipótese da existência de casamentos consanguíneos, em alta proporção em eras pregressas, é aquela que melhor serve para explicar o fenômeno da perda de ancestrais. Esse fenômeno nos leva a concluir com Stern (1960) que, do ponto de vista evolutivo, a fraternidade da espécie humana não é um mero conceito espiritual, mas uma realidade genética (Beiguelman, 2005).

Quando as populações são muito pequenas, os casamentos consanguíneos podem ocorrer não porque sejam preferenciais, mas porque o tamanho reduzido da população faz com que aumente a probabilidade de parentesco consanguíneo próximo entre os cônjuges. Isso tem sido observado em aldeias localizadas em ilhas, em tribos beduínas e em pequenas comunidades religiosas. Existem comunidades pequenas, entretanto, como as encontradas nos Alpes suíços, em que a frequência de casamentos consanguíneos é bem menor do que a esperada ao acaso, o que indica que, nesses agrupamentos humanos, tais uniões são evitadas (Beiguelman, 2005).

É difícil analisar os fatores que determinam a prevalência de casamentos consanguíneos nas populações humanas, mas os de ordem econômica devem influir de modo prioritário, sobretudo em comunidades rurais, com a finalidade de manter a integridade da propriedade na família sem herdeiros do sexo masculino (Beiguelman, 2005).

Na maior parte dos países, entretanto, a tendência atual é a diminuição acelerada das taxas de casamentos consanguíneos, em decorrência do processo de urbanização com a formação de grandes aglomerados humanos, das conquistas femininas que tornam a mulher cada vez mais independente e das facilidades de locomoção e comunicação que propiciam maior contato entre pessoas de origens diversas. Como exemplo, a Arquidiocese de Florianópolis, que registrava 4,5% de casamentos consanguíneos em 1920, passou a assinalar 1% desses matrimônios em 1980 (Agostini e Meireles-Nasser, 1986).

O parentesco genético entre dois seres humanos pode ser medido por intermédio da probabilidade de eles terem genes idênticos, herdados de um ancestral comum a ambos, independentemente de tais genes condicionarem fenótipos dominantes ou recessivos, normais ou anômalos. Essa medida do parentesco ou da correlação genética entre dois indivíduos é denominada coeficiente de consanguinidade ou coeficiente de parentesco e, geralmente, indicada pela letra r , inicial da palavra inglesa *relationship* = parentesco (Beiguelman, 2005).

Considerando que cada passagem de um gene de uma geração a outra é chamado de passo genético, a indicação do cálculo do coeficiente de consanguinidade pode ser resumida pela fórmula $r = \Sigma(1/2)^N$, na qual N é o número de passos que unem dois consanguíneos a um ancestral comum (Beiguelman, 2005).

Se dois alelos em um indivíduo endogâmico (descendente de pais consanguíneos) são idênticos por descendência, o genótipo no *locus* é chamado autozigoto. Se eles não são idênticos por descendência, o genótipo é chamado alozigoto (Hartl, 2008). O coeficiente de endocruzamento, geralmente simbolizado pela letra F , indica a probabilidade de um indivíduo ser homozigoto, em decorrência do encontro de um par de alelos idênticos, derivados de um

único gene herdado de um de seus ancestrais. Em outras palavras, o coeficiente de endocruzamento indica a probabilidade de um indivíduo ser autozigoto de um gene qualquer presente em um de seus ancestrais (Beiguelman, 2005).

O coeficiente de endocruzamento em relação a genes autossômicos pode ser calculado, rapidamente, quando se conhece o coeficiente de consanguinidade dos genitores de um indivíduo, pois $F = r/2$ (Beiguelman, 2005).

Apesar de ser mais correto estimar as frequências dos alelos a partir de uma amostra aleatória da população da qual procedem às famílias, é importante ressaltar que, se a amostra das famílias for grande e a frequência dos genes for alta, não se correrá o risco de estimar erroneamente as frequências gênicas, a partir dos próprios casais coletados (Beiguelman, 2005).

8.6.2. Efeito fundador

A distribuição das frequências de certos genes em algumas populações humanas tem grande probabilidade de ter sido consequência da deriva genética, a qual deve ter tido papel evolutivo muito mais relevante do que a seleção natural nas populações primitivas constituídas por pequenos isolados genéticos, cujo tamanho efetivo não deveria exceder a 100 indivíduos. Nesses pequenos isolados existia a possibilidade de um único indivíduo, altamente fecundo ou com descendentes muito fecundos, provocar a predominância de um ou mais genes na população originária de tais isolados, ainda que um desses genes conferisse baixo valor adaptativo a seus portadores. Quando se reconhece a existência desse processo, costuma-se falar em efeito fundador (Beiguelman, 2005).

8.6.3. Haplótipos

Um dado conjunto de alelos em um *locus* ou em um aglomerado de *loci*, localizado em um cromossomo, é denominado haplótipo. Quando um alelo patológico entra numa população

pela primeira vez, por meio de mutação ou pela imigração de um fundador, o grupo particular de alelos, nos marcadores ligados com o *locus* patológico, constitui um haplótipo da doença (Nussbaum, 2008).

A utilização de marcadores intragênicos para formar haplótipos ligados ao alelo patogênico garante que esse conjunto de alelos persista com o passar do tempo, independente do número de gerações.

8.7. Rede MPS Brasil

A Rede MPS Brasil é uma parceria de centros brasileiros que atendem pacientes com Mucopolissacaridoses. O Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre coordena o projeto, disponibilizando os testes laboratoriais necessários e apoiando o desenvolvimento clínico e laboratorial dos centros participantes.

Os objetivos da Rede são: aumentar a disponibilidade de informação sobre as MPS, facilitar o acesso dos pacientes aos centros de diagnósticos e tratamento, formar um registro geral de casos e estimular iniciativas de pesquisa na área. Com isso, espera-se que esta iniciativa leve à identificação da maioria dos pacientes com MPS no Brasil, conduzindo à estruturação de uma rede organizada para diagnóstico, manejo, prevenção e investigação das MPS, aumentando a qualidade e a expectativa de vida dos pacientes.

8.8. Monte Santo

Incluído totalmente no “Polígono das Secas”, o Município de Monte Santo compreende uma área de 3.187 Km². Está a uma distância de 352 km de Salvador, Capital do Estado, com vias pavimentadas (Figura 16).



Figura 16 - Mapa do estado da Bahia mostrando a localização do município de Monte Santo.

8.8.1. Histórico

Em outubro de 1775, o Capuchinho Frei Apolônio de Todi que se encontrava na Aldeia Indígena de Massacará (hoje situada no Município de Euclides da Cunha – Figura 17) foi convidado pelo Fazendeiro Francisco da Costa Torres para realizar uma Missão na Fazenda Lagoa da Onça. Ali chegando, deparou com uma grande seca e devido à escassez de água, não realizou a Missão, decidindo seguir para o logradouro de gado denominado Piquaraçá, onde existia um “Olho d’água” conhecido atualmente como “Fonte da Mangueira”, localizado no sopé da serra.



Figura 17 - Mapa com os municípios vizinhos ao de Monte Santo.

Frei Apolônio, ao apreciar a serra, ficou impressionado da sua semelhança com o Monte Calvário de Jerusalém e convidou os fiéis que o acompanhavam para transformar o Monte em um “Sacro-Monte”, marcando seu dorso com os passos da Paixão. Mandou tirar madeiras para armar uma capelinha e ordenou que fizessem cruzes para a procissão rumo ao pico do monte. A cada parada fincavam as cruzes com espaços regulares na seguinte ordem: a primeira dedicada às almas, as sete seguintes representando as dores de Nossa Senhora e as quatorze restantes lembrando o sofrimento de Jesus em sua caminhada para o Monte calvário em Jerusalém. Em 31 de outubro de 1775, o Frei pediu que aquele local não mais fosse chamado de Serra do Piquaraçá (assim chamado devido uma planta nativa - Araçá), mas que passassem a chamá-lo de Monte Santo e partiu, pedindo a todos que construíssem capelas e

visitassem sempre as santas cruzes. Assim os fiéis construíram as capelas: as menores, as de tamanho médio e a maior, no final do trajeto de aproximadamente 4 km, a capela de Santa Cruz onde ficam as Imagens de Nosso Senhor Morto, Nossa Senhora da Soledade e São João Evangelista (Figura 18). A fama do local sagrado percorreu todo o Sertão, todo o Brasil e até o exterior.



Figura 18 - Foto do morro em dia de procissão para a Capela de Santa Cruz, localizada no município de Monte Santo.

No século XIX, Monte Santo recebeu alguns renomados visitantes que deixaram relatos sobre sua formação histórica, descrição da população e observações sobre a cultura e costumes dos sertanejos. Em 1819, dois viajantes europeus percorreram o sertão da Bahia: os cientistas Johan Baptist Ritter von Spix (1781-1826) e Karl Friedrich Philipp von Martius (1794-1868). Naturalistas, vieram ao Brasil acompanhando a futura princesa Leopoldina para suas núpcias com D. Pedro I. Percorreram o longo e rude caminho entre Cachoeira e Monte Santo, buscando alcançar uma misteriosa pedra denominada Bedengó. O meteorito que pesava cerca de cinco toneladas havia sido encontrado próximo ao riacho de Bedengó, a norte de Monte Santo. A pedra, que intrigava os europeus se seria de prata (segundo as lendas

populares relatadas pelos naturalistas) ou de material vulcânico, despertou o interesse na época, sendo levados fragmentos para estudo no Rio de Janeiro e na Europa.

Monte Santo registrou a passagem do andarilho-profeta dos sertões – o famoso Antonio Conselheiro. O cearense e seu séquito estabeleceram-se nas proximidades de Monte Santo, na antiga fazenda Canudos, que passou a denominar-se Belo Monte. Foi através de Conselheiro que Monte Santo foi decantada pela luta dos sertanejos contra as tropas republicanas. A sangrenta batalha foi retratada no clássico “Os Sertões” de Euclides da Cunha, cuja primeira edição data do ano de 1902.

8.8.2. Informações sócio-econômicas

O município de Monte Santo (Figura 19) está localizado na sexta região econômica do Estado da Bahia. Possui altitude média de 489 metros acima do nível do mar, temperatura média anual de 23,6°C, pluviosidade variada, com alto risco de seca. A população de Monte Santo é de aproximadamente 52.338 habitantes, com 850 nativos registrados em 2010, sua densidade demográfica é de 16,42 habitantes por km². Aproximadamente, 83% da população reside na zona rural. Há 14.056 (33%) analfabetos maiores de 10 anos ou com escolaridade menor de um ano. O PIB/capita é de 2.522,83 (IBGE-2010, código do município: 292150).



Figura 19 – Povoados do Município de Monte Santo.

O município possui 18 estabelecimentos de saúde, sendo 17 públicos e 1 privado. Apenas 01 hospital com 60 leitos, 02 equipes de Programa de Saúde da Família com cobertura de apenas 11,85% da população. Há 120 Agentes Comunitários de Saúde, proporcionando uma cobertura de 82%. Há 01 Centro de Assistência Psico-Social na cidade, atendendo cerca de 2 mil pessoas com distúrbios mentais variados e sem diagnóstico etiológico específico.

8.8.3. Projeto Genética no Sertão

O Projeto Genética no Sertão teve seu início em 2006 quando foram observadas e comprovadas as informações de um pai que tinha dois filhos com MPS VI (Figura 20) e relatava presença de outros, com as mesmas características. A partir de então, nesse

município, têm sido diagnosticadas diversas doenças genéticas (monogênicas) autossômicas recessivas em pacientes de várias famílias residentes. Esta observação sugere uma estrutura reprodutiva endogâmica da população que pode se relacionar com outras patologias crônicas, incluindo doenças raras monogênicas, assim como doenças comuns poligênicas, susceptíveis de prevenção primária e terciária.



Figura 20 – Irmãos com MPS VI que estimularam a pesquisa no município de Monte Santo.

A primeira viagem ao município, para coleta de dados, foi realizada em outubro de 2006 com a participação de 9 integrantes, sob a coordenação da Dra. Angelina Xavier Acosta (Figura 21). Nesta viagem foram coletadas informações sobre os dados históricos (migração e povoamento), dados para elaboração de genealogia, coleta de material biológico e georeferenciamento.



Figura 21 - Equipe integrante da primeira viagem para Monte Santo em outubro de 2006.

Dando sequencia ao Projeto foram realizadas outras viagens ao município: em julho de 2007 com 28 integrantes, em maio de 2008 com 30 integrantes; em outubro de 2009 com 24 integrantes (Figura 22), em maio de 2010 com 5 integrantes (Figura 23), em novembro de 2010 com 15 integrantes e em abril de 2011 para a inauguração do Centro de tratamento de terapia de reposição enzimática.



Figura 22 – Equipe integrante da quarta viagem para Monte Santo em outubro de 2009.



Figura 23 - Equipe integrante da quinta viagem para Monte Santo em maio de 2010.

A ciência histórica e as atividades de arquivo integraram o Projeto como auxiliares nos estudos de genealogia e consanguinidade, através da digitalização de livros paroquiais e tabulação de dados. A história assomou ao Projeto inicialmente pelo interesse nos Livros de Matrimônio da Paróquia do Sagrado Coração de Jesus de Monte Santo. Os registros matrimoniais, encontrados desde meados do século XIX, foram coligidos para organização de genealogias e estudos de consanguinidade que remontavam o início da história do município (Msc. Lais Viena de Souza - Comunicação Pessoal).

Com uma equipe multidisciplinar (Figura 24), o Projeto Genética no Sertão é integrado por: pesquisa em laboratório de estudos genéticos; acompanhamento genético, clínico e psicológico dos pacientes; pesquisa antropológica. Esse possui apoio das seguintes instituições: Universidade Federal da Bahia, Universidade do Estado da Bahia, Universidade do Recôncavo da Bahia, APAE Salvador, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (FIOCRUZ-BA), Fundação Oswaldo Cruz (RJ), Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (RS) e pelo Instituto Nacional de Genética Médica e Populacional (INAGEMP/CNPq).



Figura 24 – Atividades desenvolvidas em Monte Santo pela equipe multidisciplinar.

A equipe multidisciplinar é formada, atualmente, pelas médicas Profa. Dra. Angelina Acosta (coordenadora) e Profa. Dra. Tatiana Amorim; pelas biólogas Profa. Dra. Kiyoko Abé Sandes (coordenadora), Ma. Taisa Manuela Machado, Ma. Thais Bonfim, Ma. Taíse Lima, Profa. Ma. Fabiana Moura Costa Motta; pelos fonoaudiólogos mestrados Roberta Paulon e Danniell San Dias da Silva; pela biomédica Ma. Gabrielle Manzoli, pela psicóloga Isabella Queiroz, pelo antropólogo Prof. Dr. Gabriele Grossi; pela historiadora Ma. Lais Viena de Souza. O projeto recebe auxílio de muitos colaboradores: Prof. Dr. Eduardo Castilla, Prof. Dr. Roberto Giugliani, Dra. Ieda Orioli, Profa. Dra. Sandra Leistner-Segal, Ma. Taiane Vieira, Fernando Poletta e Prof. Me. Fabricio Lyrio.

8.8.4. Mucopolissacaridose tipo VI em Monte Santo

Foram identificados em Monte Santo, até o momento, 13 casos de MPS VI (Figura 25), sendo possível a existência de outros casos ainda não registrados na região, e, por levantamento familiar, há relatos de várias ocorrências cujos pacientes já foram a óbito. A MPS VI é o único tipo descrito em Monte Santo até o momento.



Figura 25 – Fotos dos 13 pacientes com MPS VI de Monte Santo.

9. OBJETIVOS

GERAIS

- Identificar a(s) mutação(ões) presente(s) nos pacientes com MPS VI de Monte Santo/BA;
- Identificar os portadores (heterozigotos) nas famílias através da análise da mutação identificada nos casos índices;
- Definir haplótipos utilizando polimorfismos intragênicos de sequencia única (*SNPs*) nos familiares e pacientes de Monte Santo/BA, para a identificação de uma possível origem comum do alelo mutado nesta população.

ESPECÍFICOS

- Permitir aconselhamento genético eficiente e consequentemente orientações a cerca da doença aos familiares com indivíduos afetados.

10. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

- Arlt G, Brooks DA, Isbrandt D, *et al.*, 1994. Juvenile form of mucopolysaccharidosis VI Maroteaux-lamy syndrome. A C-terminal extension causes instability but increases catalytic efficiency of arylsulfatase B. *J Biol Chem*, 269:9638- 9643.
- Agostini JM & Meirelles-Nasser C, 1986. Consanguineous marriages in the archdiocese of Florianópolis, South Brazil. *Rev Brasil Genet*, 9:479-486.
- Albano LM, Sugayama SS, Bertola DR, *et al.*, 2000. Clinical and laboratorial study of 19 cases of mucopolysaccharidoses. *Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo*, Nov-Dec 55:213-8.
- Alberts B, Johnson A, Walter P, *et al.*, 2004. Livro: Biologia molecular da célula. 4ª ed. Artmed, 1584 pp.
- Almström CH, 1958. First-cousin marriages in Sweden 1750-1844 and a study of the population movement in some Swedish subpopulations from the genetic-statistical viewpoint. *Acta Genet.*, 8:295-369.
- Anson DS, Taylor JA, Bielicki J, *et al.*, 1992. Correction of human mucopolysaccharidosis type-VI fibroblasts with recombinant N-acetylgalactosamine-4-sulphatase. *Biochem J*, 284:789-94.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. [citado 3/3/2009]. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/>.
- Applegarth D, Toone JR, Lowry RB, 2000. Incidence of inborn errors of metabolism in British Columbia, 1969-1996. *Pediatrics*, 105(1):1-6.
- Ashworth JL, Biswas S, Wraith E, Lloyd IC, 2006. Mucopolysaccharidoses and the eye. *Surv Ophthalmol*, 51:1-17.
- Auclair D, HopwoodJJ, Brooks DA, *et al.*, 2003. Replacement therapy in mucopolysaccharidosis type VI: advantages of early of therapy. *Molecular Genetics and metabolism*, 78:163-74.
- Azevedo AC, 2004. Estudo clínico e bioquímico de 28 pacientes com mucopolissacaridose tipo VI. Dissertação de mestrado pelo programa de pós-graduação em Ciências Médicas: Pediatria, 94pp.
- Baehner F, Schmiedeskamp C, Krummenauer F, *et al.*, 2005. Cumulative incidence rates of the mucopolysaccharidoses in Germany. *J Inherit Metab Dis*, 28:1011-17.
- Baron RW, Neufeld EF, 1972. A distinct biochemical deficit in the Maroteaux-Lamy syndrome (mucopolysaccharidosis VI). *J Pediatr*; 80(1):114-6.
- Barton NW, Furbish FS, Murray GJ, *et al.*, 1990. Therapeutic response to intravenous infusions of glucocerebrosidase in a patient with Gaucher disease. *Proc Nat Acad Sci USA*, 87(5):1913-6.
- Beck M, 2000. Mucopolysaccharidosis and oligosaccharidosis. In Fernandes J, Saudubray M, Van der Berghe G. Eds. Inborn metabolic diseases, diagnosis and treatment. 3th ed. New York: Springer; 415-21.

- Beiguelman B. Genética de Populações Humanas. [http://lineu.icb.usp.br/bbeiguel/Genética Populações](http://lineu.icb.usp.br/bbeiguel/Genética%20Populações).
- Biomarin [citado 3/3/2009]. Biomarin Pharmaceutical Inc. Available from: <http://www.bmrn.com/products/aldurazyme.php>.
- Biomarin [citado 9/3/2009]. Biomarin Pharmaceutical Inc. Available from: <http://www.bmrn.com/products/naglazyme.php>.
- Bond CS, Clements PR, Ashby SJ, *et al.*, 1997. Structure of a human Lysosomal sulfatase. *Structure*, 5:277-89.
- Brandford TM, Litjens T, Parkinson EJ, *et al.*, 2002. Mucopolysaccharidosis Type VI (Marateaux-Lamy Syndrome): A Y210C mutation causes either altered protein handling or altered protein function of N-acetylgalactosamine 4-sulfatase at multiple points in the vacuolar network. *Biochemistry*, 41:4962-4971.
- Brooks DA, McCourt PAG, Gibson GJ, *et al.*, 1991. Analysis of N-acetylgalactosamine -4-sulfatase protein and kinetics in mucopolysaccharidosis type VI patients. *Am J Hum Genet*; 48:710-719.
- Brooks DA, King BM, Crawley AC, *et al.*, 1997. Enzyme replacement therapy in Mucopolysaccharidosis VI: evidence for immune responses and altered efficacy of treatment in animal models. *Biochem Biophys Acta*, 1362:203-16.
- Brooks DA, Gibson GJ, Karageorgos L, *et al.*, 2005. An index case for the attenuated end of the mucopolysaccharidosis type VI clinical spectrum. *Mol Genet Metab*; 85(3):236-238.
- Byers S, Rozaklis T, Brumfield LK, *et al.*, 1998. Glycosaminoglycan accumulation and excretion in the mucopolysaccharidosis: characterization and basis of a diagnostic test for MPS. *Mol Genet Metab*, 65:282-290.
- Cardoso-Santos A, Azevedo AC, Fagundes S, *et al.*, 2008. Mucopolysaccharidosis type VI (Maroteaux-Lamy syndrome): assessment of joint mobility and grip and pinch strength. *J Pediatr (Rio J)*, 84:130-135.
- Chamoles N, Campoy C, Jorge L, *et al.*, 1994. Detección de enfermedades metabólicas em um período de 24 años. Abstract of 11° Latin American Congress of Genetics. Puerto Valarta. México; N°418.
- Chen MR, Lin SP, Hwang HK, Yu CH, 2005. Cardiovascular changes in mucopolysaccharidoses in Taiwan. *Acta Cardiol*, 60:51-53.
- Clarke LA, 2008. Idursulfase for the treatment of mucopolysaccharidosis II. *Expert Opin Pharmacother*, 9(2):311-17.
- Coelho JC, Wajner M, Burin MG, *et al.*, 1997. Selective screening of 10.000 high-risk Brazilian patients for the detection of inborn errors of metabolism. *Eur J Pediatr*; 156:650-654.
- Dahlberg G, 1929. Inbreeding in man. *Genetics*, 14:421-454.
- Dahlberg G, 1938. On rare defects in human populations with particular regard to inbreeding and isolate effects. *Proc. Roy. Soc. Edinburgh*, 58(II):213-232.

- Dahlberg G, 1948. Mathematical methods for Population Genetics. *Interscience Publ.*, London, N. York.
- De Duve C & Wattiaux R, 1966. Functions of lysosomes. *An Rev of Phys*; 28:435-492.
- Dou W, Peng C, Zheng J, *et al.*, 2006. Two novel mutations of the arylsulfatase B gene in a Chinese MPS VI child undergoing bone marrow transplantation therapy. *Clin Chim Acta*; 374(1-2):171-172.
- Elaprased [citado 3/3/2009]. Elaprased (idursulfase). Available from; <http://www.elaprased.com>.
- EMA. European Medicines Agency. [citado 3/3/2009]. Available from: <http://www.ema.europa.eu>.
- Evers M, Saftig P, Schmidt P, *et al.*, 1996. Targeted disruption of the arylsulfatase B gene results in mice resembling the phenotype of mucopolysaccharidosis VI. *Proc Natl Acad Sci USA*; 93:8214-9.
- FDA. US Food and Drug Administration. Drugs@ FDA. [citado 3/3/2009]. Available from: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fuseaction=Search.DrugDetails>
- Fernández EG, 2008. Análisis genético y molecular del Síndrome de Maroteaux-Lamy. Tese de Doutorado pela Universidade de Barcelona. 205pp
- Freire-Maia N, 1974. Genética de populações humanas. HUCITEC, Editora da USP, S. Paulo.
- Fuller M, Hopwood JJ, Anson DS, 1998. Receptor mediated binding of two glycosylation of N-acetylgalactosamine-4-sulphatase. *Biochim Biophys Acta*, 1406(3):283-90.
- Fuller M, 2006. New tools for the diagnosis of lysosomal storage disorders. 9th International Symposium on Mucopolysaccharidosis and Related Disorders, Venecia, Italia.
- Futerman AH, van Meer G, 2004. The cell biology of Lysosomal storage disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 5(7):554-65.
- Garrido E, Chabás A, Coll MJ, *et al.*, 2007. Identification of the molecular defects in Spanish and Argentinian mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome) patients, including 9 novel mutations. *Mol Genet Metab*; 92(1-2):122-130.
- Garrot AE, Lond OFR, 1908. The incidence of alcaptonúria: a study in chemical individuality. *The Lancet*, 13:1616-20.
- Gibson GJ, Saccone GT, Brooks DA, *et al.*, 1987. Human N-acetylgalactosamine-4-sulphate sulphatase. Purification, monoclonal antibody production and native and subunit Mr.Values. *Biochem J*; 248(3):755-64.
- Gieselmann V, 1995. Lysosomal storage disease. *Biochim et Biophys Acta*, 1270:103-136.
- Giugliani R, 1998. Erros inatos do metabolismo: uma visão panorâmica. *Pediatria Moderna*, 23:29-38.
- Giugliani R, Harmatz P, Wraith JE, 2007. Management Guidelines for Mucopolysaccharidosis VI. *Pediatrics*, 120:405-418.

- Giugliani R, Federhen A, Rojas MVM, *et al.*, 2010. Terapia de reposição enzimática para mucopolissacaridoses I, II e VI: Recomendações de um grupo de especialistas brasileiros. *Rev Assoc Med Bras*; 56(3):257-77.
- Gonzalez-Noriega A, Grubb JH, Talkad V, Sly WS, 1980. Chloroquine inhibits lysosomal enzyme pinocytosis and enhances lysosomal enzyme secretion by impairing receptor recycling. *Journal of Cell Biology*; 85:839-852.
- Haldane JBS & Moshinsky P, 1939. Inbreeding in mendelian populations with special reference to human cousin marriage. *Ann Eugen*, 9:321-340.
- Harmatz P, Giugliani R, Schwartz I, *et al.*, 2006. Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis VI: a phase 3, randomized, double-blind, placebo-controlled, multinational study of recombinant human N-acetylgalactosamine 4-sulfatase (recombinant human arylsulfatase B or rhASB) and follow-on, open-label extension study. *J Pediatr*; 148(4):533-9.
- Harmatz P, 2008. Tracheostomy Reversal in an MPS VI Patient due to Improved Pulmonary Function While on Enzyme Replacement Therapy (ERT). *15th Annual ACMG Meeting March 12-16, Phoenix, Arizona*. Ref Type: Abstract
- Harmatz P, Giugliani R, Schwartz I, *et al.*, 2008. Longterm follow-up of endurance and safety outcomes during enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis VI: Final results of three clinical studies of recombinant human N-acetylgalactosamine 4-sulfatase. *Mol Genet Metab*, 94(4):469-75.
- Hartl D, 2008. Princípios de genética de população. 3ª ed.
- HGMD – The Human Gene Mutation Database (<http://www.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/search/>).
- Hopwood JJ, Elliott H, Muller VJ, Saccone GTP, 1986. Diagnosis of Maroteaux-Lamy syndrome by the use of radiolabelled oligosaccharides as substrates for the determination of arylsulphatase B activity. *Biochem J*; 234:507-514.
- Humbel R, 1976. Rapid method for measuring arylsulphatase A and B in leukocytes as a diagnosis of sulfatidosis, mucosulfatidosis and mucopolysaccharidosis VI. *Clin Chim Acta*; 68:339-341.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (www.ibge.gov.br).
- INAGEMP - Instituto Nacional de Genética Médica Populacional (www.inagemp.bio.br).
- Isbrandt D, Arlt G, Brooks DA, *et al.*, 1994. Mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome): six unique arylsulfatase B gene alleles causing variable disease phenotypes. *Am J Hum Genet*; 54:454-463.
- Isbrandt D, Hopwood JJ, von Figure K, Peters C, 1996. Two novel frameshift mutations causing premature stop codons in a patient with the severe form of Maroteaux-Lamy syndrome. *Hum Mutat*; 7:361-363.
- Jezyk PF, Haskins ME, Patterson DF, *et al.*, 1977. Mucopolysaccharidosis in a cat with arylsulfatase B deficiency: a model of Maroteaux-Lamy syndrome. *Science*; 198:834-836.

- Jin WD, Desnick RJ, Schuchman EH, 1991. A common polymorphism in the human arylsulfatase B (ARSB) gene at 5q13-q14. *Nucleic Acids Research*; 19:4305.
- Jin WD, Jackson CE, Desnick RJ, Schuchman EH, 1992. Mucopolysaccharidosis type VI: identification of three mutations in the arylsulfatase B gene of patients with the severe and mild phenotypes provides molecular evidence for genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet*; 50:795-800.
- Karageorgos L, Harmatz P, Simon J, *et al.*, 2004. Mutational analysis of Mucopolysaccharidosis type VI patients undergoing a trial of enzyme replacement therapy. *Human Mutation*; 23:229-233.
- Karageorgos L, Brooks DA, Pollard A, *et al.* 2007. Mutational analysis of 105 mucopolysaccharidosis type VI patients. *Human Mutations*, 28(9):897-903.
- Karam SM, Schwartz IV, Giugliani R. Introdução e aspectos clínicos dos erros inatos do metabolismo. In: Carakushansky G. *Doenças Genéticas em Pediatria*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. p.155-158.
- Kobayashi K, Jackson MJ, Tick DB, *et al.*, 1990. Heterogeneity of mutations in argininosuccinate synthetase causing human citrullinemia. *J Biol Chem*; 265:11361-11367.
- Kolodny EH, Mumford RA, 1976. Arylsulfatases A and B in metachromatic leukodystrophy and Maroteaux-Lamy syndrome: studies with 4-methylumbelliferyl sulfatase. In: Volk BW, Schneck L (eds). *Current trends in sphingolipidoses and allied disorders*. Plenum, New York, pp. 239-251.
- Koseoglu ST, Harmatz P, Turbeville S, Nicely H, 2009. Reversed papilledema in an MPS VI patient with galsulfase (Naglazyme) therapy 29. *Int Ophthalmol*, 29:267-269.
- Krivit W, 2004. Allogeneic stem cell transplantation for the treatment of Lysosomal and peroxisomal metabolic diseases. *Springer Semin Immunopathol*, 26(1-2):119-32.
- Lam CW, Chan AO, Lai CK, *et al.*, 2004. A novel mutation, Y255X, of the ARSB gene in a Chinese family with mucopolysaccharidosis type VI. *Chin Med J*; 117(12):1850-1852.
- Lampe C, Miebach E, Arash L, *et al.*, 2008. Therapeutic response after two years of galsulfase enzyme replacement therapy (ERT) in five adult patients with Maroteaux-Lamy syndrome. *Presentation at the annual meeting of the American Society of Human Genetics, November 12, 2008 Philadelphia, Pennsylvania*. Ref Type: Abstract.
- Lange MC, Teive HA, Troiano AR, *et al.*, 2006. Bone marrow transplantation in patients with storage diseases: a developing country experience. *Arq Neuropsiquiatr*, 64(1):1-4.
- Litjens T, Baker EG, Beckmann KR, Hopwood JJ, 1989. Chromosomal localization of ARSB, the gene of human n-acetylgalactosamine-4-sulfatase. *Hum Genet*, 82:67-68.
- Litjens T, Brooks DA, Peters C, *et al.*, 1996. Identification, expression, and biochemical characterization of N-acetylgalactosamine-4-sulfatase mutations and relationship with clinical phenotype in MPS VI patients. *Am J Hum Genet*, 58:1127-1134.
- Litjens T, Hopwood JJ, 2001. Mucopolysaccharidosis type VI: Structural and clinical implications of mutations in N-acetyl galactosamine-4-sulphatase. *Human Mutation*. 18:282-295.

- Lowry RB, Applegarth DA, Toone JR, *et al.*, 1990. An update on the frequency of mucopolysaccharide syndromes in British Columbia. *Hum Genet*, 85:389-390.
- Malécot G, 1948. Les mathématiques de l'hérédité. *Masson & Cie.*, Paris.
- Matalon R, Arbogast B, Dorfman A, 1974. Deficiency of chondroitin sulfate N-acetylgalactosamine 4-sulfate sulfatase in Maroteaux-Lamy syndrome. *Biochem Biophys Res Commun*, 61:1450-1457.
- Matte US, 1998. Caracterização molecular de pacientes com Mucopolissacaridose tipo I I: um estudo no Brasil (dissertação de mestrado). Porto Alegre (RS); UFRGS.
- Matte US, 2001. Análise Molecular do Gene da α -Iduronidase em Pacientes Sul-Americanos com Mucopolisacaridose Tipo I. Tese de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 85pp
- McGill JJ, Inwood AC, Coman DJ, *et al.*, 2006. Enzyme replacement therapy for MPS VI with recombinant human N-acetylgalactosamine 4-sulfatase (rhASB) from 8 weeks of age - a sibling control study. *J Inher Metab Dis*, 29:Suppl 1:65.
- Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF, 1999. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA*, 281(3):249-254.
- Michelakakis H, Dimitrou E, Tsaggaraki S, *et al.*, 1995. Lysosomal storage diseases in Greece. *Genetic Counseling*, 6:43-7.
- Miebach E, Thuemler A, Arash L, *et al.* 2007. Adult patients with mucopolysaccharidosis VI. *J Inher Metab Dis*. Ref Type: Abstract.
- Modaressi S, Rupp K, von Figura K, Peters C, 1993. Structure of the human arylsulfatase B gene. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 374:327-35.
- Morton NE, 1976. Forces maintaining polymorphisms. *Acta Anthropogenetica*; 1: 3-14.
- Nelson J, 1997. Incidence of the mucopolysaccharidosis in Northern Ireland. *Hum Genet*; 101:355-8.
- Neufeld EF, Muenzer J, 2001. The mucopolysaccharidosis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. (eds.). *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, 8th ed. McGraw-Hill, New York, pp. 3421-3452.
- Novikoff AB, 1973. Lysosomes A personal account. In: *Lysosomes and Storage Diseases* (ed. by HG Hers & F Van Hoof), pp. 2-41. Academic Press, New York.
- Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF, 2008. Thompson & Thompson. *Genética médica*, 7^a ed.
- Nyhan WL, Ozand PT, 1998. Maroteaux-Lamy disease / Mucopolysaccharidosis VI (MPS VI) / N-Acetylgalactosamine-4-sulfatase deficiency. In: Nyhan WL, Ozand PT. *Atlas of Metabolic Diseases*. 1^a ed. London: Champman & Hall Medical. p: 477-481.
- O'Brien JS, Cantz M, Spranger J, 1974. Maroteaux-Lamy disease (mucopolysaccharidosis VI), subtype A: Deficiency of a N-acetylgalactosamine-4-sulfatase. *Biochem Biophys Res Commun*, 60:1170-1177.

- Paterson DE, Harper G, Weston HJ, Mattingley J, 1982. Maroteaux-Lamy syndrome, mild form MPS VI B. *Br J Radiol*, 55:805-812.
- Paw BH, Moskowitz SM, Uhrhammer N, *et al.*, 1990. Juvenile GM2 gangliosidosis caused by substitution of histidine for arginine at position 499 or 504 of the a-subunit of l-hexosaminidase. *J Biol Chem*; 265:9452-9457.
- Peters C, Schmidt B, Rommerskirch W, *et al.*, 1990. Phylogenetic conservation of arylsulphatases: cDNA cloning and expression of human arylsulphatase B. *J Biol Chem*, 265:3374-3381.
- Petry MFG, Dieter T, Burin MG, Giugliani R, Leistner S, 2003. Identification of a novel mutation in the ARSB gene that is frequent among brazilian MPS VI patients. *Genetic Testing*. 7:347-349.
- Petry MFG, Nonemacher K, Sebben JC, *et al.*, 2005. Mucopolysaccharidosis type VI: Identification of novel mutations on the arylsulphatase B gene in South American patients. *J Inherit Metab Dis*, 28:1027-1034.
- Pilz H, Von Figura K, Goebel HH, 1979. Deficiency of arylsulfatase B in 2 brothers aged 40 and 38 years (Maroteaux-Lamy syndrome, type B). *Ann Neurol*, 6:315-25.
- Pinto R, Caseiro C, Lemos M, *et al.*, 2004. Prevalence of Lysosomal storage diseases in Portugal. *Eur J Hum Genet*, 12:87-92.
- Poorthuis BJ, Wevers RA, Kleijer WJ, *et al.*, 1999. The frequency of lysosomal storage diseases in the Netherlands. *Hum Genet*, 105(1-2):151-156.
- Sanberg S, DeanchingM, Hoganson G, *et al.*, 2008. Pseudo-deficiency allele of N-acetylgalactosamine-4-sulfatase gene identified in a family with Maroteaux-Lamy syndrome (mucopolysaccharidosis type VI). *Mol Genet Metabol*; 93(s34).
- Saudubray JM, Charpentier C, 1995. Clinical Phenotypes: Diagnosis/Algorithms. In: Scriver CR, Beaudet L, Sly WS and Valle D. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, chapter 5:327-400.
- Schuchman EH, Jackson CE, Desnick RJ, 1990. Human arylsulfatase B: MOPAC cloning, nucleotide sequence of a full length cDNA, and regions of amino acids identity with arylsulfatases A and C. *Genomics*, 6:149-158.
- Schwartz IVD, Matte US, Leistner S, Giugliani R, 2001. Mucopolissacaridoses. In: Carakushanski G. *Doenças genéticas em Pediatria*. 1^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 180-4.
- Semenza GL, Pyeritz RE, 1988. Respiratory complications of mucopolysaccharide storage disorders. *Medicine (Baltimore)*, 67:209-219.
- Shih SL, Lee YJ, Lin SP, Sheu CY, Blickman JG, 2002. Airway changes in children with mucopolysaccharidoses 6. *Acta Radiol*, 43:40-43.
- Simmons MA, Bruce IA, Penney S, *et al.*, 2005. Otorhinolaryngological manifestations of the mucopolysaccharidoses. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 69:589-595.

- Simonaro CM, Schuchman EH, 1995. N-acetylogalactosamine-4-sulfatase: identification of four mutations within the conserved sulfatase region causing mucopolysaccharidosis type VI. *Biochim Biophys Acta*, 1272:129-132.
- Spranger JW, Koch F, McKusick VA, *et al.*, 1970. Mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy's disease). *Helv Paediatr Acta*, 25:337-362.
- Stern C, 1960. Principles of Human Genetics. *W.H. Freeman and Co.*, San Francisco.
- Stumpf DA, Austin JH, Crocker AC, LaFrance M, 1973. Mucopolysaccharidosis type VI (Maroteaux-Lamy syndrome): Sulfatase B deficiency in tissues. *Am J Dis Child*; 126(6):747-55.
- Swiedler S, Beck M, Bajbouj M, *et al.*, 2005. Threshold effect of urinary glycosaminoglycans and the walk test as indicators of disease progression in a survey of subjects with mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome). *Am J Med Genet A*, 134:144-150.
- Taylor HR, Hollows FC, Hopwood JJ, Robertson EF, 1978. Report of a mucopolysaccharidosis occurring in Australian aborigines. *J Med Genet*, 15:455-461.
- Tonnesen T, Gregersen HN, Guttler F, 1991. Normal MPS excretion, but dermatan sulphaturia, combined with a mild Maroteaux-Lamy phenotype. *J Med Genet*, 28:499-501.
- Tylki-Szymanska A, Czartoryska B, Lugowska A, Górska D, 2001. The prevalence and diagnosis of lysosomal storage diseases in Poland. *Eur J Pediatrics*; 160:261-2.
- Valayannopoulos V, Barbier V, Boddaert N, *et al.*, 2009. High Prevalence of Mental Impairment in a Series of 6 Patients with Mucopolysaccharidosis Type VI (Maroteaux-Lamy Syndrome). *Mol Genet Metab*, 98(1-2):80. Ref Type: Abstract.
- Valayannopoulos V, Nicely H, Harmatz P, Turbeville S, 2010. Mucopolysaccharidosis VI. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 5:5.
- Vellodi A, 2004. Lysosomal storage disorders. *British Journal of Haematology*; 128:413-431.
- Vestermark S, Tonnesen T, Andersen MS, Guttler F, 1987. Mental retardation in a patient with Maroteaux-Lamy. *Clin Genet*, 31:114-117.
- Villani GRD, Balzano N, Di Natale P, 1998. Two novel mutations of the arylsulfatase B gene in two Italian patients with severe form of mucopolysaccharidosis. *Hum Mutat*; 11:410-410.
- Villani GRD, Balzano N, Vitale D, *et al.*, 1999. Maroteaux-lamy syndrome: five novel mutations and their structural localization. *Biochim Biophys Acta*; 1453:185-192.
- Voskoboeva E, Isbrandt D, von Figura K, *et al.*, 1994. Four novel mutant alleles of the arylsulfatase B gene in two patients with intermediate form of mucopolysaccharidosis VI. *Hum Genet*; 93:259-264.
- Voskoboeva E, Krasnopol'skaia KD, Peters K, von Figura K, 2000. Identification of mutations in the arylsulfatase B gene in Russian mucopolysaccharidosis type VI patients. *Genetika*, 36:837-843.

- Wenger DA, Coppola S, Shu-Ling, 2002. Lysosomal storage disorders: Diagnostic dilemmas and prospect for therapy. *Genetics in medicine*; 4:412-19.
- Wicker G, Prill V, Brooks D, *et al.*, 1991. Mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome): an intermediate clinical phenotype caused by substitution of valine for glycine at position 137 of arylsulfatase B. *J Biol Chem*, 266:21386-21391.
- Wippermann CF, Beck M, Schranz D, *et al.*, 1995. Mitral and aortic regurgitation in 84 patients with mucopolysaccharidoses. *Eur J Pediatr*, 154:98-101.
- Wraith JE, 1996. The mucopolisaccharidoses: a clinical review and guide to management. *Arch Dis Chil*, 71:263-7.
- Wraith JE, 2002. Lysosomal disorders. *Semin Neonatal*, 7:75-83.
- Wright S, 1921. Systems of mating. *Genetics*, 6:111-178.
- Wright S, 1922. Coefficients of inbreeding and relationship. *Amer. Nat.*, 56:330-338.
- Wright S, 1951. The genetic structure of populations. *Ann. Eugen.*, 15:323-354.
- Wu JY, Yang CF, Lee CC, Chang JG, Tsai FJ, 2000. A novel mutation (Q239R) identified in a Taiwan Chinese patient with type VI mucopolysaccharidosis (Maroteaux-Lamy syndrome). *Hum Mutat*; 15:389-390.
- Yang CF, Wu JY, Lin SP, Tsai FJ, 2001. Mucopolysaccharidosis type VI: report of two Taiwanese patients and identification of one novel mutation. *J Formos Med Assoc*; 100:820-823.
- Yogalingam G, Bielicki J, Hopwood JJ, Anson DS, 1997. Feline mucopolysaccharidosis type VI: correction of glycosaminoglycan storage in myoblasts by retrovirus-mediated transfer of the feline N-acetylgalactosamine 4-sulfatase gene. *DNA Cell Biol*, 16:1189-94.
- Yoshida M, Ikadai H, Maekawa A, *et al.*, 1993. Pathological characteristics of mucopolysaccharidosis VI in the rat. *J Comp Pathol*, 109:141-53.
- Xu M, 1996. A novel nonsense point mutation in the arylsulfatase B gene with a severe type Maroteaux-Lamy syndrome. *Hokkaido Igaku Zasshi*, 71:350-67.
- Zanetti A, Ferraresi E, Picci L, *et al.*, 2009. Segregation analysis in a family at risk for the Maroteaux-Lamy syndrome conclusively reveals c.1151G>A (p.S384N) as to be a polymorphism. *Eur J Hum Genet*; 17:1160-1164.

11. ARTIGO 1 – Publicado na revista *Molecular Genetics and Metabolism* em 2011.

GENETIC STUDIES IN A CLUSTER OF MUCOPOLYSACCHARIDOSIS TYPE VI PATIENTS IN NORTHEAST BRAZIL

Fabiana Moura Costa-Motta^{a,b}, Angelina Xavier Acosta^{c,d,e}, Kiyoko Abé-Sandes^{d,f}, Fernanda Bender^{a,b}, Ida Vanessa D. Schwartz^{a,b,g}, Roberto Giugliani^{a,b,c,g}, Sandra Leistner-Segal^{a,b}.

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

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

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

d - Advanced Laboratory of Public Health, Gonçalo Moniz Research Center, FIOCRUZ, Salvador, BA, Brazil;

e - Bahia School of Medicine, UFBA, Salvador, BA, Brazil.

f - State University of Bahia, Salvador, BA, Brazil

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

ABSTRACT

Mucopolysaccharidosis type VI (MPS VI, Maroteaux-Lamy syndrome) is a lysosomal storage disease caused by deficiency of arylsulphatase B. The incidence of MPS VI is very low, usually less than 1 case for every 1,000,000 newborns. In Northeast Brazil we identified in the county of Monte Santo (52,360 inhabitants) thirteen patients with MPS VI. The aim of this work was to identify the mutation(s) present in these patients and analyze intragenic SNPs to define possible haplotypes. The 13 MPS VI patients were found to be homozygous

for the p.H178L mutation. All patients have the same haplotype for the intragenic SNPs. Based on current data, the prevalence of MPS VI in this region is estimated as 1:5.000 newborns. These results, together with pedigree analysis, strongly suggest a founder effect accounting for the high frequency of p.H178L mutation in this area. This reinforces the need of a comprehensive community genetics program for this area.

Keywords: Mucopolysaccharidosis VI; Maroteaux-Lamy syndrome; Arylsulfatase B; Founder effect; Population Medical Genetics.

1. INTRODUCTION

Mucopolysaccharidosis type VI (MPS VI; Maroteaux-Lamy syndrome; OMIN 253200) is a lysosomal storage disease caused by deficiency of arylsulphatase (ARSB, N-acetylgalactosamine-4-sulphatase), which is required for the degradation of dermatan and chondroitin sulphates [1].

The isolation and characterization of human ARSB cDNA [2,3] and the partial elucidation of the human ARSB gene structure [4] have made possible the identification of molecular defects in ARSB gene mutant alleles. The gene for human ARSB has 209 kb (genome.ucsc.edu), it is comprised of 8 exons, ranging in size from 71 to 885 bp. The nascent polypeptide has 533 amino acids [5]. Approximately 140 mutations have been described and several polymorphisms have been identified in the gene sequence [6-17].

In Northeast Brazil we identified on the county of Monte Santo (52,360 inhabitants, 350 km far from Salvador, capital of the Bahia state) an increased incidence of several genetic disorders (such as Phenilketonuria and Congenital Hypothyroidism), probably due to relative endogamy and isolation (Figure 1). Thirteen cases of MPS VI were identified so far in this county, and it is likely that this frequency could be higher, due to patients who are still undiagnosed or died before a diagnosis was established.



Figure 1. Map of Brazil.

To understand the high frequency of this rare syndrome in Monte Santo, the molecular background of these patients was investigated. The aim of this work was to identify the mutation(s) present on the affected families and to define haplotypes using intragenic SNPs.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Patients

Thirteen patients with MPS VI from Monte Santo (Bahia State, Northeast Brazil), being 9 males and 4 females, were diagnosed based on identification of dermatan sulfate in urine and deficiency of ARSB activity in leucocytes. Informed consent was obtained from the patient's parents. We also analyzed 93 patients from the MPS Brazil Network, as explained later.

2.2. Mutation detection

Genomic DNA was obtained from peripheral blood collected in EDTA using the salting-out precipitation technique [18]. The polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify exons 1–8 of the ARSB gene. PCR amplification were performed in final volumes of

25 μ L with 2 mM MgCl₂, 1mM of each dNTP, 10 pmol of each primer, 1x PCR buffer, 1 U of Taq DNA polymerase (Super-Therm or Invitrogen) and 100–200 ng of genomic DNA. For the amplification of exons 1 to 7, 1.25-2.0 DMSO 100% was added and for exon 1, 2 μ L of 5x Q solution (Qiagen) was added. The reactions were subjected to 5 min of initial denaturation at 94°C, and 30 cycles of denaturation at 94°C for 15-40s, annealing at 45-55°C for 30-60s and elongation at 72°C for 40-60s, with a final extension step at 72°C for 10 min, exon 1 used elongation and final extension at 68°C. The primers used to amplify exons 1 and 7 were described by Isbrandt [14], and the primers used to amplify exons 2-6 and 8 were described by Petry [7]. The PCR products were analyzed in 1,5% agarose gel containing ethidium bromide.

After amplification by PCR, the products were subjected to single-strand conformational polymorphism (SSCP) analysis in order to identify alterations in exons 1, 2, 3, 4, 7 and 8. An aliquot of 15 μ L PCR products was mixed with 5 μ L of loading buffer, the samples were denatured at 95°C for 5 min and were loaded onto 8% polyacrylamide gels (29:1 acrylamide:bis-acrylamide) for exons 2, 3, 4, 7 and 12% polyacrylamide gels for exons 1 and 8. Exons that showed alterations in the SSCP banding pattern were purified with Exosap[®] and sequenced with the Big Dye Terminator kit version 3.1 using an ABI 310 automated sequencer (Applied Biosystems). Exons 5 and 6 were directly sequenced due to the high number of polymorphisms. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) with *Hsp92II* enzyme was used to confirm the mutation found after sequencing in patients and to study this mutation inheritance in relatives. The carrier status was studied in 21 parents using RFLP.

2.3. Haplotype characterization

Haplotype can be defined as a set of alleles located on the same chromosome segment, which tend to be transmitted in block in genealogy. Therefore, the haplotypes marks

chromosome segment, which can be traced through pedigrees and populations, while not disrupted by recombination [19].

We used 10 single nucleotide polymorphisms (SNPs) for haplotype characterization. All SNPs were located in the ARSB gene, being 2 in intronic regions and 8 in exons. PCR amplification was performed as described above. SSCP was the method of choice for IVS3-22t>c, RFLP was used for p.L82L (246G>A) and p.L124L (370C>T) and sequencing for p.G324G (972A>G), p.T356T (1068A>T), p.V358M (1072G>A), p.V376M (1126G>A), IVS5-27a>c, p.S384N (1151G>A) and p.P397P (1191A>G).

3. RESULTS

SSCP analysis of the index case (Figure 2) showed an altered pattern in exon 3 and the p.H178L (533A>T) mutation was detected in homozygosis after sequencing. This mutation abolishes a restriction site for the *Hsp92II* enzyme. The thirteen patients were screened by RFLP confirming the presence of p.H178L mutation in homozygosis (Table I). The entire open reading frame of the ARSB gene and all exon-intron boundaries were analyzed by sequencing in the index case to exclude other possible mutations.

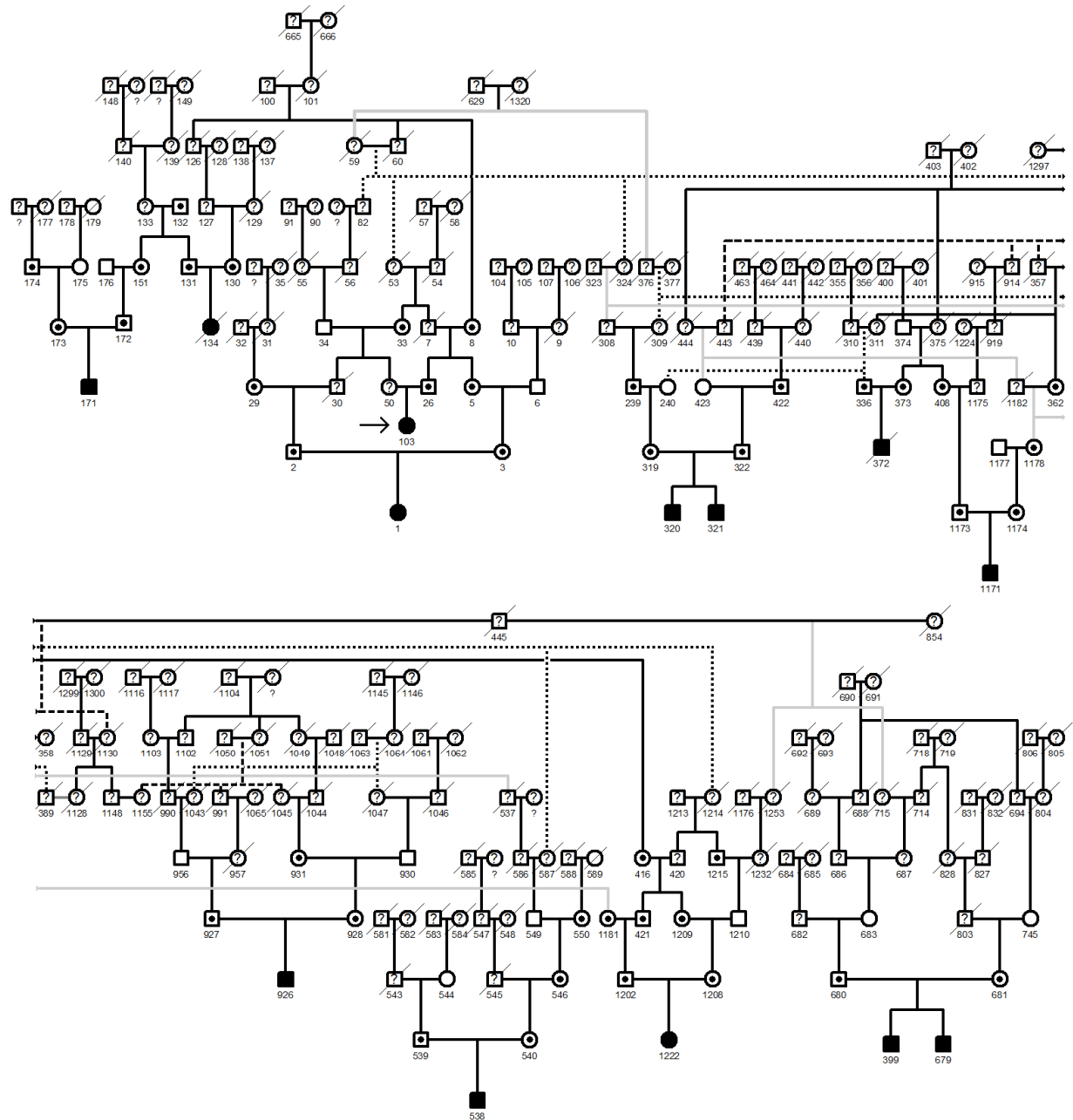


Figure 2. Extended pedigree showing the relationship among MPS VI patients from Monte Santo/Bahia. Symbols in black indicate patients with MPS VI, symbols with question mark indicate individuals without molecular analysis, White symbols indicate normal subjects for the p.H78L mutation and symbols with a dot in the middle indicate individuals heterozygous for the p.H178L mutation [22].

After defining the disease causing mutation in this population, we screened 93 patients from the MPS Brazil Network (a partnership involving many services aiming to improve information on MPS and facilitate access to diagnosis in Brazil) in order to check if this mutation was also present in patients from other regions in Brazil. We found 4 heterozygous who are also included in Table I.

The polymorphisms p.V376M and IVS5-27a>c were present in homozygosis in all patients, and in heterozygosis in all parents and in the four MPS VI patients from the MPS Brazil Network heterozygous for the p.H178L mutation. Polymorphisms p.L82L, p.L124L, IVS3-22t>c, p.G324G, p.T356T, p.V358M, p.S384N and p.P397P were not detected in patients from Monte Santo. Some of these polymorphisms were observed in heterozygosis in parents and in patients screened from the MPS Brazil Network (Table I). The defined haplotype for individuals carrying the mutation was GCTAAGACGA based on the nucleotide changes caused by each SNP (Figure 3).

Table 1. Genotypes of the patients included in the study. 1-13: MPSVI patients from Monte Santo; 14-17: MPS Brazil network patients. Single letters mans that nucleotides are in homozygosis.

	1 ^a	2 ^a	3	4	5	6	7	8	9 ^b	10	11	12	13 ^b	14	15	16 ^c	17 ^c
p.H178L (533A>T)	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T/A	T/A	T/A	T/A
p.L82L (246G>A)	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
p.L124L (370C>T)	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
p.IVS3-22T>C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
p.G324G (972A>G)	A	A	A	A	A	A	A	A	Na	A	A	A	A	A	A	A/G	A/G
p.T356T (1068A>T)	A	A	A	A	A	A	A	A	Na	A	A	A	A	A	A	A	A
p.V358M (1072G>A)	G	G	G	G	G	G	G	G	Na	G	G	G	G	G/A	G	G/A	G/A
p.V376M (1126G>A)	A	A	A	A	A	A	A	A	Na	A	A	A	A	A/G	A/G	A/G	A/G
IVS5-27A>C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C/A	C/A	C/A
p.S384N (1151G>A)	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
p.P397P (1191A>G)	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

^{a, b and c}: siblings; Na: Not analyzed.

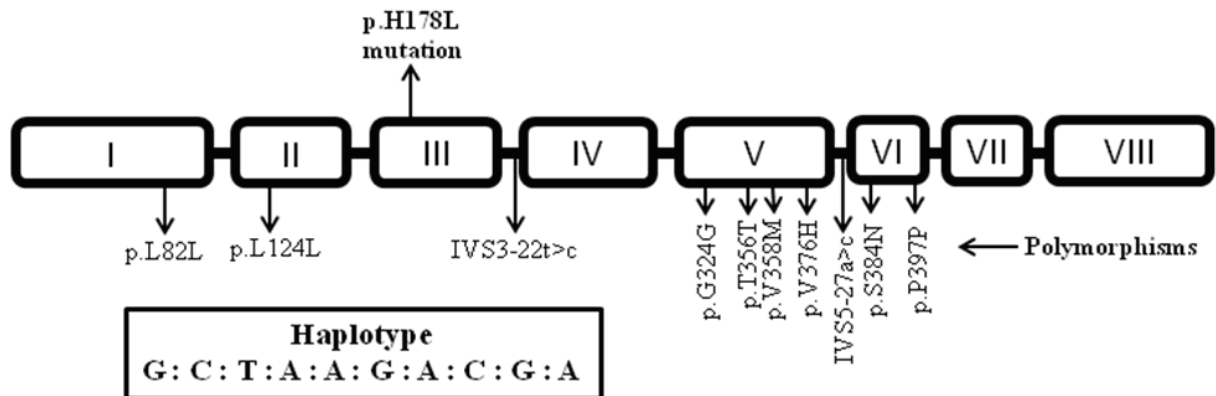


Figure 3. Location of 10 polymorphisms in the ARSB gene identified in this study. The exons are represented by boxes and numbered by roman numerals.

4. DISCUSSION

In this study we identified the p.H178L mutation in a cluster of MPS VI patients from Monte Santo, a county in Bahia state, Northeast Brazil (Figure 1). According to international studies, the incidence of MPS VI ranges from 1 in 43.261 births in Turkish to 1 in 1.505.160 births in Sweden [20]. An incidence for MPS VI in Brazil has not been published yet, but data from MPS Brasil Network show that MPS VI is not as rare as in other countries (Personal communication).

Monte Santo presents a number of MPS VI cases much higher than that estimated by the literature, over 1 in 5.000 live births; this estimate was made based on individual nuclear families (father, mother and son) once there is a high rate of inbreeding in this region. With this prevalence, MPS VI is considered a disease of great impact on the population of Monte Santo. The high inbreeding in this region justifies the high frequency of several genetic diseases such as MPS VI.

The p.H178L mutation results from A to T transition at nucleotide 533 in exon 3 and causes a histidine to leucine substitution in the protein. We performed an in silico analysis for

this mutation using the PolyPhen (*Polymorphism Phenotyping*) software, an automatic tool for prediction of possible impact of an amino acid substitution on the structure and function of a human protein, this variant is predicted to be probably damaging with a PSIC (Position Specific Independent Counts) score difference of 3.402.

In 2007, Karageorgos et al [17] published a study of a mutational analysis in 105 patients, representing about 10% of the world MPS VI population. The sample included 10 patients from Brazil and the p.H178L mutation was found in one patient in heterozygosity. This patient was born in Rio de Janeiro, Southeast Brazil, and also has a brother with MPS VI carrying the same mutation (Table I – 16 and 17). Through screening of this mutation in patients from the MPS Network Brazil, we found two further heterozygous unrelated patients. One from Salvador, capital of Bahia, and one from São Paulo, Southeast Brazil.

To date, 13 polymorphisms have been described in the ARSB gene, being three amino acid substitutions, eight silent transitions and two in intronic regions [13,17,21]. In this study, we analyzed 10 of these polymorphisms and only two were found in the patients from Monte Santo, the p.V376M in exon 5 and the IVS5-27a>c in intron 5, both in homozygosity. The haplotype associated with p.H178L mutation in patients from Monte Santo is shown in figure 3. Patients from the MPS Brazil Network, heterozygous for the p.H178L mutation showed these two polymorphisms in heterozygosity, as well as some of the other polymorphisms tested (Table I).

All patients had typical clinical signs of MPS VI, two patients already died due to disease complications, and ten of the 11 patients started enzyme replacement therapy. Anecdotal reports on early treated patients refer to improved growth pattern and attenuated features, in comparison to the expected outcome on late-treated patients.

Pedigrees of family members showed that all patients have a connection in some generation (Figure 2). The analysis of haplotypes using intragenic polymorphisms along with the pedigrees analysis corroborates with the hypothesis of a founder effect of this allele in this region.

The presence of three unrelated patients from Salvador (northeast), São Paulo and Rio de Janeiro (Southeast), who were found to be heterozygous for the p.H178L mutation, showing the same common haplotype observed in the Monte Santo county patients, suggests a common Brazilian origin for this mutation.

5. CONCLUSIONS

We can conclude that p.H178L mutation, which has so far not been described in other populations, was introduced once in the Monte Santo area and became common on this quite isolated area due to endogamy and consanguinity. The presence of this mutation in homozygosity in all patients who present this autosomal recessive disease supports that a founder effect is a suitable explanation for this finding. Taking into account these results, a comprehensive community genetics program, which could involve education to the public, genetic counseling to the families, newborn screening and appropriate management of the detected cases, should be developed for this area.

6. CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest.

7. ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by institutional (FIPE-HCPA) and Brazilian Institute for Population Medical Genetics (INAGEMP) funds. FMCM is supported by CAPES scholarship. SLS, RG and IVDS receive Research Grants from CNPq.

8. REFERENCES

- [1] E. Neufeld, J. Muenzer, The mucopolysaccharidoses, in: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle (Eds), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, eighth ed., McGraw-Hill, New York, 2001, pp. 3421–3452.
- [2] C. Peters, B. Schmidt, W. Rommerskirch, K. Rupp, M. Zühlendorf, M. Vingron, H.E. Meyer, R. Polhmann, K. von Figura, Phylogenetic conservation of arylsulphatases: cDNA cloning and expression of human arylsulphatase B, *J Biol Chem*, 265 (1990) 3374-3381.
- [3] E.H. Schuchman, C.E. Jackson, R.J. Desnick, Human arylsulfatase B: MOPAC cloning, nucleotide sequence of a full-length cDNA, and regions of amino acid identity with arylsulfatase A and C, *Genomics*, 6 (1990) 149–158.
- [4] S. Modaressi, K. Rupp, K. Von Figura, C. Peters, Structure of the human arylsulfatase B gene, *Biol Chem Hoppe Seyler*, 374 (1993) 327–335.
- [5] T. Kobayashi, K. Honke, T. Jin, S. Gasa, T. Miyazaki, A. Makita, Components and proteolytic processing sites of arylsulfatase B from human placenta, *Biochim Biophys Acta*, 1159 (1992) 243-247.
- [6] HGMD (The Human Gene Mutation Database), <http://www.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/search/>
- [7] M.F.G. Petry, K. Nonemacher, J.C. Sebben, I.V.D. Schwartz, A.C.M. Azevedo, M.G. Burin, A.R. Rezende, C.A. Kim, R. Giugliani, S. Leistner-Segal, Mucopolysaccharidosis type VI: Identification of novel mutations on the arylsulphatase B gene in South American patients, *J Inherit Metab Dis*, 28 (2005) 1027–1034.
- [8] E. Garrido, A. Chabás, M.J. Coll, M. Blanco, C. Domínguez, D. Grinberg, L. Vilageliu, B. Cormand, Identification of the molecular defects in Spanish and Argentinian MPS VI patients including 9 novel mutations, *Molecular Genetics and Metabolism*, 92 (2007) 122-130.
- [9] E Garrido, B Cormand, J.J. Hopwoos, A. Chabás, D. Grinberg, L. Vilageliu, Maroteaux-Lamy syndrome Functional characterization of pathogenic mutations and polymorphisms in the ARSB gene, *Molecular Genetics and Metabolism*, 94 (2008) 305-312.
- [10] S. Saito, K. Ohno, K. Sugawara, H. Sakuraba, Structural and clinical implications of amino acid substitutions in N-acetylgalactosamine-4-sulfatase: Insight into Mucopolysaccharidosis Type VI, *Molecular Genetics and Metabolism*, 93 (2008) 419-425.
- [11] T. Litjens, J.J. Hopwoos, Mucopolysaccharidosis Type VI: Structural and clinical implications of mutations in N-Acetylgalactosamine-4-sulfatase, *Human Mutations*, 18 (2001) 282-295.
- [12] G.R.D. Villani, N. Balzano, P.D. Natale, Two novel mutations of the arylsulfatase B gene in two Italian patients with severe form of Mucopolysaccharidosis, *Human Mutations*, 11 (1998) 410.
- [13] G.R.D. Villani, N. Balzano, D. Vitale, M. Saviano, V. Pavone, P. Di Natale, Maroteaux-Lamy syndrome: five novel mutations and their structural localization, *Biochim Biophys Acta*, 1453 (1999) 185-192.
- [14] D. Isbrandt, G. Arlt, D.A. Brooks, J.J. Hopwoos, K. von Figura, C. Peter, Mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome): six unique arylsulfatase B gene alleles causing variable disease phenotypes, *Am J Hum Genet*, 54 (1994) 454-

- 463.
- [15] D. Isbrandt, J.J. Hopwood, K. von Figura, C. Peter, Two novel frameshift mutations causing premature stop codons in a patient with the severe form of maroteaux-Lamy Syndrome, *Human Mutations*, 7 (1996) 361-363.
 - [16] C.M. Simonaro, E.H. Schuchman, N-acetylgalactosamine-4-sulfatase identification of four new mutations within the conserved sulfatase region causing Mucopolysaccharidosis Type VI, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1272 (1995) 129-132.
 - [17] L. Karageorgos, D.A. Brooks, A. Pollard, et al, Mutational analysis of 105 mucopolysaccharidosis type VI patients, *Human Mutations*, 28 (2007) 897-903.
 - [18] S. Miller, D. Dykes, H. Polesky, A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells, *Nucleic Acids Res*, 16 (1988) 1215.
 - [19] T. Strachan, A.P. Read, *Genética Molecular Humana*, second ed, Porto Alegre, Artmed, 1999.
 - [20] V. Valayannopoulos, H. Nicely, P. Harmatz, S. Turbeville, Mucopolysaccharidosis VI, *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 5 (2010) 5.
 - [21] A. Zanetti, E. Ferraresi, L. Picci, M. Filocamo, R. Parini, C. Rosano, et al, Segregation analysis in a family at risk for the Marateaux-Lamy syndrome conclusively reveals c.1151G>A (p.S384N) as to be a polymorphism, *Eur J Hum Genet*, 17 (2009) 1160-1164.
 - [22] R.L. Bennet, K.A. Steinhaus, S.B. Uhrich, et al, Recommendations for Standardized Human Pedigree Nomenclature, *Journal of Genetic Counseling*, 4 (1995) 267-279.

11.1. Versão em português

ESTUDOS GENÉTICOS EM UM GRUPO DE PACIENTES COM MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO VI NO NORDESTE DO BRASIL.

Fabiana Moura Costa-Motta^{a,b}, Angelina Xavier Acosta^{c,d,e}, Kiyoko Abé-Sandes^{d,f}, Fernanda Bender^{a,b}, Ida Vanessa D. Schwartz^{a,b,g}, Roberto Giugliani^{a,b,c,g}, Sandra Leistner-Segal^{a,b,*}

a – Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas, Porto Alegre, RS, Brasil

b – Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

c – Instituto Nacional de Genética Médica Populacional - INAGEMP, Brasil

d – Laboratório Avançado de Saúde Pública, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, Salvador, BA, Brasil

e – Escola Bahiana de Medicina, UFBA, Salvador, BA, Brasil

f – Universidade do Estado da Bahia, Salvador, BA, Brasil

g – Departamento de Genética, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

* Autor para correspondência: Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350, CEP 90035-903, Porto Alegre, RS, Brasil. e-mail: ssegal@hcpa.ufrgs.br (S. Leistner-Segal).

RESUMO

Mucopolissacaridose tipo VI (MPS VI, Síndrome de Maroteaux-Lamy) é uma doença lisossômica causada pela deficiência de arilsulfatase B. A incidência de MPS VI é muito baixa, geralmente menos de 1 caso para cada 1.000.000 recém-nascidos. No município de Monte Santo (52.360 habitantes), Nordeste do Brasil, foram identificados treze pacientes com MPS VI. O objetivo deste trabalho foi identificar a(s) mutação(ões) presente(s) nestes pacientes e analisar *SNPs* intragênicos para definir um possível haplótipo. Os 13 pacientes com MPS VI apresentavam a mutação p.H178L em homozigose. Todos os pacientes têm o mesmo haplótipo para os *SNPs* intragênicos. Com base em dados atuais, a prevalência de MPS VI nesta região é estimada em 1:5.000 recém-nascidos. Estes resultados, juntamente com a análise de heredogramas, sugerem fortemente um efeito fundador devido a alta frequência da mutação p.H178L nesta área. Isso reforça a necessidade de um programa abrangente de genética comunitária para esta área.

Palavras-chave: Mucopolissacaridose VI; Síndrome de Maroteaux-Lamy; Arilsulfatase B, Efeito fundador; Genética Médica Populacional.

INTRODUÇÃO

Mucopolissacaridose tipo VI (MPS VI; Síndrome de Maroteaux-Lamy; OMIN 253200) é uma doença lisossômica causada pela deficiência de arilsulfatase B (ARSB, N-acetilgalactosamina-4-sulfatase), que é necessária para a degradação do dermatan e condroitin sulfatos [1].

O isolamento e caracterização de cDNA da ARSB humana [2,3] e a elucidação parcial da estrutura do gene ARSB humano [4] tornaram possível a identificação dos defeitos moleculares nos alelos do gene ARSB mutante. O gene ARSB humano tem 209 kb (genome.ucsc.edu), é composto por oito éxons, que variam de 71 à 312 bp. O polipeptídeo dispõe de 533 aminoácidos [5]. Cerca de 140 mutações têm sido descritas e vários polimorfismos foram identificados na sequência do gene [6-17].

No Nordeste do Brasil, foram identificados no município de Monte Santo (52.360 habitantes, 350km distante de Salvador, capital do estado da Bahia) um aumento da incidência de várias doenças genéticas (como fenilcetonúria e hipotireoidismo congênito), provavelmente devido a endogamia familiar e isolamento (Figura 1). Treze casos de MPS VI foram identificados até agora neste município, e é provável que essa frequência seja maior, devido aos pacientes que ainda estão sem diagnóstico ou morreram antes que um diagnóstico fosse estabelecido.



Figura 1 – Mapa do Brasil.

Para entender a alta frequência desta síndrome rara, em Monte Santo, a base molecular destes pacientes foi investigada. O objetivo deste trabalho foi identificar a(s) mutação(ões) presente(s) nas famílias afetadas e definir haplótipos usando polimorfismos de nucleotídeo único (*SNPs*) intragênicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Pacientes

Treze pacientes com MPS VI de Monte Santo (Bahia, nordeste do Brasil), sendo 9 homens e 4 mulheres, foram diagnosticados com base na identificação de dermatam sulfato na urina e deficiência de atividade ARSB em leucócitos. O consentimento informado foi obtido dos pais do paciente. Foram também analisados 93 pacientes da Rede MPS Brasil, como explicado mais adiante.

Detecção da mutação

DNA genômico foi obtido de sangue periférico, coletado em EDTA, utilizando a técnica de precipitação de sais [18]. A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi usada para amplificar os éxons 1 à 8 do gene ARSB. Amplificação por PCR foi realizada com volumes final de 25 μ L com 2 mM MgCl₂, 1 mM de cada dNTP, 10 pmol de cada primer, 1x PCR *buffer*, 1 U de Taq DNA polimerase (Super-Therm ou Invitrogen) e 100-200 ng de DNA genômico. Para a amplificação dos éxons 1 a 7, foi adicionado 1,25-2,0 de DMSO 100% e para o éxon 1, foi adicionado 2 μ L de solução 5x Q (Qiagen). As reações foram submetidas a 5 min de desnaturação inicial à 94°C, 30 ciclos de desnaturação à 94°C por 15-40s, anelamento a 45-55°C por 30-60s e alongamento a 72°C por 40-60s, com uma etapa de extensão final a 72°C por 10 min; o éxon 1 utilizou alongamento e extensão final a 68°C. Os primers utilizados para amplificar os éxons 1 e 7 foram descritos por Isbrandt [14], e os primers utilizados para amplificar os éxons 2-6 e 8 foram descritos por Petry [7]. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1,5% contendo brometo de etídio.

Após a amplificação pela PCR, os produtos foram submetidos a análise por SSCP (single strand polimorfismo conformacional) a fim de identificar alterações nos éxons 1, 2, 3, 4, 7 e 8. Uma alíquota de 15 μ L do produto da PCR foi misturada com 5 μ L de tampão de carregamento, as amostras foram desnaturadas a 95°C por 5 min e foram submetidas a

eletroforese em gel de poliacrilamida 8% (29:1 de acrilamida:bis-acrilamida) para os éxons 2, 3, 4, 7 e 12 e géis de poliacrilamida 12% para os éxons 1 e 8. Os éxons que apresentaram alterações no padrão de bandas no SSCP foram purificados com EXOSAP[®] e sequenciados com o kit *Big Dye Terminator* versão 3.1 usando um sequenciador ABI310 automatizado (*Applied Biosystems*). Os éxons 5 e 6 foram diretamente sequenciados devido ao elevado número de polimorfismos. *Restriction fragment length polymorphism* (RFLP) com a enzima *Hsp92II* foi utilizada para confirmar a mutação encontrada nos pacientes após o sequenciamento e estudar essa mutação nos parentes. O estado de portador foi estudado em 21 pais usando RFLP.

Caracterização do haplótipo

Haplótipo pode ser definido como um conjunto de alelos localizados no mesmo segmento cromossômico, que tendem a ser transmitidos em bloco na genealogia. Portanto, os haplótipos nos segmentos cromossômicos, podem ser acompanhados através de heredogramas e populações, quando não são interrompidos por recombinação [19].

Foram utilizados 10 polimorfismos de nucleotídeo único (*SNPs*) para a caracterização do haplótipo. Todos os *SNPs* estão localizados no gene *ARSB*, sendo 2 em regiões intrônicas e 8 em éxons. Amplificação por PCR foi realizada conforme descrito acima. SSCP foi o método escolhido para IVS3-22t>c, RFLP foi utilizada para p.L82L (246G>A) e p.L124L (370C>T) e, sequenciamento para p.G324G (972A>G), p.T356T (1068A>T), p.V358M (1072G>A), p.V376M (1126G>A), IVS5-27a>c, p.S384N (1151G>A) e p.P397P (1191A>G).

RESULTADOS

A análise de SSCP do caso índice (Figura 2) mostrou um padrão alterado no exon 3 e a mutação p.H178L (c.533A>T) foi detectada em homozigose após sequenciamento. Essa mutação elimina um sítio de restrição para a enzima *Hsp92II*. Os treze pacientes foram triados por RFLP confirmando a presença da mutação p.H178L em homozigose (Tabela 1). Todos os éxons do gene ARSB e todos as regiões éxon-intron foram analisadas por sequenciamento no caso índice para excluir outras possíveis mutações.

Depois de definir a mutação patogênica nessa população, foram analisados 93 pacientes da Rede MPS Brasil (uma parceria envolvendo diversos serviços com o objetivo de melhorar a informação sobre MPS e facilitar o acesso ao diagnóstico no Brasil), a fim de verificar se esta mutação também estava presente em pacientes de outras regiões do Brasil. Encontramos 4 heterozigotos que também estão incluídos na Tabela 1.

Os polimorfismos p.V376M e IVS5-27a>c estavam presentes em homozigose em todos os pacientes, e em heterozigose em todos os pais e nos quatro pacientes da Rede MPS Brasil, heterozigotos para a mutação p.H178L. Os polimorfismos p.L82L, p.L124L, IVS3-22t>c, p.G324G, p.T356T, p.V358M, p.S384N e p.P397P não foram detectados nos pacientes de Monte Santo. Alguns desses polimorfismos foram observados em heterozigose nos pais e nos pacientes triados da Rede MPS Brasil (Tabela 1). O haplótipo definido para os indivíduos portadores da mutação foi GCTAAGACGA com base na mudança de nucleotídeo causada por cada *SNP* (Figura 3).

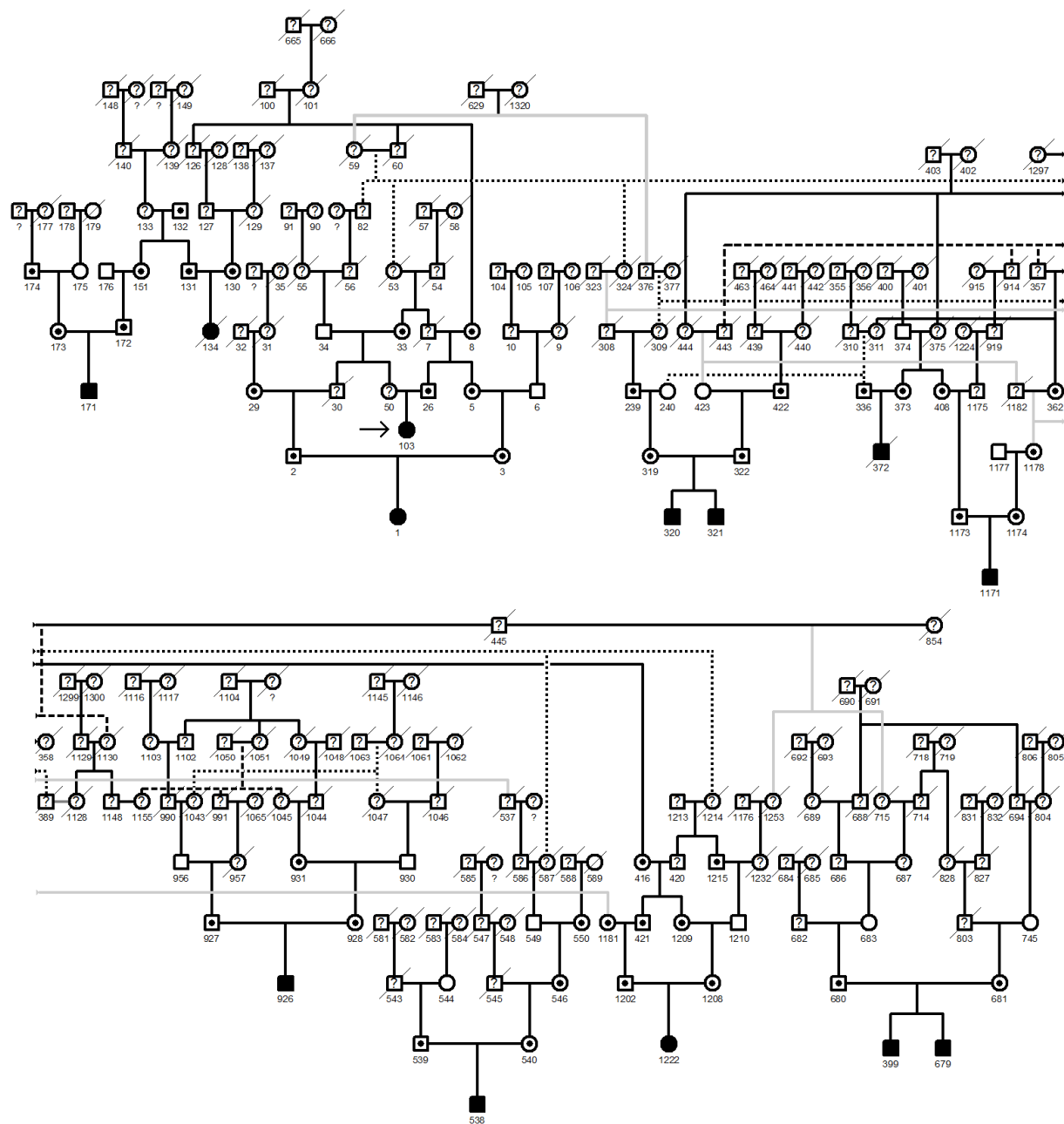


Figura 2 – Heredograma mostrando a relação entre os pacientes com MPS VI de Monte Santo/Bahia. Símbolos em preto indicam os pacientes com MPS VI, símbolos com ponto de interrogação indicam indivíduos sem análise molecular, símbolos brancos indicam indivíduos normais para a mutação p.H178L e símbolos com um ponto no meio indicam indivíduos heterozigotos para a mutação p.H178L [22].

Tabela I. Genótipos dos pacientes incluídos no estudo. 1-13: Pacientes com MPS VI de Monte Santo; 14-17: Pacientes da Rede MPS Brasil. Letras únicas significam que o nucleotídeo está em homozigose.

	1 ^a	2 ^a	3	4	5	6	7	8	9 ^b	10	11	12	13 ^b	14	15	16 ^c	17 ^c
p.H178L (533A>T)	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T/A	T/A	T/A	T/A
p.L82L (246G>A)	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
p.L124L (370C>T)	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
p.IVS3-22T>C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
p.G324G (972A>G)	A	A	A	A	A	A	A	A	Na	A	A	A	A	A	A	A/G	A/G
p.T356T (1068A>T)	A	A	A	A	A	A	A	A	Na	A	A	A	A	A	A	A	A
p.V358M (1072G>A)	G	G	G	G	G	G	G	G	Na	G	G	G	G	G/A	G	G/A	G/A
p.V376M (1126G>A)	A	A	A	A	A	A	A	A	Na	A	A	A	A	A/G	A/G	A/G	A/G
IVS5-27A>C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C/A	C/A	C/A
p.S384N (1151G>A)	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
p.P397P (1191A>G)	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

^{a, b and c}: irmãos; Na: Não analisado. Em negrito, destaca-se a mutação encontrada nos pacientes de Monte Santo.

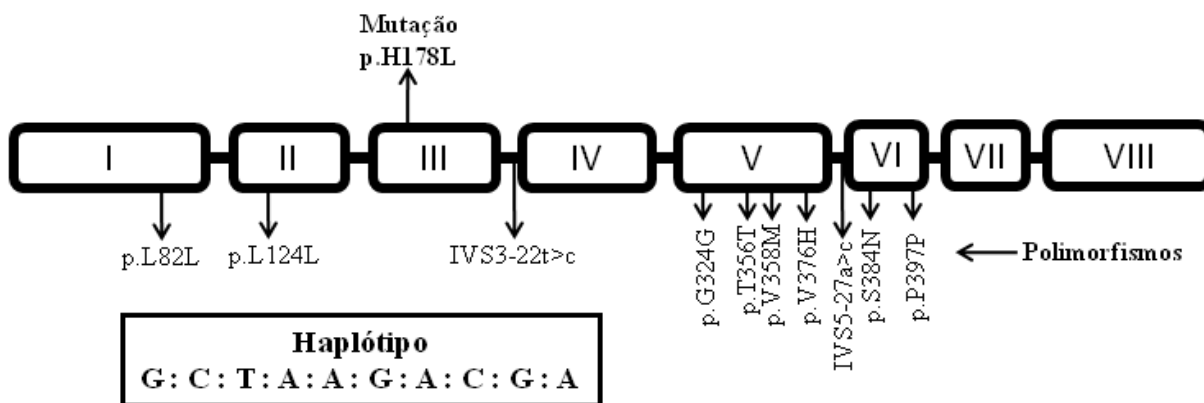


Figura 3 – Localização dos 10 polimorfismos identificados no gene ARSB neste estudo. Os exons estão representados pelos retângulos e numerados por algarismos romanos.

DISCUSSÃO

Neste estudo, identificamos a mutação p.H178L em um grupo de pacientes com MPS VI de Monte Santo, município do estado da Bahia, Nordeste do Brasil (Figura 1). De acordo com estudos internacionais, a incidência de MPS VI varia de 1 em 43.261 nascimentos na Turquia a 1 em 1.505.160 nascimentos na Suécia [20]. Uma incidência de MPS VI no Brasil ainda não foi publicada, mas dados da Rede MPS Brasil mostram que a MPS VI não é tão rara como em outros países (comunicação pessoal).

Monte Santo apresenta um número de casos de MPS VI muito maior do que a estimada pela literatura, mais de 1 em cada 5.000 nascidos vivos; essa estimativa foi feita com base em núcleos familiares individuais (pai, mãe e filho) uma vez que há uma elevada taxa de consanguinidade na região. Com essa prevalência, a MPS VI é considerada uma doença de grande impacto sobre a população de Monte Santo. A alta endogamia nesta região justifica a alta frequência de várias doenças genéticas como a MPS VI.

A mutação p.H178L resulta de uma transição de uma A para T no nucleotídeo 533 do éxon 3 e provoca a substituição de uma histidina por leucina na proteína. Foi realizada uma análise *in silico* para essa mutação utilizando o *software PolyPhen (Polymorphism Phenotyping)*, uma ferramenta para predição de possíveis impactos de uma substituição de

aminoácido na estrutura e função de uma proteína humana, e esta variante é prevista como sendo, provavelmente danosa com um valor de PSIC (*Position Specific Independent Counts*) de 3,402.

Em 2007, Karageorgos e colaboradores [17] publicaram um estudo de análise molecular em 105 pacientes, o que representa cerca de 10% dos pacientes com MPS VI do mundo. A amostra incluiu 10 pacientes do Brasil e a mutação p.H178L foi encontrada em um paciente em heterozigose. Este paciente nasceu no Rio de Janeiro, Sudeste do Brasil, e também tem um irmão com MPS VI carregando a mesma mutação (Tabela 1 - 16 e 17). Através da triagem dessa mutação em pacientes da Rede MPS Brasil, encontramos mais dois pacientes heterozigotos não relacionados. Um de Salvador, capital da Bahia, e um de São Paulo, Sudeste do Brasil.

Até o momento, 13 polimorfismos foram descritos no gene ARSB, sendo três substituições de aminoácidos, oito transições silenciosas e dois em regiões intrônicas [13,17,21]. Neste estudo, foram analisados 10 destes polimorfismos e apenas dois foram encontrados em pacientes do Monte Santo, o p.V376M no éxon 5 e o IVS5-27a>c no intron 5, ambos em homozigose. O haplótipo associado com a mutação p.H178L nos pacientes de Monte Santo é apresentado na figura 3. Os pacientes da Rede MPS Brasil, heterozigotos para a mutação p.H178L, apresentavam esses dois polimorfismos em heterozigose, bem como alguns dos outros polimorfismos testados (Tabela 1).

Todos os pacientes apresentavam sinais clínicos típicos da MPS VI, dois pacientes já morreram devido a complicações da doença e, dez dos 11 pacientes começaram a terapia de reposição enzimática. Publicações com relatos de pacientes tratados precocemente referem-se a uma melhora no padrão de crescimento e características atenuadas, em comparação com os resultados esperados nos pacientes tratados tardiamente.

Heredogramas dos membros das famílias mostraram que todos os pacientes têm uma conexão em alguma geração (Figura 2). A análise de haplótipos utilizando *SNPs*, juntamente

com a análise dos heredogramas corrobora com a hipótese de um efeito fundador deste alelo nesta região.

A presença de três pacientes não relacionados de Salvador (Nordeste), São Paulo e Rio de Janeiro (Sudeste), que são heterozigotos para a mutação p.H178L e apresentam o haplótipo comum observado nos pacientes do município de Monte Santo, sugere uma origem no Brasil para esta mutação.

CONCLUSÕES

Podemos concluir que a mutação p.H178L, que até o momento não foi descrita em outras populações, foi introduzida uma vez em Monte Santo e tornou-se comum nesta área bastante isolada devido à endogamia e consanguinidade. A presença desta mutação em homozigose em todos os pacientes que apresentam essa doença autossômica recessiva confirma que o efeito fundador é uma explicação adequada para este achado. Tendo em conta estes resultados, um abrangente programa comunitário deve ser desenvolvido nesta área, envolvendo educação a população, aconselhamento genético para as famílias, triagem neonatal e manejo adequado dos casos detectados.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram que não existem conflitos de interesse.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pelo FIPE-HCPA e pelo Instituto Brasileiro de Genética Médica Populacional (INAGEMP). FMCM recebeu bolsa da CAPES. SLS, RG e IVDS recebem bolsa de pesquisador do CNPq.

REFERÊNCIAS

- [1] E. Neufeld, J. Muenzer, The mucopolysaccharidoses, in: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, eighth ed., McGraw-Hill, New York, 2001, 3421–3452.
- [2] C. Peters, B. Schmidt, W. Rommerskirch, K. Rupp, M. Zühlendorf, M. Vingron, H.E. Meyer, R. Polhmann, K. von Figura, Phylogenetic conservation of arylsulphatases: cDNA cloning and expression of human arylsulphatase B, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 3374–3381.
- [3] E.H. Schuchman, C.E. Jackson, R.J. Desnick, Human arylsulfatase B: MOPAC cloning, nucleotide sequence of a full-length cDNA, and regions of amino acid identity with arylsulfatase A and C, *Genomics* 6 (1990) 149–158.
- [4] S. Modaressi, K. Rupp, K. Von Figura, C. Peters, Structure of the human arylsulfatase B gene, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 374 (1993) 327–335.
- [5] T. Kobayashi, K. Honke, T. Jin, S. Gasa, T. Miyazaki, A. Makita, Components and proteolytic processing sites of ARSB from human placenta, *Biochim. Biophys. Acta* 1159 (1992) 243–7.
- [6] HGMD (The Human Gene Mutation Database), <http://www.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/search/>.
- [7] M.F.G. Petry, K. Nonemacher, J.C. Sebben, I.V.D. Schwartz, A.C.M. Azevedo, M.G. Burin, A.R. Rezende, C.A. Kim, R. Giugliani, S. Leistner-Segal, Mucopolysaccharidosis type VI: identification of novel mutations on the arylsulphatase B gene in South American patients, *J. Inherit. Metab. Dis.* 28 (2005) 1027–1034.
- [8] E. Garrido, A. Chabás, M.J. Coll, M. Blanco, C. Domínguez, D. Grinberg, L. Vilageliu, B. Cormand, Identification of the molecular defects in Spanish and Argentinian MPS VI patients including 9 novel mutations, *Mol. Genet. Metab.* 92 (2007) 122–130.
- [9] E. Garrido, B. Cormand, J.J. Hopwoos, A. Chabás, D. Grinberg, L. Vilageliu, Maroteaux–Lamy syndrome Functional characterization of pathogenic mutations and polymorphisms in the ARSB gene, *Mol. Genet. Metab.* 94 (2008) 305–312.
- [10] S. Saito, K. Ohno, K. Sugawara, H. Sakuraba, Structural and clinical implications of amino acid substitutions in N-acetylgalactosamine-4-sulfatase: insight into Mucopolysaccharidosis Type VI, *Mol. Genet. Metab.* 93 (2008) 419–425.
- [11] T. Litjens, J.J. Hopwood, Mucopolysaccharidosis Type VI: structural and clinical implications of mutations in N-Acetylgalactosamine-4-sulfatase, *Hum. Mutations* 18 (2001) 282–295.

- [12] G.R.D. Villani, N. Balzano, P.D. Natale, Two novel mutations of the arylsulfatase B gene in two Italian patients with severe form of MPS, *Hum. Mutations* 11 (1998) 410.
- [13] G.R.D. Villani, N. Balzano, D. Vitale, M. Saviano, V. Pavone, P. Di Natale, Maroteaux–Lamy syndrome: five novel mutations and their structural localization, *Biochim. Biophys. Acta* 1453 (1999) 185–192.
- [14] D. Isbrandt, G. Arlt, D.A. Brooks, J.J. Hopwood, K. von Figura, C. Peter, Mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux–Lamy syndrome): six unique arylsulfatase B gene alleles causing variable disease phenotypes, *Am. J. Hum. Genet.* 54 (1994) 454–463.
- [15] D. Isbrandt, J.J. Hopwood, K. von Figura, C. Peter, Two novel frameshift mutations causing premature stop codons in a patient with the severe form of Maroteaux–Lamy Syndrome, *Hum. Mutations* 7 (1996) 361–363.
- [16] C.M. Simonaro, E.H. Schuchman, N-acetylgalactosamine-4-sulfatase identification of four new mutations within the conserved sulfatase region causing Mucopolysaccharidosis Type VI, *Biochim. Biophys. Acta* 1272 (1995) 129–132.
- [17] L. Karageorgos, D.A. Brooks, A. Pollard, et al., Mutational analysis of 105 mucopolysaccharidosis type VI patients, *Hum. Mutations* 28 (2007) 897–903.
- [18] S. Miller, D. Dykes, H. Polesky, A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells, *Nucleic Acids Res.* 16 (1988) 1215.
- [19] T. Strachan, A.P. Read, *Genética Molecular Humana*, second ed. Porto Alegre, Artmed, 1999.
- [20] V. Valayannopoulos, H. Nicely, P. Harmatz, S. Turbeville, Mucopolysaccharidosis VI, *Orphanet J. Rare Dis.* 5 (2010) 5.
- [21] A. Zanetti, E. Ferraresi, L. Picci, M. Filocamo, R. Parini, C. Rosano, et al., Segregation analysis in a family at risk for the Maroteaux–Lamy syndrome conclusively reveals c.1151GNA (p.S384N) as to be a polymorphism, *Eur. J. Hum. Genet.* 17 (2009) 1160–1164.
- [22] R.L. Bennet, K.A. Steinhaus, S.B. Uhrich, et al., Recommendations for standardized human pedigree nomenclature, *J. Genet. Couns.* 4 (1995) 267–279.

12. ARTIGO 2

HIGH FREQUENCY OF HETEROZYGOUS FOR MUCOPOLYSACCHARI-DOSIS TYPE VI IN A CLUSTER FROM NORTHEAST BRAZIL

Fabiana Moura Costa-Motta^{1,2}, Fernanda Bender^{1,2}, Angelina Xavier Acosta^{3,4,5}, Kiyoko Abé-Sandes^{4,6}, Taísa Bonfim Machado⁴, Thaís Ferreira Bomfim⁴, Tatiana Amorim Boa Sorte⁵, Danniell San Dias da Silva⁴, Roberto Giugliani^{1,3,7}, Sandra Leistner-Segal^{1,2}.

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

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

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

4 - Advanced Laboratory of Public Health, Gonçalo Moniz Research Center, FIOCRUZ, Salvador, BA, Brazil;

5 - Bahia School of Medicine, UFBA, Salvador, BA, Brazil;

6 - State University of Bahia, Salvador, BA, Brazil;

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

RUNNING TITLE: HIGH FREQUENCY OF MPS VI HETEROZYGOUS

CORRESPONDING AUTHOR: Prof. Dra. 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

SUMMARY

Mucopolysaccharidosis type VI (Maroteaux-Lamy syndrome, MPS VI) is a lysosomal storage disease caused by deficiency of arylsulphatase B. The incidence of MPS VI is very low, usually less than 1 case for every 1,000,000 newborns, but in a county of Northeast Brazil, the prevalence of MPS VI is estimated at 1:5,000 newborns. Currently, in the county of Monte Santo, 11 nuclear families (13 patients) were described, all bearing the same p.H178L mutation in homozygosis. The aim of this work was to analyze the presence of the p.H178L mutation in relatives of these 13 MPS VI patients from Monte Santo to identify the rate of heterozygous and promote genetic counseling for these families. In four trips to the county of Monte Santo 236 blood samples were collected for molecular analysis of the p.H178L mutation. We found 98 (20.8%) of mutant alleles and 374 (79.2%) of normal alleles, being 41.5% of the sample consisted of heterozygous individuals and 58.5% of homozygous individuals for the normal allele. Pedigree analysis indicates the presence of several individuals with a 50 or 25% chance of being heterozygous. Monte Santo is a small and isolated region and the high inbreeding makes the p.H178L allele remain frequent in this region. Thus, it is clear the need for neonatal screening covering the general population of this region and more studies among MPS VI family members to promote a genetic counseling.

Keywords: Mucopolysaccharidosis, Maroteaux-Lamy syndrome, Arylsulfatase B, p.H178L, Genetic counseling.

INTRODUCTION

Mucopolysaccharidosis type VI (MPS VI; Maroteaux-Lamy syndrome; OMIN 253200) is a lysosomal storage disease caused by deficiency of arylsulphatase B (ARSB, N-acetylgalactosamine-4-sulphatase), which is required for the degradation of dermatan and chondroitin sulphates (Neufeld and Muenzer, 2001).

The isolation and characterization of human ARSB cDNA (Peters et al., 1990; Schuchman et al., 1990) and the partial elucidation of the human ARSB gene structure (Modaressi et al., 1993) have made possible the identification of molecular defects in ARSB gene mutant alleles. The gene for human ARSB has 209 kb (genome.ucsc.edu), it is comprised of 8 exons, ranging in size from 71 to 312 bp. The nascent polypeptide has 533 amino acids (Kobayashi et al., 1992). Approximately 140 mutations have been described and few polymorphisms have been identified in the gene sequence (HGMD; Petry et al., 2005; Garrido et al., 2007, 2008; Saito et al., 2008; Litjens and Hopwood, 2001; Villani et al., 1997; Isbrandt et al., 1994, 1996; Simonaro and Schuchman, 1995; Karageorgos et al., 2007).

MPS VI has no cure, but it has an efficient specific treatment based on enzyme replacement therapy (ERT) (Giugliani et al., 2007). A study demonstrated a clear benefit of early initiation of ERT to slow or prevent the development of significant pathological changes of MPS VI, indicate that the earlier ERT is started, the greater the response (McGill et al., 2010).

In Northeast Brazil has been identified on the county of Monte Santo (52,360 inhabitants, 350 km far from Salvador, capital of the Bahia state) an increased incidence of several genetic disorders, probably due to relative endogamy and isolation. Approximately 80% of the population lives in rural areas. Thirteen cases of MPS VI were identified so far in this county, and it is likely that this frequency could be higher, due to patients who are still undiagnosed or died before a diagnosis was established. The 13 MPS VI patients (three died) were found to be homozygous for the p.H178L mutation. These results, together with

pedigree analyses, strongly suggest that there may be a founder effect that results in the high frequency of p.H178L mutation in this area (Costa-Motta et al., 2011).

Screening for carriers of Mendelian disorders has as main purpose the identification of individuals who are healthy but have a substantial risk (25%) of having affected children. The principles for screening of carriers are: high frequency of carriers, at least in a specific population; availability of a cheap and reliable test with very low rates of false negative and false positive; access to genetic counseling for couples identified as heterozygous; availability of prenatal diagnosis; acceptance and voluntary participation by the target population screened (Nussbaum et al., 2008).

The screening of carriers for MPS VI in Monte Santo is possible because there is only one mutation (p.H178L) in all 13 MPS VI patients analyzed so far, this mutation is easily detected by restriction fragment length polymorphism (RFLP) (Costa Motta et al., 2011). Nowadays, molecular biology techniques can be used as a routine in many laboratories and the application of molecular screening for this mutation in people with a family history is of great importance, allowing genetic counseling and the set up of public health policies in this region.

The aim of this work was to analyze the presence of the p.H178L mutation in relatives of 13 MPS VI patients from Monte Santo to identify the rate of heterozygosis and promote a genetic counseling for these families.

METHODS

Sample

Samples were collected from peripheral blood from all relatives of 11 nuclear families (13 MPS VI patients) from Monte Santo/BA, who agreed to participate in the study. All participants signed an informed consent approved by the Ethics Committee of the Institutions involved in this project. Based on information obtained from family members, it was possible to create a genealogy for the development of pedigrees.

Mutation detection

Genomic DNA was obtained using the salting-out precipitation technique (Miller 1988). The Polymerase Chain Reaction (PCR) was used to amplify exon 3 of the ARSB gene. PCR amplification were performed in final volumes of 25 μ l with 2 mM MgCl₂, 1mM of each dNTP, 10 pmol of each primer, 2.0 μ l of DMSO 100%, 1x PCR buffer, 1 U of Taq DNA polymerase (Super-Therm and Invitrogen) and 100–200 ng of genomic DNA. The reaction were subjected to 5 min of initial denaturation at 94°C, and 30 cycles of denaturation at 94°C for 40s, annealing at 47°C for 40s and elongation at 72°C for 40s, with a final extension step at 72°C for 10 min. The primers used to amplify the exon were described by Petry (2005). The PCR products were analyzed in 1.5% agarose gel containing ethidium bromide.

After amplification by PCR, the products were subjected to Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) with *Hsp92II* enzyme. Restriction enzyme incubations were set for 30 μ l reactions with 3 μ l of 10x buffer, 0,5 μ l of enzyme (5U), and 10-20 μ l of PCR product (depending on the intensity of the band after amplification). Milli-Q water was used to make up the rest of the volume for the reaction. Incubations were carried out overnight at 37°C. Fragments were visualized in a 3% agarose gel containing ethidium bromide.

Pedigrees

With the data collected for the construction of the genealogy connecting MPS VI patients from Monte Santo, it was possible the construction of pedigrees using the program GenoPro[®] 2011 (version 2.5.3.2), including all samples that were collected. To facilitate data interpretation and taking into account the close relationship of some index cases, the 11 nuclear families (13 MPS VI patients) were grouped into nine pedigrees.

In all pedigrees, the symbols in black were analyzed with RFLP and individuals who have gray symbols were not analyzed. Individuals with symbols completely filled are MPS VI patients and those who have a dot within the symbol are heterozygous for the p.H178L allele.

RESULTS

Since 2006, the team involved in this research made more than 6 trips to the county of Monte Santo, in order to make the construction of the genealogy, samples collection, delivery of individual results (genetic counseling) and workshops for the local population. In every trip, blood samples were collected from relatives to confirm the presence of the p.H178L allele in heterozygosis or to identify individuals with a substantial risk of being carriers, as well as their partners and children when they were older than 18 years.

In total, during these trips we collected 236 blood samples for molecular analysis of mutation p.H178L. We found 98 (20.8%) of mutant alleles and 374 (79.2%) of normal alleles, being 41.5% of the sample consisted of heterozygous individuals and 58.5% of homozygous individuals for the normal allele.

With the data collected for the construction of the genealogy connecting MPS VI patients from Monte Santo, it was possible to record 1,455 individuals based on information provided by family members. Many of these individuals were included in the pedigrees even if the molecular analysis was not performed.

Table 1 - Data regarding individuals represented into each of the 9 pedigrees, separated by nuclear families.

Nuclear Family	Figure	N° of individuals	MPS VI patients	N° of Subjects with molecular analysis	N° of Heterozygous for the p.H178L
1	1a	50	2*	22	11
2	1b	62	1	33	13
3	1c	37	1	20	11
4	1d	55	1	24	10
5	1e	36	1	20	9
6	1f	48	1	17	8
7	2a	125	2*	52	15
8 and 9	2b	67	2 [#]	21	11
10 and 11	2c	64	2 [#]	33	11

* siblings; [#] close relatives

Nuclear Family 1 (Figure 1a)

It was reported by relatives the presence of another individual with MPS VI (n°488 - Figure 1a), but this cousin was already deceased at the beginning of the study, so it was not possible to perform molecular examination and no material was collected from parents, as they live in São Paulo, state of southeast Brazil, far from Monte Santo. This couple has two other children (n°489 and 490 - Figure 1a) that also live in São Paulo and if parental heterozygosity is confirmed they have 50% substantial risk of being carriers of the p.H178L allele.

Some individuals in this family could not be analyzed (n°237, 351, 353, 494 and 1388 - Figure 1a), because they had less than 18 years at the time of sample collection, and some of these have 25% chance of being heterozygous for the p.H178L allele.

Some individuals who were not analyzed but may have an important role in the maintenance of the mutant allele in this region were not added in the pedigree due to lack of space. Some examples: the presence of 12 additional siblings of the individual n°422 and 8 siblings of the individual n°239, both in Figure 1a, which are heterozygous for the p.H178L allele.

Nuclear Family 2 (Figure 1b)

The individual n°240 appears in the pedigree of nuclear family 1 as a grandmother of the MPS VI brothers (n°320 and 321 - Figure 1a) and in the pedigree of the nuclear family 2 as a paternal aunt of the MPS VI patients (n°372 - Figure 1b).

It was reported by relatives the presence of six MPS VI individuals (n°344, 345, 365, 367, 905 and 906 - Figure 1b) who were already deceased at the beginning of the study, thus molecular analysis was not possible in these cases. We collected material from two couples (n°335, 366, 407 and 898 - Figure 1b), parents of these individuals reported as having MPS VI and heterozygosity was confirmed.

Some individuals in this family, who have a 50% chance of being heterozygous for the p.H178L allele, could not be analyzed (n°368, 899, 902 and 903 - Figure 1b), as they live in São Paulo. In the pedigree of Figure 1b we did not add some individuals who have not been analyzed, for example, the presence of seven additional siblings of individual n°375 (probably heterozygous) and three siblings of individual n°898 (heterozygous for p.H178L the allele).

Nuclear Family 3 (Figure 1c)

The individual n°408 appears in the pedigree of the nuclear family 2 as a maternal aunt of the MPS VI patient (n°372 - Figure 1b) and in the pedigree of the nuclear family 3 as a grandmother of MPS VI patients (n°1171 - Figure 1c). The individual n°362 of figure 1c is sister of the individual n°311 of the family 1b, and they have two brothers that were not included in the pedigrees, with a substantial risk (25%) of being heterozygous. Some individuals in this family could not be analyzed because they live in São Paulo, (n°1188, 1248 and 1252 - Figure 1c).

Nuclear Family 4 (Figure 1d)

The individual n°1181 appears in the pedigree of the nuclear family 4 as a grandmother of the MPS VI patient (n°1222 - Figure 1d) and in the pedigree of the nuclear family 3 as grandmother of the MPS VI patient (n°1171 - Figure 1c). The individual n°1374 appears in the pedigree of the nuclear family 4 and in the pedigree of the nuclear family 1 as daughter of the MPS VI patient aunt (n°320 - Figure 1a).

It was reported by relatives the presence of four more MPS VI individuals (n°1205, 1206, 1389 and 1390 - Figure 1d), but these individuals were already deceased at the beginning of the study, thus molecular analysis was not performed. We collected material from 3 parents of these individuals (n°416, 421 and 1181 - Figure 1d) and heterozygosity was confirmed.

The individual n°1260 in this family could not be analyzed because she lives in Feira de Santana, another city far from Monte Santo. She has 25% chance of being heterozygous for the p.H178L allele. Of the eleven children of the individual n°1215 (heterozygous for p.H178L allele), ten were not present at the time of sample collection, one of them (n°1210, normal for p.H178L allele) is the maternal grandfather of MPS VI patient n°1222 and another son has a heterozygous daughter.

Nuclear Family 5 (Figure 1e)

One individual in this family could not be analyzed (n°541 - Figure 1e), because they had less than 18 years at the time of collection, he has 50% chance of being heterozygous for the p.H178L allele. Some individuals who were not added in this pedigree due to lack of space or because they were not analyzed, but may have an important role in the maintenance of the mutant allele, are the additional 9 siblings of individual n°550 in Figure 1e, which is heterozygous for the p.H178L allele.

Nuclear Family 6 (Figure 1f)

This family has many individuals with 25% chance of being heterozygous that could not be analyzed because they live elsewhere (n°959 – Figure 1f) or because they not present at the time of material collection (n°932, 933, 934, 937, 961, 962, 963, 964, 1067, 1068, 1069, 1072, 1073 and 1075 – Figure 1f). Similarly, it was not possible to collect material from the children of couple n°1066 and n°1076, and they have 50% chance of being heterozygous for the mutant allele. The grandmother (n°957) of the MPS VI patient (n°926) has another 7 siblings who may be heterozygous for the p.H178L allele.

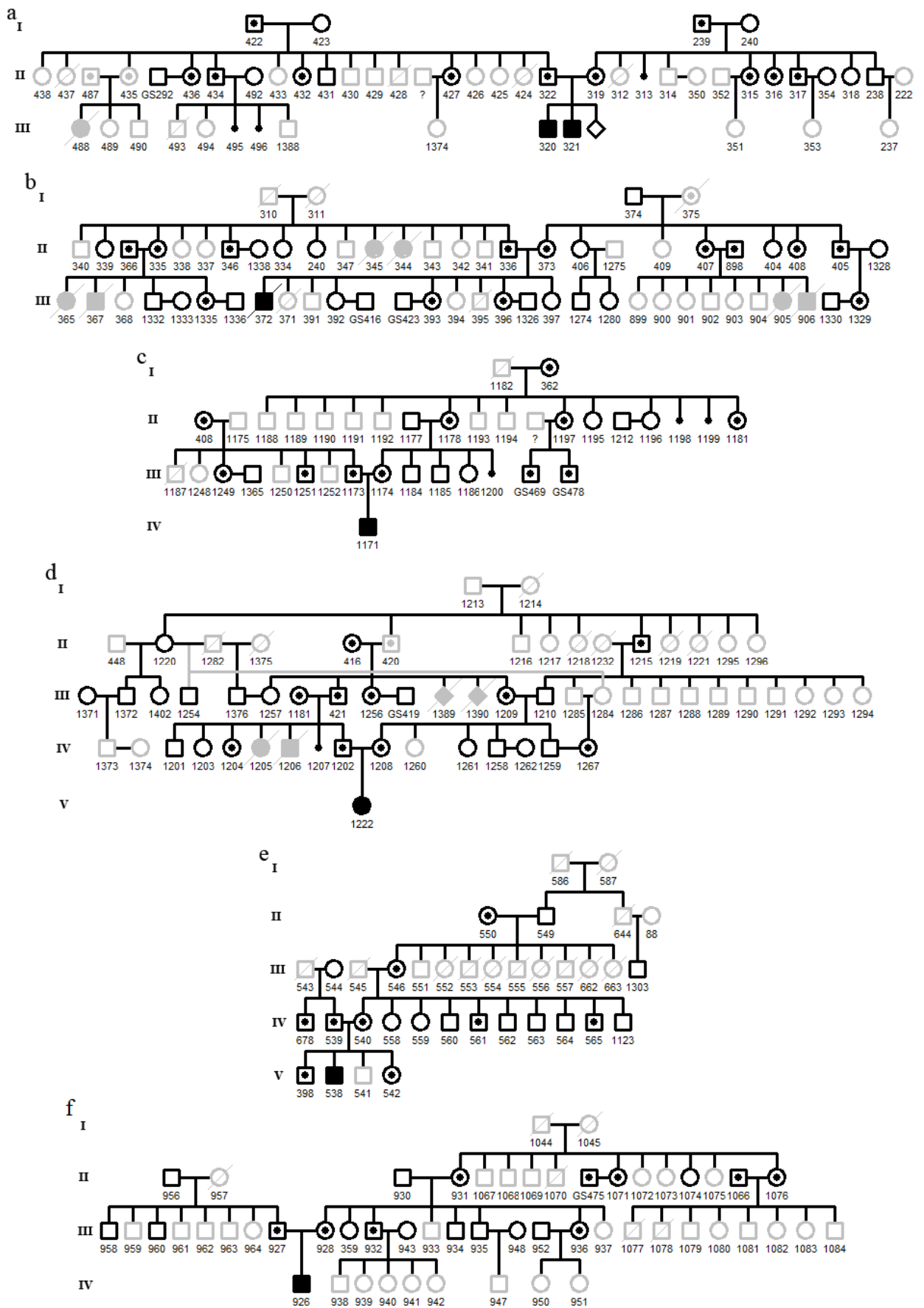


Figure 1 - Pedigree of nuclear families. a: Nuclear family 1; b: Nuclear family 2; c: Nuclear family 3; d: Nuclear family 4; e: Nuclear family 5 and f: Nuclear family 6.

Nuclear Family 7 (Figure 2a)

It was reported by relatives the presence of nine additional MPS VI individuals (n°216, 796, 797, 798, 799, 891, 892, 896 and 897 - Figure 2a), but these individuals were already deceased at the beginning of the study, thus no molecular analysis was possible. We collected material from one couple (n°794 and 841 - Figure 2a), parents of five individuals reported as having MPS VI and heterozygosity was confirmed, suggesting that they could give birth to MPS VI patients. Individuals n°796, 797 and 798 died at 24, 12 and 18 years, respectively. Regarding the couple n°800 and 887, we did not obtain enough data. Relatives reported that they had eleven children, one with MPS VI (n°799 - Figure 2a).

Nuclear Family 8 (Figure 2b)

Many of the relatives of this nuclear family could not be analyzed because they live in São Paulo (n°12, 14, 22, 24, 39, 51, 52, 68 and 98 - Figure 2b). The brother, a cousin and a paternal uncle (n° 04, 1302 and 41- Figure 8) of the MPS VI patient n° 01, who have 25% chance of being heterozygous, could not be analyzed because in the moment of the sample collection they had less than 18 years.

Some individuals who were not analyzed and were not added in the pedigree due to lack of space are 6 siblings of the individual n°29 and 8 siblings of the individual n°08, both in Figure 2b, which are heterozygous for the p.H178L allele. Thus, these 14 individuals who are not represented in the pedigree have a 25% chance of being heterozygous.

Nuclear Family 9 (Figure 2c)

Ancestry of individual n°132 to identify siblings that may be heterozygous was not informed. Of the eight living children of couple n°244 and n°252, only one was aged over 18 years and was not available at the time of sample collection. The children of couple n°221 and

n°236 were under 18 years (n°234 and 235 – Figure 2c), so it was not possible to collect sample for molecular analysis.

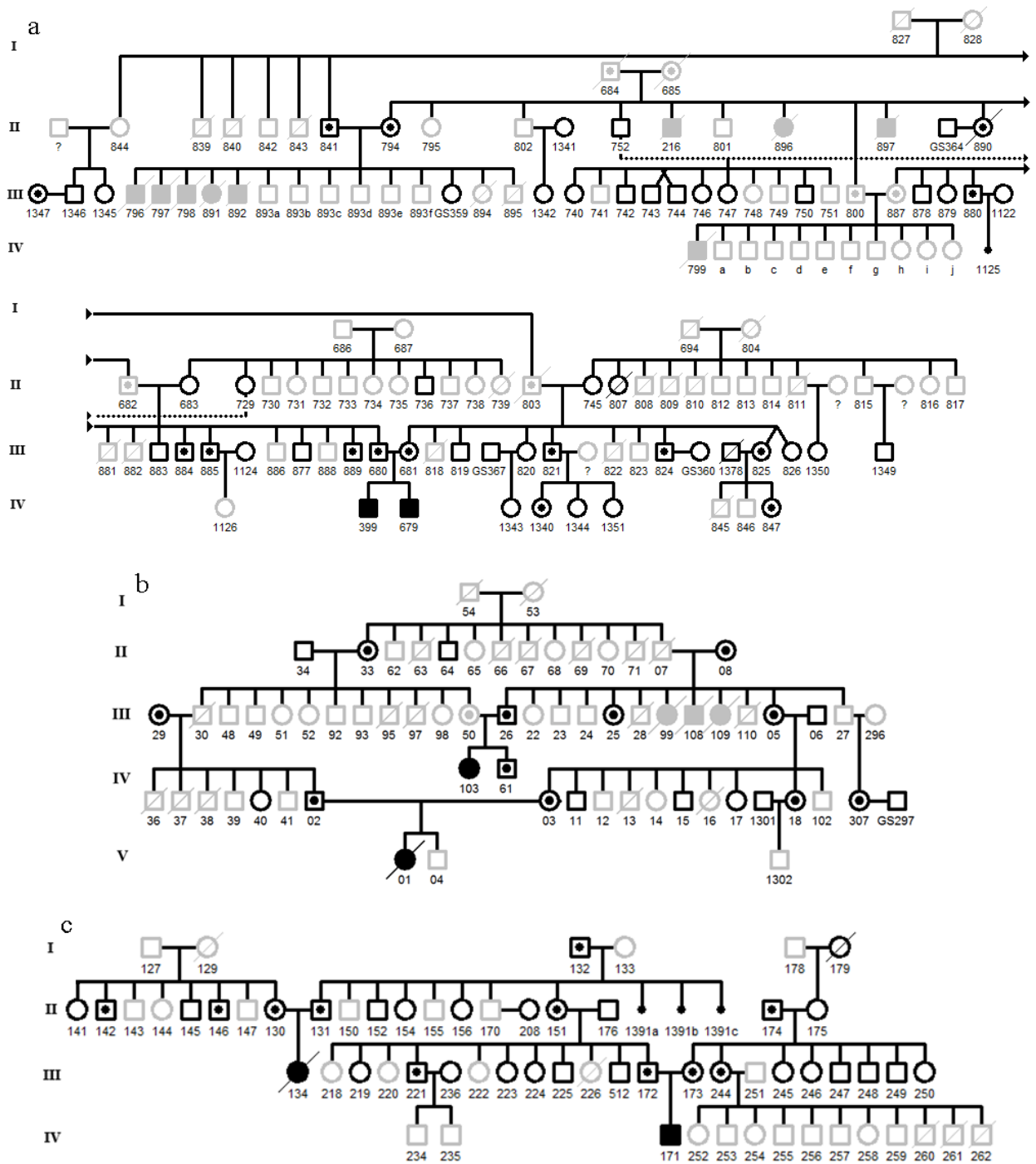


Figure 2 - Pedigree of nuclear families. a: Nuclear family 7; b: Nuclear family 8 and c: Nuclear family 9.

DISCUSSION

According to international studies, the incidence of MPS VI ranges from 1 in 43,261 births in Turkish to 1 in 1,505,160 births in Sweden (Valayannopoulos et al., 2010). An incidence for MPS VI in Brazil has not been published yet, but data from the MPS Brazil Network shows that MPS VI is not as rare as in other countries (personal communication). Monte Santo presents a number of MPS VI cases much higher than that estimated by the literature, over 1 in 5,000 live births.

In this study we performed molecular analysis in relatives of 13 MPS VI patients, from Monte Santo, a county in Bahia state, northeast Brazil. The mutation detected in all patients was p.H178L in homozygosis (Costa-Motta et al., 2011), this made possible the direct analysis by RFLP in 234 relatives. Of these total, 98 (42%) were heterozygous for the mutant allele.

For every trip made to Monte Santo to deliver of reports with the molecular results, new individuals with a 25% chance of being heterozygous were added to the genealogy, and when possible, material was collected for molecular analysis. Pedigree analysis indicates the presence of many individuals with a 50% and 25% chance of being heterozygous. Several of these could not be analyzed, because they had less than 18 years. The parents of these individuals were informed that when they complete 18 years they could request molecular analysis to our research group. This also applies to any individual or couple of families that had a chance to be carriers.

At baseline, patients had to travel weekly to Salvador, capital of Bahia 350 km far from the county of Monte Santo, to receive infusions of ERT. In April 2011, an ERT center was inaugurated at the municipal hospital of Monte Santo, where local doctors and nurses have been trained and are often accompanied by the responsible medical geneticist. The implementation of this treatment center for patients with MPS VI in the region reinforces the importance of screening among family members to detect possible heterozygous couples with

a chance of having children affected with MPS VI, who could benefit for starting treatment as early as possible.

Further analysis involving the general population of Monte Santo, such as a neonatal screening, should be performed due to high rate of heterozygotes (42%) found among the relatives of these 11 nuclear families.

The fact that Monte Santo is a small and isolated region with high inbreeding justifies the occurrence of several genetic diseases with high frequency as in the case of MPS VI. So, we conclude that due to the high prevalence of MPS VI in Monte Santo, with great impact on these population, this region need more studies among MPS VI family members and the general population to promote a genetic counseling and early treatment.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by institutional (FIPE-HCPA) and Brazilian Institute for Population Medical Genetics (INAGEMP) funds. FMCM is supported by CAPES scholarship. SLS and RG receive Research Grants from CNPq.

REFERENCES

- Costa-Motta FMM, Acosta AX, Abé-Sandes K, Bender F, Schwartz IVD, Giugliani R, Leistner-Segal S, 2011. Genetic studies in a cluster of mucopolysaccharidosis type VI patients in Northeast Brazil. *Molecular Genetics and Metabolism*, Available online, 19 September 2011.
- Garrido E, Cormand B, Hopwoos JJ, Chabás A, Grinberg D, Vilageliu L, 2008. Maroteaux-Lamy syndrome Functional characterization of pathogenic mutations and polymorphisms in the ARSB gene. *Molecular Genetics and Metabolism*, 94(3):305-312.
- Garrido E, Chabás A, Coll MJ, Blanco M, Domínguez C, Grinberg D, Vilageliu L, Cormand B, 2007. Identification of the molecular defects in Spanish and Argentinian MPS VI patients, including 9 novel mutations. *Molecular Genetics and Metabolism*, 92:122-130.
- Giugliani R, Harmatz P, Wraith JE, 2007. Management Guidelines for Mucopolysaccharidosis VI. *Pediatrics*, 120:405-418.
- HGMD – The Human Gene Mutation Database (<http://www.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/search/>).
- Isbrandt D, Arlt G, Brooks DA, Hopwoos JJ, von Figura K, Peter C, 1994. Mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome): six unique arylsulfatase B gene alleles causing variable disease phenotypes. *Am J Hum Genet*, 54:454-463.
- Isbrandt D, Hopwoos JJ, von Figura K, Peter C, 1996. Two novel frameshift mutations causing premature stop codons in a patient with the severe form of maroteaux-Lamy Syndrome. *Human Mutations*, 7:361-363.
- Karageorgos L, Brooks DA, Pollard A, *et al.*, 2007. Mutational analysis of 105 mucopolysaccharidosis type VI patients. *Human Mutations*, 28(9):897-903
- Kobayashi T, Honke K, Jin T, Gasa S, Miyazaki T, and Makita A (1992). *Biochim Biophys Acta*, 1159, 243-247.
- Litjens T, Hopwood JJ, 2001. Mucopolysaccharidosis Type VI: Structural and clinical implications of mutations in N-Acetylgalactosamine-4-sulfatase. *Human Mutations*, 18:282-95.
- McGill JJ, Inwood AC, Coman DJ, Lipke ML, de Lore D, Swiedler SJ, Hopwood JJ, 2010. Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis VI from 8 weeks of age - a sibling control study. *Clin Genet*, 77(5):492-498.

- Miller S, Dykes D, Polesky H, 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*; 16:1215.
- Modaressi S, Rupp K, Von Figura K, Peters C, 1993. Structure of the human arylsulfatase B gene. *Biol Chem Hoppe Seyler*; 374:327–35.
- Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF, 2008. Thompson & Thompson. Genética médica, 7ªed.
- Neufeld E, Muenzer J, 2001. The mucopolysaccharidoses. In: Scriver C, Beaudet A, Valle D, Sly W, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8th ed. New York, NY: McGraw-Hill; 3421–3452.
- Peters C, Schmidt B, Rommerskirch W, Rupp K, Zühlendorf M, Vingron M, Meyer HE, Polhmann R, von Figura K, 1990. Phylogenetic conservation of arylsulphatases: cDNA cloning and expression of human arylsulphatase B. *J Biol Chem*, 265:3374-3381.
- Petry MFG, Nonemacher K, Sebben JC, Schwartz IVD, Azevedo ACM, Burin MG, Rezende AR, Kim CA, Giugliani R, Leistner-Segal S, 2005. Mucopolysaccharidosis type VI: Identification of novel mutations on the arylsulphatase B gene in South American patients. *J Inherit Metab Dis*, 28:1027–1034.
- Saito S, Ohno K, Sugawara K, Sakuraba H, 2008. Structural and clinical implications of amino acid substitutions in N-acetylgalactosamine-4-sulfatase: Insight into Mucopolysaccharidosis Type VI. *Molecular Genetics and Metabolism*, 93:419-425.
- Schuchman EH, Jackson CE, Desnick RJ, 1990. Human arylsulfatase B: MOPAC cloning, nucleotide sequence of a full-length cDNA, and regions of amino acid identity with arylsulfatase A and C. *Genomics*; 6:149–58.
- Simonaro CM, Schuchman EH, 1995. N-acetylgalactosamine-4-sulfatase identification of four new mutations within the conserved sulfatase region causing Mucopolysaccharidosis Type VI. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1272:129-132.
- Valayannopoulos V, Nicely H, Harnatz P, Turbeville S, 2010. Mucopolysaccharidosis VI. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 5:5.
- Villani GRD, Balzano N, Natale PD, 1997. Two novel mutations of the arylsulfatase B gene in two Italian patients with severe form of Mucopolysaccharidosis. *Human Mutations*, 11(5):410.

12.1. Versão em português

FREQUÊNCIA ELEVADA DE HETEROZIGOTOS PARA MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO VI EM UM ISOLADO DO NORDESTE DO BRASIL

Fabiana Moura Costa-Motta^{1,2}, Fernanda Bender^{1,2}, Angelina Xavier Acosta^{3,4,5}, Kiyoko Abé-Sandes^{4,6}, Taísa Bonfim Machado⁴, Thaís Ferreira Bomfim⁴, Tatiana Amorim Boa Sorte⁵, Danniell San Dias da Silva⁴, Roberto Giugliani^{1,3,7}, Sandra Leistner-Segal^{1,2,*}.

1 - Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas, Porto Alegre, RS, Brasil;

2 - Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil;

3 - Instituto Nacional de Genética Médica Populacional – INAGEMP, Brasil;

4 - Laboratório Avançado de Saúde Pública, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, Salvador, BA, Brasil;

5 - Escola Baiana de Medicina, UFBA, Salvador, BA, Brasil;

6 - Universidade Estadual da Bahia, Salvador, BA, Brasil;

7 - Departamento de Genética, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

TÍTULO RESUMIDO: FREQUÊNCIA ELEVADA DE HETEROZIGOTOS COM MPS VI

* **AUTOR PARA CORRESPONDÊNCIA:** Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350, CEP 90035-903, Porto Alegre, RS, Brasil. e-mail: ssegal@hcpa.ufrgs.br (S. Leistner-Segal).

RESUMO

Mucopolissacaridose tipo VI (Síndrome de Maroteaux-Lamy, MPS VI) é uma doença de depósito lisossômico causada pela deficiência da enzima arilsulfatase B. A incidência de MPS VI é muito baixa, geralmente menos de 1 caso para cada 1.000.000 recém-nascidos, mas em um município do Nordeste do Brasil, a prevalência de MPS VI é estimada em 1:5.000 recém-nascidos. Atualmente, no município de Monte Santo, 11 núcleos familiares (13 pacientes) foram descritos, todos com a mesma mutação em homozigose p.H178L. O objetivo deste trabalho foi analisar a presença da mutação p.H178L em familiares desses 13 pacientes com MPS VI de Monte Santo para identificar a taxa de heterozigotos e promover o aconselhamento genético para estas famílias. Em quatro viagens realizadas ao município de Monte Santo, 236 amostras de sangue foram coletadas para análise molecular da mutação p.H178L. Encontramos 98 (20,8%) alelos mutantes e 374 (79,2%) alelos normais, sendo 41,5% da amostra constituída de indivíduos heterozigotos e 58,5% de indivíduos homozigotos para o alelo normal. Análises dos heredogramas indicam a presença de vários indivíduos com chance de 50% ou 25% de serem heterozigotos. Monte Santo é uma região pequena, isolada e com alta taxa de endogamia, fazendo com que o alelo p.H178L permaneça frequente nesta região. Assim, fica clara a necessidade de uma triagem neonatal abrangendo a população geral da região e mais estudos entre os membros das famílias com MPS VI para promover um aconselhamento genético.

Palavras-chave: Mucopolissacaridose, Síndrome de Maroteaux-Lamy, Arilsulfatase B, p.H178L, Aconselhamento Genético.

INTRODUÇÃO

Mucopolissacaridose tipo VI (MPS VI; Síndrome de Maroteaux-Lamy; OMIM 253200) é uma doença de depósito lisossômico causada pela deficiência da enzima arilsulfatase B (ARSB, N-acetilgalactosamina-4-sulfatase), que é necessária para a degradação do dermatan e condroitin sulfatos (Neufeld and Muenzer, 2001).

O isolamento e caracterização de cDNA da ARSB humana (Peters *et al.*, 1990; Schuchman *et al.*, 1990) e a elucidação parcial da estrutura do gene ARSB humano (Modaressi *et al.*, 1993) tornaram possível a identificação dos defeitos moleculares nos alelos do gene ARSB mutante. O gene para ARSB humano tem 209 kb (genome.ucsc.edu), é composta por oito éxons, que variam de 71 à 312 bp. O polipeptídeo dispõe de 533 aminoácidos (Kobayashi *et al.*, 1992). Cerca de 140 mutações têm sido descritas e vários polimorfismos foram identificados na sequência do gene (HGMD; Petry *et al.*, 2005; Garrido *et al.*, 2007, 2008; Saito *et al.*, 2008; Litjens and Hopwood, 2001; Villani *et al.*, 1997; Isbrandt *et al.*, 1994, 1996; Simonaro and Schuchman, 1995; Karageorgos *et al.*, 2007).

A MPS VI não tem cura, mas possui um tratamento específico e eficiente baseado na terapia de reposição enzimática (TRE) (Giugliani *et al.*, 2007). Um estudo demonstrou um benefício claro do início precoce da TRE para retardar ou prevenir o desenvolvimento de significativas alterações patológicas da MPS VI, indicando que quanto antes for iniciada a TRE, melhor será a resposta (McGill *et al.*, 2010).

No Nordeste do Brasil, foi identificado no município de Monte Santo (52.360 habitantes, 350 km distante de Salvador, capital do estado da Bahia) um aumento da incidência de várias doenças genéticas, provavelmente devido à endogamia familiar e ao isolamento. Aproximadamente 80% da população vivem em áreas rurais. Treze casos de MPS VI foram identificados até o momento neste município, e é provável que essa frequência seja maior, devido aos pacientes que ainda estão sem diagnóstico ou morreram antes de um diagnóstico ter sido estabelecido. Nos 13 pacientes com MPS VI (três falecidos) foi

encontrada a mutação p.H178L em homozigose. Esse resultado, juntamente com análises dos heredogramas, sugere fortemente que pode ter ocorrido um efeito fundador que resultou na alta frequência da mutação p.H178L nesta área (Costa-Motta *et al.*, 2011).

A triagem de portadores para distúrbios mendelianos tem como objetivo principal a identificação de indivíduos que são saudáveis, mas têm um risco substancial (25%) de terem filhos afetados. Os princípios para essa triagem são: alta frequência de portadores, pelo menos em uma população específica; disponibilidade de um teste barato e confiável, com taxas baixas de falsos negativos e falsos positivos; acesso ao aconselhamento genético para casais identificados como heterozigotos; disponibilidade de diagnóstico pré-natal; a aceitação e a participação voluntária da população-alvo selecionada (Nussbaum *et al.*, 2008).

A triagem de portadores para MPS VI em Monte Santo é possível porque existe apenas uma mutação (p.H178L) em todos os 13 pacientes MPS VI analisados até o momento e a mesma pode ser facilmente detectada pela técnica de restrição enzimática (RFLP-*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Costa-Motta *et al.*, 2011). Hoje em dia, técnicas de biologia molecular podem ser usadas como rotina em muitos laboratórios e a aplicação da triagem molecular para esta mutação em pessoas com história familiar é de grande importância, permitindo o aconselhamento genético e o estabelecimento de políticas de saúde pública nesta região.

O objetivo deste trabalho foi analisar a presença da mutação p.H178L nos familiares de 13 pacientes com MPS VI de Monte Santo/Ba para identificar a taxa de heterozigose e promover um aconselhamento genético para essas famílias.

MÉTODOS

Amostra

Foram coletadas amostras de sangue periférico de todos os parentes dos 11 núcleos familiares (13 pacientes com MPS VI) de Monte Santo/BA, que concordaram em participar do estudo. Todos os participantes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética das instituições envolvidas neste projeto. Com base em informações obtidas pelos familiares, foi possível criar uma genealogia para o desenvolvimento de heredogramas.

Análise Molecular

DNA genômico foi obtido usando a técnica de precipitação de sais (Miller, 1988). A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi utilizada para amplificar o éxon 3 do gene ARSB. Amplificação por PCR foi realizada com volume final de 25 μ L, com 2 mM $MgCl_2$, 1mM de cada dNTP, 10 pmol de cada primer, 2,0 μ L de DMSO 100%, tampão 1x, 1 U de Taq DNA polimerase (Super-Therm e Invitrogen) e 100-200 ng de DNA genômico. A reação foi submetida a 5 min de desnaturação inicial a 94°C e 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 40s, anelamento a 47°C por 40s e alongamento a 72°C durante 40s, com uma etapa de extensão final a 72°C por 10 min. Os primers utilizados para amplificar o éxon foram descritos por Petry e colaboradores em 2005. Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose 1,5% contendo brometo de etídio.

Após amplificação pela PCR, os produtos foram submetidos à restrição enzimática (RFLP) com a enzima *Hsp92II*. O volume final para as reações foi de 30mL com 3 μ L de tampão 10x, 0,5 μ l da enzima (5U), e 10-20 μ L do produto da PCR (dependendo da intensidade da banda após amplificação). Água Milli-Q foi usada para completar o volume da reação. As incubações foram realizadas durante a noite à 37°C. Os fragmentos foram visualizados em um gel de agarose 3% contendo brometo de etídio.

Heredogramas

Com os dados coletados para a construção da genealogia dos pacientes com MPS VI de Monte Santo, foi possível a construção de heredogramas utilizando o programa GenoPro[®] 2011 (versão 2.5.3.2), incluindo todas as amostras que foram coletadas. Para facilitar a interpretação dos dados e levando em consideração a estreita relação de alguns casos-índice, os 11 núcleos familiares (13 pacientes com MPS VI) foram agrupados em nove heredogramas.

Em todos os heredogramas, os indivíduos representados por símbolos preto foram analisados com RFLP e indivíduos que têm símbolos cinza não foram analisados. Indivíduos com símbolos completamente preenchidos são os pacientes com MPS VI e aqueles que têm um ponto dentro do símbolo são heterozigotos para o alelo p.H178L.

RESULTADOS

Desde 2006, a equipe envolvida nesta pesquisa fez mais de seis viagens ao município de Monte Santo para construção da genealogia, coleta de amostras, entrega de resultados individuais (aconselhamento genético) e aulas para a população local. Em cada viagem, amostras de sangue foram coletadas dos parentes para confirmar a presença do alelo p.H178L em heterozigose ou para identificar indivíduos com um risco substancial de serem portadores, bem como seus parceiros e filhos quando eles tinham mais que 18 anos.

No total, durante essas viagens foram coletadas 236 amostras de sangue para análise molecular da mutação p.H178L. Encontramos 98 (20,8%) alelos mutantes e 374 (79,2%) alelos normais, sendo 41,5% da amostra constituída por indivíduos heterozigotos e 58,5% de indivíduos homozigotos para o alelo normal.

Com os dados coletados para a construção da genealogia relacionando os pacientes com MPS VI de Monte Santo, foi possível registrar 1.455 indivíduos com base em informações fornecidas pelos membros das famílias. Muitos destes indivíduos foram incluídos nos heredogramas mesmo quando a análise molecular não tenha sido realizada.

Tabela 1 - Dados sobre os indivíduos representados em cada um dos nove heredogramas, separados por núcleos familiares.

Núcleo Familiar	Figura	Nº de indivíduos	Pacientes com MPS VI	Nº de indivíduos com análise molecular	Nº de Heterozigotos para a mutação p.H178L
1	1a	50	2*	22	11
2	1b	62	1	33	13
3	1c	37	1	20	11
4	1d	55	1	24	10
5	1e	36	1	20	9
6	1f	48	1	17	8
7	2a	125	2*	52	15
8 e 9	2b	67	2#	21	11
10 e 11	2c	64	2#	33	11

* irmãos; # parentes próximos

Núcleo Familiar 1 (Figura 1a)

Foi relatado por parentes a presença de outro indivíduo com MPS VI (n°488 - Figura 1a), mas este primo já era falecido no início do estudo, por isso não foi possível realizar exame molecular e nenhum material foi coletado de pais, pois eles vivem em São Paulo, estado do sudeste do Brasil, longe de Monte Santo. Este casal tem outros dois filhos (n°489 e 490 - Figura 1a), que também vivem em São Paulo e se a heterozigosidade parental for confirmada, eles têm 50% de chance de serem portadores do alelo p.H178L.

Alguns indivíduos desta família não puderam ser analisados (n°237, 351, 353, 494 e 1388 - Figura 1a), porque tinham menos de 18 anos no momento da coleta da amostra, e alguns destes têm 25% de chance de serem heterozigotos para o alelo p.H178L.

Alguns indivíduos que não foram analisados, mas podem ter um papel importante na manutenção do alelo mutante nesta região não foram adicionados ao heredograma devido à falta de espaço. Alguns exemplos: a presença de mais 12 irmãos do indivíduo n°422 e 8 irmãos do indivíduo n°239, ambos na Figura 1a, que são heterozigotos para o alelo p.H178L.

Núcleo Familiar 2 (Figura 1b)

O indivíduo n°240 aparece no heredograma do núcleo familiar 1 como avó dos irmãos com MPS VI (n°320 e 321 - Figura 1a) e no heredograma do núcleo familiar 2 como tia paterna do paciente com MPS VI (n°372 - Figura 1b).

Foi relatado por parentes a presença de mais 6 indivíduos com MPS VI (n°344, 345, 365, 367, 905 e 906 - Figura 1b) que já estavam falecidos no início do estudo, portanto, a análise molecular não foi nestes indivíduos. Coletamos material de dois casais (n°335, 366, 407 e 898 - Figura 1b), pais desses indivíduos relatados como tendo MPS VI e a heterozigosidade foi confirmada.

Alguns indivíduos desta família, que têm 50% de chance de serem heterozigotos para o alelo p.H178L, não puderam ser analisados (n°368, 899, 902 e 903 - Figura 1b), pois vivem

em São Paulo. No heredograma da figura 1b nós não adicionamos alguns indivíduos que não foram analisados, como por exemplo, a presença de mais 7 irmãos do indivíduo n°375 (possíveis heterozigotos) e 3 irmãos do indivíduo n°898 (heterozigoto para o alelo p.H178L).

Núcleo Familiar 3 (Figura 1c)

O indivíduo n°408 aparece no heredograma do núcleo familiar 2 como tia materna do paciente com MPS VI (n°372 - Figura 1b) e no heredograma do núcleo familiar 3 como avó do paciente com MPS VI (n°1171 - Figura 1c). O indivíduo n°362 da figura 1c é irmã do indivíduo n°311 da família 1b, e eles têm dois irmãos que não foram incluídos no heredograma, com risco substancial (25%) de serem heterozigotos. Alguns indivíduos desta família não puderam ser analisados porque vivem em São Paulo (n°1188, 1248 e 1252 - Figura 1c).

Núcleo Familiar 4 (Figura 1d)

O indivíduo n°1181 aparece no heredograma do núcleo familiar 4 como avó do paciente com MPS VI (n°1222 - Figura 1d) e no heredograma do núcleo familiar 3 como avó do paciente com MPS VI (n°1171 - Figura 1c). O indivíduo n°1374 aparece no heredograma do núcleo familiar 4 e no heredograma do núcleo familiar 1 como prima do paciente com MPS VI (n°320 - Figura 1a).

Foi relatado por parentes a presença de mais quatro indivíduos com MPS VI (n°1205, 1206, 1389 e 1390 - Figura 1d), mas estes já haviam falecido no início do estudo, portanto, a análise molecular não foi realizada. Foram coletados materiais de 3 pais desses indivíduos (n°416, 421 e 1181 - Figura 1d) e a heterozigosidade foi confirmada.

O indivíduo n°1260 nesta família não pôde ser analisado porque vive em Feira de Santana, outra cidade longe de Monte Santo. Ela tem 25% de chance de ser heterozigota para o alelo p.H178L. Dos onze filhos do indivíduo n°1215 (heterozigoto para o alelo p.H178L),

dez não estavam presentes no momento da coleta da amostra, um deles (n°1.210, normal para o alelo p.H178L) é o avô materno do paciente com MPS VI n°1222 e outro filho tem uma filha heterozigota.

Núcleo Familiar 5 (Figura 1e)

Um indivíduo nesta família não pôde ser analisado (n°541 - Figura 1e), porque tinha menos de 18 anos no momento da coleta, ele tem 50% de chance de ser heterozigoto para o alelo p.H178L. Alguns indivíduos que não foram adicionadas a este heredograma devido à falta de espaço ou porque não foram analisados, mas podem ter um papel importante na manutenção do alelo mutante, são os 9 irmãos do indivíduo n°550 na Figura 1e, que é heterozigoto para o alelo p.H178L.

Núcleo Familiar 6 (Figura 1f)

Esta família tem muitos indivíduos com 25% de chance de serem heterozigotos e que não puderam ser analisados porque eles vivem em outro lugar (n°959 – Figura 1f) ou porque não estavam presentes no momento da coleta de material (n°932, 933, 934, 937, 961, 962, 963, 964, 1067, 1068, 1069, 1072, 1073 e 1075 – Figura 1f). Da mesma forma, não foi possível coletar material dos filhos do casal n°1066 e 1076, que têm 50% de chance de serem heterozigoto para o alelo mutante. A avó (n°957) do paciente com MPS VI (n°926) tem mais 7 irmãos que podem ser heterozigotos para o alelo p.H178L.

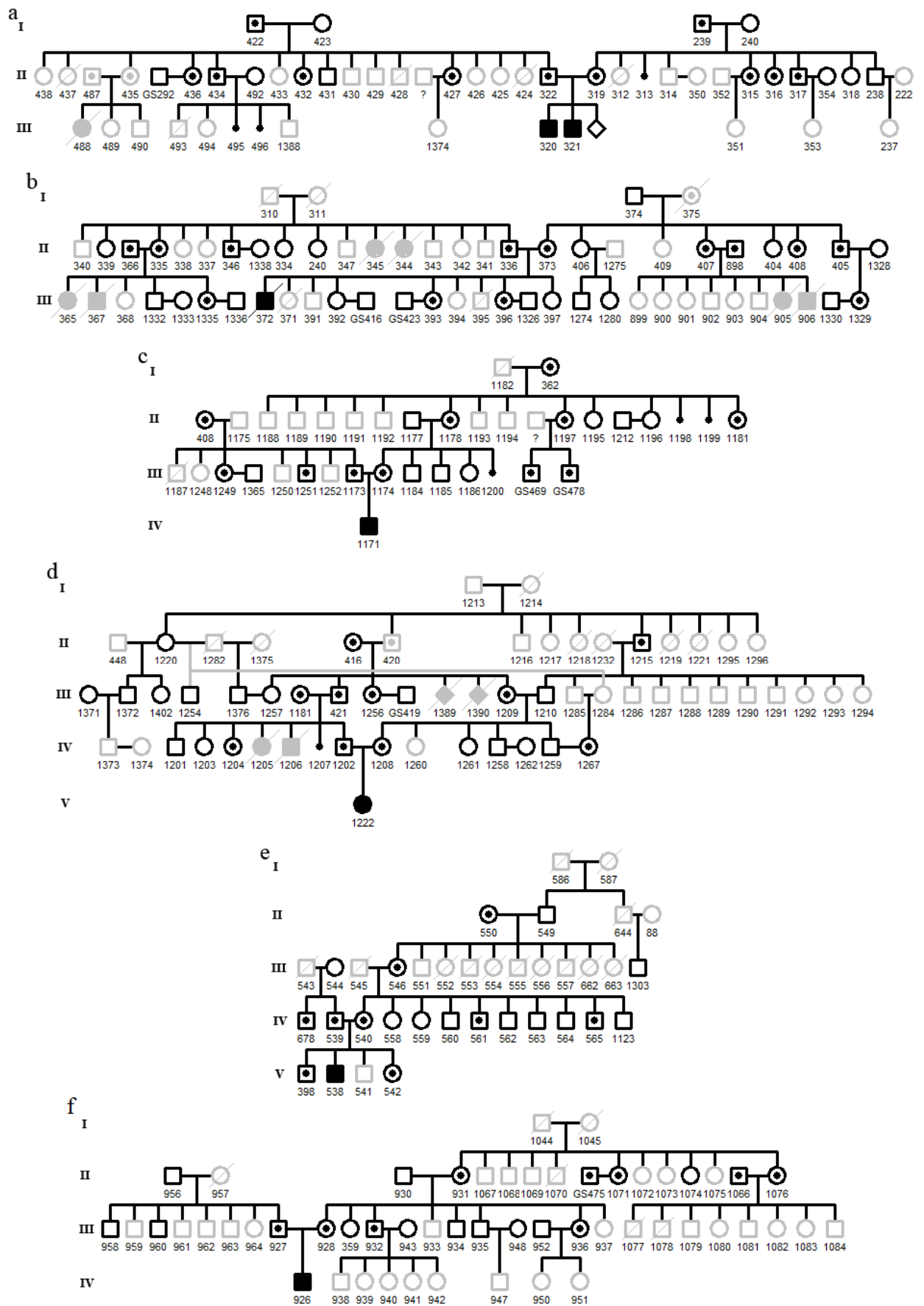


Figura 1 – Heredograma dos núcleos familiares. a: Núcleo familiar 1; b: Núcleo familiar 2; c: Núcleo familiar 3; d: Núcleo familiar 4; e: Núcleo familiar 5; f: Núcleo familiar 6.

Núcleo Familiar 7 (Figura 2a)

Foi relatado por parentes a presença de mais nove indivíduos com MPS VI (n°216, 796, 797, 798, 799, 891, 892, 896 e 897 - Figura 2a), que já haviam falecido no início do estudo, portanto, nenhuma análise molecular foi possível. Nós coletamos material de um casal (n°794 e 841 - Figura 2a), pais de cinco indivíduos referidos como tendo MPS VI e a heterozigidade foi confirmada, sugerindo que eles poderiam dar à luz a pacientes com MPS VI. Indivíduos n°796, 797 e 798 morreram com 24, 12 e 18 anos, respectivamente. Sobre o casal n°800 e 887, não obtivemos dados suficientes. Parentes relataram que eles tiveram onze filhos, um com MPS VI (n°799 - Figura 2a).

Núcleo Familiar 8 (Figura 2b)

Muitos dos parentes deste núcleo familiar não puderam ser analisados porque vivem em São Paulo (n°12, 14, 22, 24, 39, 51, 52, 68 e 98 - Figura 2b). O irmão, um primo e um tio paterno (n°04, 1302 e 41 - Figura 8) do paciente com MPS VI n°01, que têm 25% de chance de serem heterozigotos, não puderam ser analisados, porque no momento da coleta da amostra tinham menos de 18 anos.

Alguns indivíduos que não foram analisados são 6 irmãos do indivíduo de n°29 e 8 irmãos do indivíduo n°08, ambos na figura 2b, que são heterozigotos para o alelo p.H178L. Assim, estes 14 indivíduos que não estão representados no heredograma têm 25% de chance de serem heterozigoto.

Núcleo Familiar 9 (Figura 2c)

Ancestrais do indivíduo n°132 para identificar os irmãos que podem ser heterozigotos não foram informados. Dos oito filhos vivos do casal n°244 e 252, apenas um tinha idade superior a 18 anos e não estava disponível no momento da coleta da amostra. Os filhos do

casal n°221 e 236 tinham menos de 18 anos (n°234 e 235 - Figura 2c), por isso não foi possível coletar amostra para análise molecular.

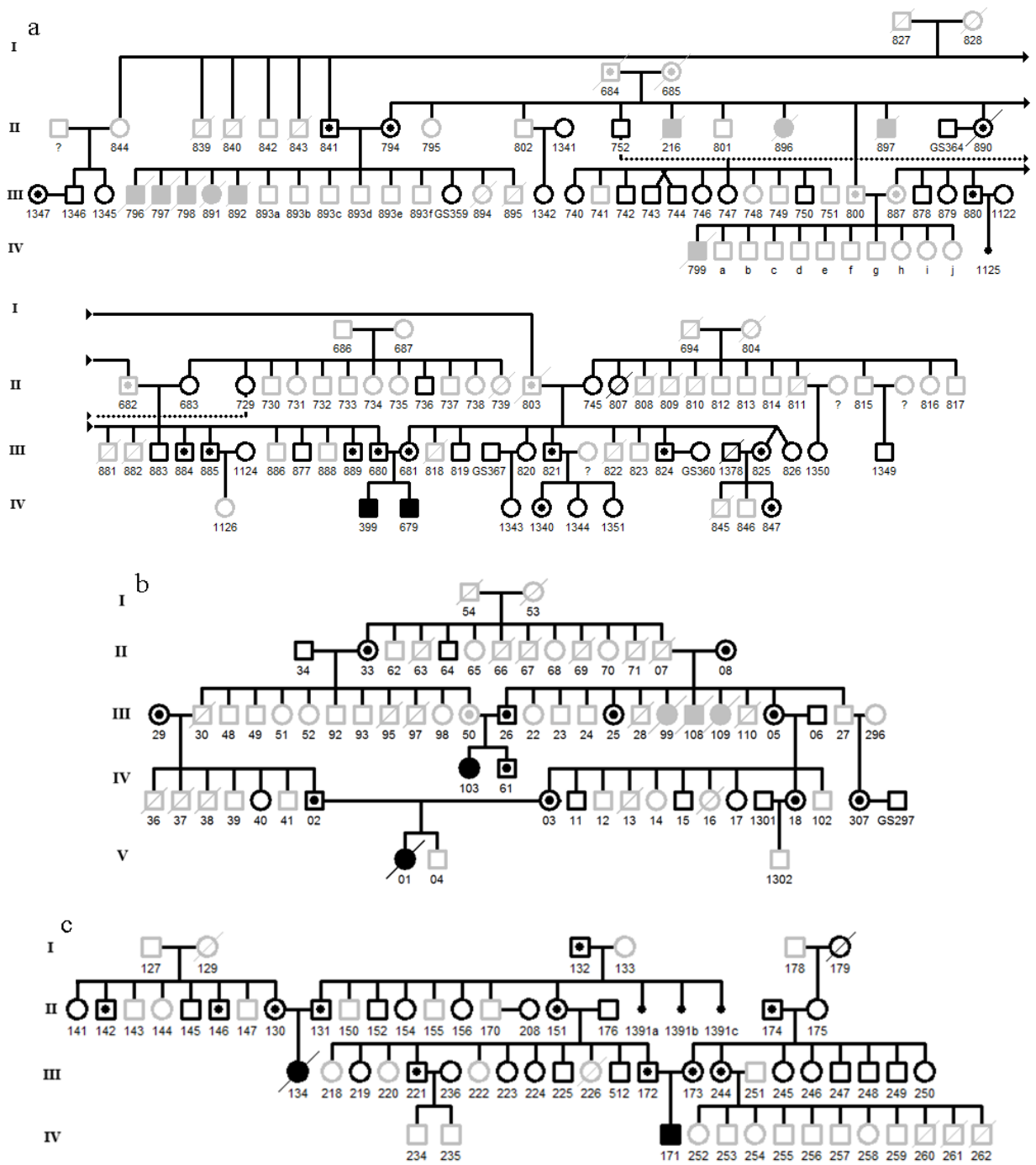


Figura 2 – Heredograma dos núcleos familiares. a: Núcleo familiar 7; b: Núcleo familiar 8; c: Núcleo familiar 9.

DISCUSSÃO

De acordo com estudos internacionais, a incidência de MPS VI varia de 1 em 43.261 nascimentos na Turquia a 1 em 1.505.160 nascimentos na Suécia (Valayannopoulos *et al.*, 2010). Uma incidência de MPS VI no Brasil ainda não foi publicada, mas dados da Rede MPS Brasil mostram que não é tão raro como em outros países (comunicação pessoal). Monte Santo apresenta número de casos de MPS VI muito maior do que a estimada pela literatura, mais de 1 em cada 5.000 nascidos vivos.

Neste estudo foi realizada análise molecular em familiares de 13 pacientes com MPS VI, de Monte Santo, um município no estado da Bahia, nordeste do Brasil. A mutação detectada em todos os pacientes foi p.H178L em homozigose (Costa-Motta *et al.*, 2011), por isso foi possível a análise direta por RFLP em 234 parentes. Deste total, 98(42%) foram heterozigotos para o alelo mutante.

Em cada viagem feita ao município de Monte Santo para entrega dos laudos com os resultados moleculares, novos indivíduos com probabilidade de 25% de serem heterozigotos foram adicionados à genealogia e, quando possível, foi coletado material para análise molecular. Análises dos heredogramas indicam a presença de muitos indivíduos com probabilidade de 50% e 25% de chance de serem heterozigotos. Vários desses não puderam ser analisados, porque tinham menos de 18 anos. Os pais desses indivíduos foram informados de que, quando completarem 18 anos que poderiam solicitar a análise molecular para o nosso grupo de pesquisa. Isto também se aplica a qualquer indivíduo ou casal das famílias que tiverem chance de serem portadores.

No início do estudo, os pacientes tinham que viajar semanalmente para Salvador, capital da Bahia, 350 km longe do município de Monte Santo, para receber as infusões de TRE. Em abril de 2011, um centro de TRE foi inaugurado no hospital municipal de Monte Santo, onde os médicos locais e enfermeiras foram treinados e são frequentemente acompanhados pelo médico geneticista responsável. A implementação deste centro de

tratamento para os pacientes com MPS VI na região reforça a importância da triagem entre os membros das famílias para detectar possíveis casais heterozigotos com chance de terem filhos afetados com MPS VI, que poderiam se beneficiar com o início do tratamento o mais cedo possível.

Outras análises envolvendo a população geral de Monte Santo, como uma triagem neonatal, devem ser realizadas devido à alta taxa de heterozigotos (42%) encontrada entre os parentes desses 11 núcleos familiares.

O fato de Monte Santo ser uma região pequena e isolada com taxas elevadas de endogamia justifica a ocorrência de várias doenças genéticas com frequência alta, como é o caso da MPS VI. Assim, concluímos que, devido à alta prevalência de MPS VI em Monte Santo, com grande impacto sobre essa população, a região precisa de mais estudos entre os membros das famílias com MPS VI e a população em geral para promover um aconselhamento genético e tratamento precoce.

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram que não existem conflitos de interesse.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pelo FIPE-HCPA e pelo Instituto Brasileiro de Genética Médica Populacional (INAGEMP). FMCM recebeu bolsa da CAPES. SLS e RG recebem bolsa de pesquisador do CNPq.

REFERÊNCIAS

- Costa-Motta FMM, Acosta AX, Abé-Sandes K, Bender F, Schwartz IVD, Giugliani R, Leistner-Segal S, 2011. Genetic studies in a cluster of mucopolysaccharidosis type VI patients in Northeast Brazil. *Molecular Genetics and Metabolism*, Available online, 19 September 2011.
- Garrido E, Cormand B, Hopwoos JJ, Chabás A, Grinberg D, Vilageliu L, 2008. Maroteaux-Lamy syndrome Functional characterization of pathogenic mutations and polymorphisms in the ARSB gene. *Molecular Genetics and Metabolism*, 94(3):305-312.
- Garrido E, Chabás A, Coll MJ, Blanco M, Domínguez C, Grinberg D, Vilageliu L, Cormand B, 2007. Identification of the molecular defects in Spanish and Argentinian MPS VI patients, including 9 novel mutations. *Molecular Genetics and Metabolism*, 92:122-130.
- Giugliani R, Harmatz P, Wraith JE, 2007. Management Guidelines for Mucopolysaccharidosis VI. *Pediatrics*, 120:405-418.
- HGMD – The Human Gene Mutation Database (<http://www.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/search/>).
- Isbrandt D, Arlt G, Brooks DA, Hopwoos JJ, von Figura K, Peter C, 1994. Mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome): six unique arylsulfatase B gene alleles causing variable disease phenotypes. *Am J Hum Genet*, 54:454-463.
- Isbrandt D, Hopwoos JJ, von Figura K, Peter C, 1996. Two novel frameshift mutations causing premature stop codons in a patient with the severe form of maroteaux-Lamy Syndrome. *Human Mutations*, 7:361-363.
- Karageorgos L, Brooks DA, Pollard A, *et al.*, 2007. Mutational analysis of 105 mucopolysaccharidosis type VI patients. *Human Mutations*, 28(9):897-903
- Kobayashi T, Honke K, Jin T, Gasa S, Miyazaki T, and Makita A (1992). *Biochim Biophys Acta*, 1159, 243-247.
- Litjens T, Hopwood JJ, 2001. Mucopolysaccharidosis Type VI: Structural and clinical implications of mutations in N-Acetylgalactosamine-4-sulfatase. *Human Mutations*, 18:282-95.
- McGill JJ, Inwood AC, Coman DJ, Lipke ML, de Lore D, Swiedler SJ, Hopwood JJ, 2010. Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis VI from 8 weeks of age - a sibling control study. *Clin Genet*, 77(5):492-498.

- Miller S, Dykes D, Polesky H, 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*; 16:1215.
- Modaressi S, Rupp K, Von Figura K, Peters C, 1993. Structure of the human arylsulfatase B gene. *Biol Chem Hoppe Seyler*; 374:327–35.
- Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF, 2008. Thompson & Thompson. Genética médica, 7ªed.
- Neufeld E, Muenzer J, 2001. The mucopolysaccharidoses. In: Scriver C, Beaudet A, Valle D, Sly W, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8th ed. New York, NY: McGraw-Hill; 3421–3452.
- Peters C, Schmidt B, Rommerskirch W, Rupp K, Zühlendorf M, Vingron M, Meyer HE, Polhmann R, von Figura K, 1990. Phylogenetic conservation of arylsulphatases: cDNA cloning and expression of human arylsulphatase B. *J Biol Chem*, 265:3374-3381.
- Petry MFG, Nonemacher K, Sebben JC, Schwartz IVD, Azevedo ACM, Burin MG, Rezende AR, Kim CA, Giugliani R, Leistner-Segal S, 2005. Mucopolysaccharidosis type VI: Identification of novel mutations on the arylsulphatase B gene in South American patients. *J Inherit Metab Dis*, 28:1027–1034.
- Saito S, Ohno K, Sugawara K, Sakuraba H, 2008. Structural and clinical implications of amino acid substitutions in N-acetylgalactosamine-4-sulfatase: Insight into Mucopolysaccharidosis Type VI. *Molecular Genetics and Metabolism*, 93:419-425.
- Schuchman EH, Jackson CE, Desnick RJ, 1990. Human arylsulfatase B: MOPAC cloning, nucleotide sequence of a full-length cDNA, and regions of amino acid identity with arylsulfatase A and C. *Genomics*; 6:149–58.
- Simonaro CM, Schuchman EH, 1995. N-acetylgalactosamine-4-sulfatase identification of four new mutations within the conserved sulfatase region causing Mucopolysaccharidosis Type VI. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1272:129-132.
- Valayannopoulos V, Nicely H, Harmatz P, Turbeville S, 2010. Mucopolysaccharidosis VI. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 5:5.
- Villani GRD, Balzano N, Natale PD, 1997. Two novel mutations of the arylsulfatase B gene in two Italian patients with severe form of Mucopolysaccharidosis. *Human Mutations*, 11(5):410.

13. ARTIGO 3

MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO VI: PERFIL MOLECULAR DE 109 PACIENTES DA REDE MPS BRASIL

Fabiana Moura Costa-Motta^{1,2}, Fernanda Bender^{1,2}, Ágata Carvalho¹, Paula Marson¹, Ida Vanessa D. Schwartz^{1,3}, Roberto Giugliani^{1,3,4}, Sandra Leistner-Segal^{*,1,2}.

1 – Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brasil;

2 – Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil;

3 – Serviço de Genética, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

4 – Instituto Nacional de Genética Médica Populacional – INAGEMP, Brasil;

TÍTULO RESUMIDO: MPS VI no Brasil

* **AUTOR PARA CORRESPONDÊNCIA:** Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350, CEP 90035-903, Porto Alegre, RS, Brasil. e-mail: ssegal@hcpa.ufrgs.br (Sandra Leistner-Segal).

RESUMO

Mucopolissacaridose tipo VI é uma doença lisossômica causada pela deficiência de arilsulfatase B. A incidência de MPS VI é muito baixa, geralmente menos de 1 caso para cada 1.000.000 recém-nascidos. Até o presente momento, 133 mutações e 10 polimorfismos foram identificados no gene da arilsulfatase B. Entretanto, a maioria dos alelos mutantes ou está presente somente em um indivíduo ou em poucos pacientes, o que demonstra a grande heterogeneidade alélica da MPS VI. A Rede MPS Brasil é uma parceria de centros brasileiros que atendem pacientes com Mucopolissacaridoses, disponibilizando os testes laboratoriais necessários e apoiando o desenvolvimento clínico e laboratorial dos centros participantes. Neste estudo, analisamos as mutações no gene ARSB nos pacientes com MPS VI da Rede MPS Brasil. Existem 109 pacientes, não relacionados, cadastrados na Rede MPS Brasil que possuem material para análise molecular; destes, 68 (62%) pacientes tiveram duas mutações detectadas após a triagem ou por sequenciamento, 15 (14%) pacientes tiveram apenas uma mutação detectada após triagem ou sequenciamento e 26 (24%) pacientes continuam sem a identificação de ambas as mutações. Foram encontradas 22 diferentes mutações, sendo quatro mutações novas e 18 já descritas anteriormente. Os resultados deste estudo apontam para a necessidade de avaliar a metodologia empregada na análise molecular dos pacientes com MPS VI visto que cada região/país possui um perfil mutacional característico. O número expressivo de pacientes com MPS VI reforça a importância de estudos no Brasil envolvendo esta doença.

Palavras-chave: Mucopolissacaridose tipo VI, Síndrome Maroteaux-Lamy, Arilsulfatase B.

INTRODUÇÃO

Mucopolissacaridose tipo VI (MPS VI; Síndrome de Maroteaux-Lamy; OMIN 253200) é uma doença lisossômica causada pela deficiência da enzima arilsulfatase B (ARSB, N-acetilgalactosamina-4-sulfatase), que é necessária para a degradação do dermatan e condroitin sulfatos (Neufeld & Muenzer, 2001).

Os sintomas clínicos da MPS VI variam muito com a idade de início e a taxa de progressão da doença. Embora sistemas de classificação descritiva, em sua maioria, mostrem pacientes progredindo rapidamente (com sintomas graves) ou lentamente (com sintomas leves ou atenuados), um estágio intermediário também tem sido descrito (Swiedler *et al.*, 2005; Karageorgos *et al.*, 2007; Pilz *et al.*, 1979; Tonnesen *et al.*, 1991; Wicker *et al.*, 1991; Isbrandt *et al.*, 1994; Paterson *et al.*, 1982).

Calcula-se que pode haver em torno de 1.100 indivíduos afetados com MPS VI em todo o mundo, dos quais só 10% tem sido estudados do ponto de vista bioquímico e genético (Swiedler *et al.*, 2005; Karageorgos *et al.*, 2007). A incidência, estimada a nível mundial para a MPS VI, varia de 1:238.095 a 1:1.300.000 nascidos vivos entre as diferentes populações (Lowry *et al.*, 1990, na colúmbia britânica; Nelson *et al.*, 1997, na Irlanda do Norte; Meikle *et al.*, 1999, na Austrália; Poorthuis *et al.*, 1999, na Holanda; Pinto *et al.*, 2004, em Portugal; Baehner *et al.*, 2005, na Alemanha). No Brasil e em Portugal, entre as DL em geral, a MPS VI parece ser relativamente frequente com o dobro de prevalência da Austrália e Holanda (Coelho *et al.*, 1997; Pinto *et al.*, 2004).

A MPS VI foi considerada uma das mucopolissacaridoses mais raras (Poorthuis *et al.*, 1999; Meikle *et al.*, 1999). Na Austrália, relatou-se uma incidência para MPS VI de 0,4:100.000 nascimentos (Meikle *et al.*, 1999). Na Irlanda do Norte, com dados de 25 anos (mais de 800.000 nascimentos), não foram encontrados casos diagnosticados de MPS VI, assim como no Canadá, com dados de 24 anos (mais de 1.000.000 de nascimentos) (Nelson, 1997; Applegarth *et al.*, 2000).

Embora não exista nenhuma associação da MPS VI com algum grupo étnico, locais com efeito fundador têm sido sugerido para o Norte de Portugal e regiões do Brasil (Giugliani *et al.*, 2007; Costa-Motta *et al.*, 2011).

O isolamento e caracterização do cDNA da ARSB humana (Peters *et al.*, 1990; Schuchman *et al.*, 1990) e a elucidação da estrutura do gene ARSB humano (Modaressi *et al.*, 1993) tornaram possível a identificação dos defeitos moleculares nos alelos do gene ARSB mutante. O gene da ARSB humana tem 209 kb (genome.ucsc.edu), é composto por oito éxons, que variam de 71 a 312 bp. O polipeptídeo nascente possui 533 aminoácidos (Kobayashi *et al.*, 1992).

Até o momento, já foram descritas 133 mutações patogênicas no gene ARSB e a maioria delas são privadas (HGMD). As mutações foram encontradas em éxons ou próximas aos éxons. Atualmente, existem 13 polimorfismos descritos no gene ARSB [HGMD; Petry *et al.*, 2005; Garrido *et al.*, 2007, 2008; Saito *et al.*, 2008; Litjens & Hopwood, 2001; Villani *et al.*, 1998; Isbrandt *et al.*, 1994, 1996; Simonaro *et al.*, 1995; Karageorgos *et al.*, 2007).

O elevado número de alelos privados dificulta a análise rotineira de mutações na população geral, contudo, tem sido descritos alguns alelos frequentes em determinadas populações como: p.R152W na Rússia, 25% dos 20 alelos mutados (Voskoboeva *et al.*, 2000); p.Y210C no mundo, 18% em 105 pacientes (Karageorgos *et al.*, 2007); p.H393P na Austrália e Inglaterra com 8% dos alelos mutantes em 25 pacientes (Litjens *et al.*, 1996); c.1533del23 no Brasil, ocorrendo em 23% dos 52 alelos estudados, essa mutação também ocorre em pacientes portugueses, embora a frequência seja desconhecida (Petry *et al.*, 2003, 2005).

Correlações entre o genótipo e fenótipo são difíceis de serem realizadas, pois, a maioria dos alelos mutantes está presente em apenas um paciente ou em poucos e, a maioria dos pacientes caracterizados são heterozigotos compostos. Nos pacientes em que ambos os alelos são nulos, como as mutações sem sentido ou pequenas deleções e inserções, é previsto

que não haja uma proteína ARSB funcional e, portanto o paciente tenha um fenótipo grave. Mutações de sentido trocado são previstas para terem um efeito variável sobre a gravidade clínica do paciente, pois as substituições dos aminoácidos podem ter diferentes efeitos sobre a estrutura e/ou atividade da proteína de acordo com sua localização. Pacientes que são heterozigotos compostos para mutações de sentido trocado e mutações nulas são geralmente mais gravemente afetados do que os pacientes homozigotos para mutações de sentido trocado (Litjens e Hopwood, 2001).

A Rede MPS Brasil é uma parceria de centros brasileiros que atendem pacientes com Mucopolissacaridoses. O Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SGM/HCPA) coordena o projeto, disponibilizando os testes laboratoriais necessários e apoiando o desenvolvimento clínico e laboratorial dos centros participantes. Com isso, espera-se que esta iniciativa leve à identificação da maioria dos pacientes com MPS no Brasil, conduzindo à estruturação de uma rede organizada para diagnóstico, manejo, prevenção e investigação das MPS, aumentando a qualidade e a expectativa de vida dos pacientes.

Neste estudo, analisamos as mutações no gene ARSB nos pacientes com MPS VI da Rede MPS Brasil. Dentre os trabalhos realizados com MPS VI, esse é o que contém o maior número de pacientes com MPS VI de um único país.

MÉTODOS

Amostra

Pacientes com MPS VI do Brasil ou América Latina cadastrados na Rede MPS Brasil, com material disponível para análise molecular. Até novembro de 2011, foram cadastrados 109 pacientes, não relacionados. Foi encaminhado sangue em EDTA de 108 destes pacientes e para 1 paciente o material foi enviado em cartão FTA[®]. Também foram encaminhados para análise material de alguns pais e irmãos. O diagnóstico de MPS VI foi confirmado bioquimicamente pela demonstração de excreção anormal de dermatan sulfato na urina e atividade deficiente da ARSB em leucócitos e/ou fibroblastos. Todos assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido da Rede MPS Brasil.

Análise molecular

*** Triagem das mutações comuns**

DNA genômico foi obtido de sangue periférico, coletado em EDTA, utilizando a técnica de precipitação de sais (Miller *et al.*, 1988). A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi usada para amplificar os éxons 1 a 8 do gene ARSB. A amplificação por PCR foi realizada com volume final de 25 µL com 2 mM MgCl₂, 1 mM de cada dNTP, 10 pmol de cada primer, 1x PCR *buffer*, 1 U de Taq DNA polimerase (Super-Therm ou Invitrogen) e 100-200 ng de DNA genômico. Para a amplificação dos exons 1 a 7, foi adicionado 1,25-2,0 de DMSO 100% e para o éxon 1, foi adicionado 2 µL de solução 5x Q (Qiagen). As reações foram submetidas a 5 min de desnaturação inicial à 94°C, 30 ciclos de desnaturação à 94°C por 15-40s, anelamento a 45-55°C por 30-60s e alongamento a 72°C por 40-60s, com uma etapa de extensão final a 72°C por 10 min; o éxon 1 utilizou alongamento e extensão final a 68°C. Os primers utilizados para amplificar os éxons 1 e 7 foram descritos por Isbrandt e colaboradores (1994), e os primers utilizados para amplificar os éxons 2-6 e 8 foram descritos por Petry e

colaboradores (2005). Os produtos de PCR dos éxons 1-7 foram analisados em gel de agarose 1,5% contendo brometo de etídio e o éxon 8 em gel de agarose 3%.

A análise nos pacientes novos é realizada a partir de uma triagem de mutações recorrentes, de acordo com dados da literatura internacional, e de mutações frequentes entre os pacientes brasileiros. As cinco mutações incluídas na triagem são: p.L72R, p.H178L, p.R315Q, IVS5-1g>c e c.1533del23. As quatro primeiras são analisadas por *Restriction fragment length polymorphism* (RFLP) e a deleção é analisada diretamente pelo gel de agarose 3%. As reações enzimáticas tinham um volume final de 30 µl com 3 µl de *buffer* 10x, 0,5 µl da enzima (5U) e 10-20 µl do produto da PCR (dependendo da intensidade da banda após a amplificação). Água Milli-Q foi usada para completar o volume da reação. As incubações foram realizadas de acordo com protocolo da enzima: *Bst*I para p.L72R, *Hsp*92II para p.H178L, *Taq*I para p.R315Q e *Bsr*I para IVS5-1g>c. Os fragmentos foram visualizados em gel de agarose 3% contendo brometo de etídio.

* Sequenciamento

Os pacientes que permaneceram sem a identificação de um ou ambos alelos, após a triagem, foram encaminhados para sequenciamento. Para tal, os produtos da PCR foram purificados com EXOSAP[®] e sequenciados com o kit *Big Dye Terminator* versão 3.1 usando um sequenciador ABI310 automatizado (*Applied Biosystems*).

* Análise dos polimorfismos

Os 13 polimorfismos de nucleotídeo único (*SNPs*) descritos no gene ARSB são: p.L82L (c.246g>a), p.I114I (c.342c>t), p.L124L (c.370c>t), IVS3-22t>c, p.G324G (972a>g), p.T356T (1068a>t), p.V358M (1072g>a), p.V376M (1126g>a), IVS5-27a>c, p.S384N (1151g>a), p.P397P (1191a>g), p.P454P (c.1362g>a) e p.Y505Y (c.1515c>t). *Single Strand Polimorfismo Conformacional* (SSCP) foi o método escolhido para a análise do polimorfismo

IVS3-22t>c, os demais SNPs foram analisados no momento do sequenciamento do respectivo éxon.

RESULTADOS

Entre os 109 pacientes, não relacionados, cadastrados na Rede MPS Brasil que possuem material para análise molecular, 68 (62%) pacientes tiveram duas mutações detectadas após a triagem ou por sequenciamento, 15 (14%) pacientes tiveram apenas uma mutação detectada após triagem ou sequenciamento e 26 (24%) pacientes continuam sem a identificação de ambas as mutações.

Entre os pacientes com as duas mutações detectadas, 46 (68%) pacientes são homocigotos, sendo que 40 destes pacientes são homocigotos para uma das mutações da triagem. Restando 22 (32%) pacientes heterocigotos compostos.

Foram encontradas 22 diferentes mutações entre os 109 pacientes, sendo quatro mutações novas e 18 já descritas anteriormente (Figura 1, Tabela 1). Com relação ao tipo de mutação, as mutações encontradas entre os pacientes do Brasil se enquadram em deleções, mutações sem sentido, mutações de sentido trocado e mutações em sítios de *splicing*.

Para as mutações novas de sentido trocado, foram realizadas análises *in silico* com o software *PolyPhen-2*[®]; as mutações p.Y86N e p.H349L atingiram score máximo sendo preditas como provavelmente danosas, e a mutação p.Q104P atingiu score de 0,312 sendo predita como benigna.

Dentre os 13 polimorfismos descritos no gene ARSB até o momento, foram encontrados 7 nos pacientes e familiares analisados (Figura 1).

No mapa da figura 2, foram distribuídos pelo território brasileiro 104 pacientes de acordo com o local de registro do atendimento. Quatro pacientes não eram do Brasil, sendo um da Argentina, dois do Chile e um do Paraguai. Um paciente não possui cadastrado na Rede MPS Brasil o local de registro.

O mapa da figura 3 apresenta a distribuição pelo território brasileiro das mutações mais frequentes entre os pacientes com MPS VI da Rede MPS Brasil. Foram incluídas seis, totalizando 58,8% das mutações encontradas entre os pacientes.

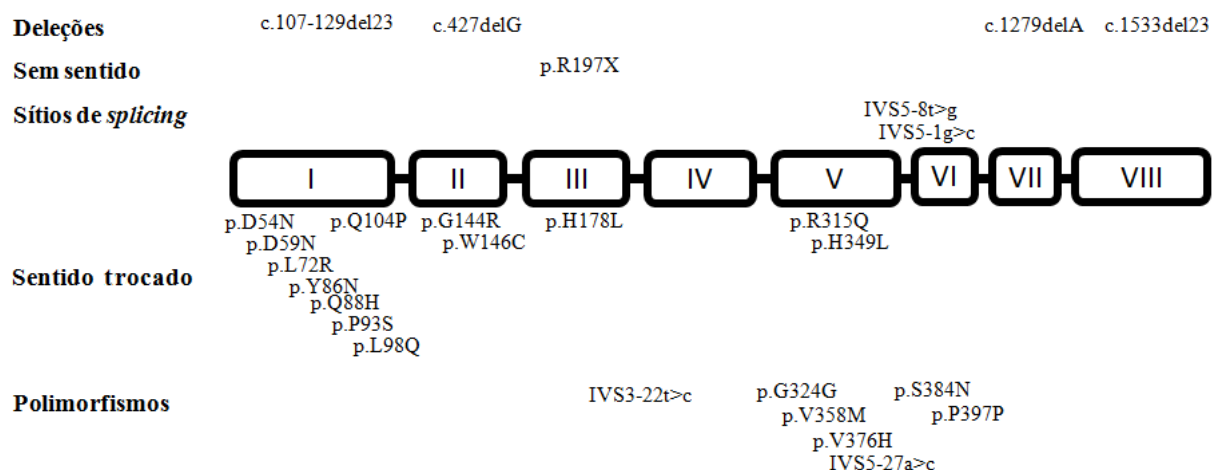


Figura 1 - Localização das mutações e polimorfismos encontrados nos pacientes com MPS VI da Rede MPS Brasil.

Tabela 1 – Características das mutações encontradas nos pacientes com MPS VI da Rede MPS Brasil com os respectivos número de alelos e frequência.

Éxon	Mutação	Tipo	Nº de alelos	Frequência alélica (%) #	Referência
I	c.107-129del23*	Deleção	1	0,46	Este estudo
I	p.D54N (c.160G>A)	Sentido trocado	3	1,39	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007
I	p.D59N (c.175G>A)	Sentido trocado	1	0,46	Petry <i>et al.</i> , 2005
I	p.L72R (c.215T>G)	Sentido trocado	26	12,04	Petry <i>et al.</i> , 2005
I	p.Y86N (c.256T>A)*	Sentido trocado	1	0,46	Este estudo
I	p.Q88H (c.264G>C)	Sentido trocado	1	0,46	Petry <i>et al.</i> , 2005
I	p.P93S (c.277C>T)	Sentido trocado	1	0,46	Petry <i>et al.</i> , 2005
I	p.L98Q (c.293T>A)	Sentido trocado	2	0,93	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007
I	p.Q104P (c.311A>C)*	Sentido trocado	1	0,46	Este estudo
II	c.427delG	Deleção	5	2,31	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007
II	p.G144R (c.430G>A)	Sentido trocado	1	0,46	Isbrandt <i>et al.</i> , 1994
II	p.W146R (c.436T>C)	Sentido trocado	1	0,46	Simonaro e Schuchman, 1995
II	p.W146X (c.438G>A)	Sem sentido	1	0,46	Voskoboeva <i>et al.</i> , 2000
II	p.R160X (c.478C>T)	Sem sentido	1	0,46	Voskoboeva <i>et al.</i> , 1994
III	p.H178L (c.533A>T)	Sentido trocado	23	10,65	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007
III	p.R197X (c.592(589)C>T)	Sem sentido	2	0,93	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007
V	p.R315Q (c.944G>A)	Sentido trocado	17	7,87	Villani <i>et al.</i> , 1999
V	p.H349L (c.1046A>T)*	Sentido trocado	1	0,46	Este estudo
	IVS5-1G>C	Sítios de <i>Splicing</i>	33	15,28	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007
	IVS5-8T>G	Sítios de <i>Splicing</i>	12	5,56	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007
VII	c.1279delA	Deleção	1	0,46	Petry <i>et al.</i> , 2005
VIII	c.1533del23	Deleção	16	7,41	Petry <i>et al.</i> , 2003

* mutações novas; # para o cálculo da frequência alélica foram considerados 218 alelos, que correspondem aos 109 pacientes.



Figura 2 – Distribuição de 104 pacientes com MPS VI da Rede MPS Brasil pelo território brasileiro. Quatro pacientes não são do Brasil e 1 paciente não possui registro da localização geográfica.

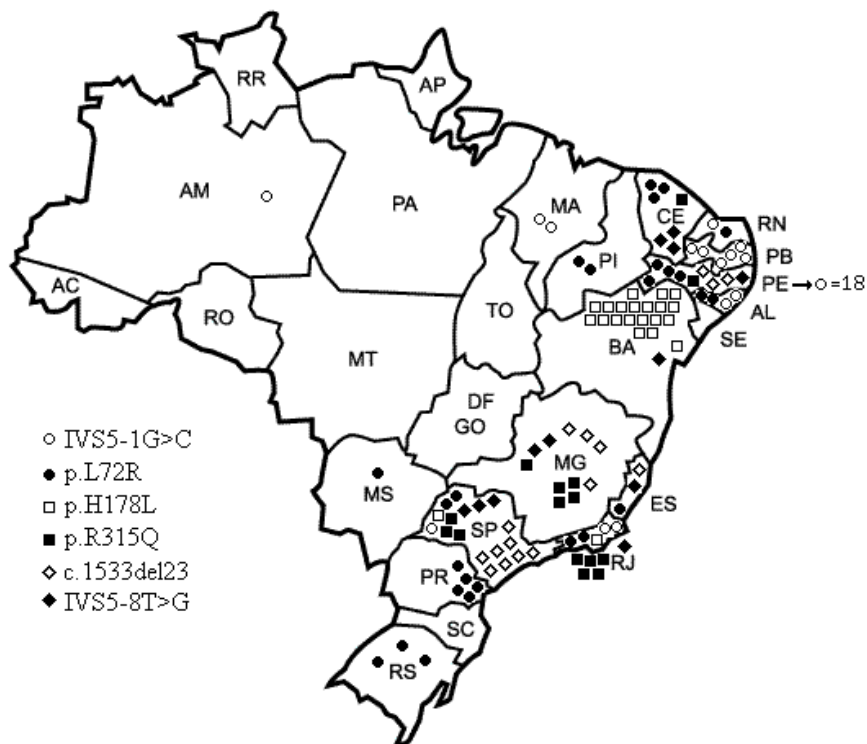


Figura 3 – Distribuição, em número de alelos, das seis mutações mais frequentes entre os pacientes com MPS VI da Rede MPS Brasil pelo território brasileiro.

Uma característica importante entre os pacientes da Rede MPS Brasil é a grande quantidade de genótipos encontrados, como apresentado na tabela 2.

Tabela 2 – Genótipos dos 68 pacientes com MPS VI da Rede MSP Brasil que possuem as duas mutações identificadas.

Genótipo	Nº de pacientes	Frequencia genotípica (%)	Genótipo	Nº de pacientes	Frequencia genotípica (%)
IVS5-1G>C / IVS5-1G>C	11	16,2	IVS5-8T>G / c.427delG	1	1,5
p.H178L / p.H178L	10	14,5	IVS5-1G>C / p.P93S	1	1,5
p.L72R / p.L72R	9	13,2	IVS5-1G>C / p.R315Q	1	1,5
p.R315Q / p.R315Q	5	7,3	IVS5-1G>C / 1533del23	1	1,5
c.1533del23 / c.1533del23	5	7,3	1533del23 / p.R315Q	1	1,5
IVS5-8T>G / IVS5-8T>G	3	4,3	1533del23 / p.L72R	1	1,5
p.L98Q / p.L98Q	1	1,5	c.427delG / p.G144R	1	1,5
p.R197X / p.R197X	1	1,5	c.427delG / p.L72R	1	1,5
c.427delG / c.427delG	1	1,5	p.L72R / p.D59N	1	1,5
p.L72R / p.D54N	2	2,9	c.107-129del23 / p. H178L	1	1,5
IVS5-1G>A / p.L72R	2	2,9	c.1279delA / p.R315Q	1	1,5
c.1533del23 / IVS5-8T>G	2	2,9	p.R315Q / p.R160X	1	1,5
IVS5-8T>G / p.R315Q	1	1,5	p.R315Q / p.D54N	1	1,5
IVS5-8T>G / IVS5-1G>C	1	1,5	p.Q104P / p.W146X	1	1,5

DISCUSSÃO

A análise molecular, realizada até o momento, permitiu a identificação de 151 dos 218 (69,2%) alelos mutantes nos pacientes com MPS VI do Brasil. Um total de 22 diferentes mutações foram identificadas entre os 109 pacientes, sendo 13 mutações de sentido trocado, 4 deleções, 3 mutações sem sentido e 2 mutações em sítios de *splicing*.

Foram encontradas, entre os pacientes da Rede MPS Brasil, quatro mutações não descritas previamente na literatura. Três mutações de sentido trocado e uma deleção. Para confirmar a patogenicidade, devem ser realizadas outras análises, como por exemplo, o estudo de 100 alelos de indivíduos normais, para descartar a possibilidade dessas alterações serem polimorfismos.

A mutação p.Y86N foi encontrada em heterozigose em um paciente cuja segunda alteração ainda não foi encontrada, porém já foi descrito na literatura uma deleção no mesmo códon em paciente com MPS VI pertencente a um estudo clínico da terapia de reposição enzimática (Karageorgos *et al.*, 2004). A deleção nova (c.107-129del23) encontrada em apenas uma paciente está em heterozigose composta com a mutação p.H178L, que quando em homozigose apresenta fenótipo grave.

A mutação p.Q104P foi encontrada em um paciente heterozigoto composto com a mutação p.W146X, descrita por Voskoboeva e colaboradores em 2000, na Rússia. A presença dessa mutação sem sentido em heterozigose com a mutação p.Q104P, predita como benigna, pode ser responsável pelo fenótipo clínico deste paciente, que é muito leve.

Os pacientes com MPS VI da Rede MPS Brasil estão espalhados por todo território, com a grande maioria nas regiões Nordeste e Sudeste. Já foram descritas algumas áreas com grupos de pacientes derivados de um efeito fundador como, por exemplo, os pacientes do município de Monte Santo, interior da Bahia, que possuem a mutação p.H178L em homozigose (Costa-Motta *et al.*, 2011). Outro grupo de pacientes que provavelmente tiveram um efeito fundador é de Pernambuco, onde a frequência da mutação IVS5-1G>C é muito alta.

Entre os 109 pacientes, existem 11 homozigotos (7 de Pernambuco e 3 de estados vizinhos – Alagoas, Maranhão e Paraíba).

Com o aumento do número de pacientes e a triagem para as mutações mais frequentes, a mutação c.1533del23, descrita pelo nosso grupo, sofreu uma brusca diminuição passando de 23% para 7,4% (Petry *et al.*, 2003). Essa mutação é mais comum na região sudeste onde foram encontrados 81% dos alelos com essa alteração, os alelos restantes encontram-se no estado de Pernambuco, região nordeste.

Uma correlação entre o genótipo e o fenótipo é difícil de ser realizada para a maioria dos pacientes com MPS VI devido a um grande número de mutações, que muitas vezes são privadas ou novas. Em geral, as mutações que resultam em alterações bruscas na sequência da proteína ARSB tais como mutações sem sentido e mutações que resultam em uma proteína truncada devido à deleções ou inserções são geralmente encontradas em pacientes com a forma grave da doença. Por outro lado, mutações de sentido trocado, que compreendem a maioria das mutações em MPS VI, têm sido encontradas em pacientes com fenótipos grave e leve (Karageorgos *et al.*, 2007).

Até o momento, já foram encontrados 28 genótipos diferentes entre os 109 pacientes da Rede MPS Brasil (Tabela 2). Destes, apenas 9 são homozigotos para o mesmo alelo, sendo possível fazer uma correlação genótipo fenótipo e entre estes, apenas o alelo p.R315Q, já foi relatado como sendo responsável pelo fenótipo intermediário (Villani *et al.*, 1999; Karageorgos *et al.*, 2004).

Os resultados deste estudo apontam para a necessidade de avaliar a metodologia empregada na análise molecular dos pacientes com MPS VI visto que cada região/país possui um perfil mutacional característico. A utilização da triagem com as cinco mutações mais frequentes fez com que o diagnóstico molecular passasse de 26% para 62% de pacientes com duas mutações identificadas entre os anos de 2007 e 2011.

O estudo que envolveu maior número de pacientes com MPS VI para análise molecular foi realizado em 2007, por Karageorgos e colaboradores, quando juntaram 105 pacientes de diferentes países, representando aproximadamente 10% do número total de pacientes com MPS VI do mundo. O estudo envolvendo os pacientes da Rede MPS Brasil apresenta a análise de 109 pacientes sendo 95% destes brasileiros. O número expressivo de pacientes com MPS VI reforça a importância de estudos no Brasil envolvendo esta doença.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram que não existem conflitos de interesse.

AGRADECIMENTOS

Ao grupo de colaboradores da Rede MPS Brasil. Este estudo foi financiado pelo FIPE-HCPA. FMCM recebeu bolsa de doutorado da CAPES. SLS e RG recebem bolsa de pesquisador do CNPq.

REFERÊNCIAS

- Applegarth D, Toone JR, Lowry RB, 2000. Incidence of inborn errors of metabolism in British Columbia, 1969-1996. *Pediatrics*, 105(1):1-6.
- Baehner F, Schmiedeskamp C, Krummenauer F, *et al.*, 2005. Cumulative incidence rates of the mucopolysaccharidoses in Germany. *J Inherit Metab Dis*, 28:1011-17.
- Coelho JC, Wajner M, Burin MG, *et al.*, 1997. Selective screening of 10.000 high-risk Brazilian patients for the detection of inborn errors of metabolism. *Eur J Pediatr*; 156:650-654.
- Costa-Motta FMM, Acosta AX, Abé-Sandes K, Bender F, Schwartz IVD, Giugliani R, Leistner-Segal S, 2011. Genetic studies in a cluster of mucopolysaccharidosis type VI patients in Northeast Brazil. *Molecular Genetics and Metabolism*, Available online, 19 September 2011.
- Garrido E, Chabás A, Coll MJ, *et al.*, 2007. Identification of the molecular defects in Spanish and Argentinian mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome) patients, including 9 novel mutations. *Mol Genet Metab*; 92(1-2):122-130.
- Garrido E, Cormand B, Hopwoods JJ, Chabás A, Grinberg D, Vilageliu L, 2008. Maroteaux-Lamy syndrome Functional characterization of pathogenic mutations and polymorphisms in the ARSB gene. *Molecular Genetics and Metabolism*, 94(3):305-312.
- Giugliani R, Harmatz P, Wraith JE, 2007. Management Guidelines for Mucopolysaccharidosis VI. *Pediatrics*, 120:405-418.
- HGMD – The Human Gene Mutation Database (<http://www.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/search/>).
- Isbrandt D, Arlt G, Brooks DA, *et al.*, 1994. Mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome): six unique arylsulfatase B gene alleles causing variable disease phenotypes. *Am J Hum Genet*; 54:454-463.
- Isbrandt D, Hopwood JJ, von Figura K, Peters C, 1996. Two novel frameshift mutations causing premature stop codons in a patient with the severe form of Maroteaux-Lamy syndrome. *Hum Mutat*; 7:361-363.
- Karageorgos L, Harmatz P, Simon J, *et al.*, 2004. Mutational analysis of Mucopolysaccharidosis type VI patients undergoing a trial of enzyme replacement therapy. *Hum Mut*; 23:229-233.
- Karageorgos L, Brooks DA, Pollard A, *et al.* 2007. Mutational analysis of 105 mucopolysaccharidosis type VI patients. *Human Mutations*, 28(9):897-903.
- Kobayashi T, Honke K, Jin T, *et al.*, 1992. *Biochim Biophys Acta*; 1159: 243-247.
- Litjens T, Brooks DA, Peters C, *et al.*, 1996. Identification, expression, and biochemical characterization of N-acetylgalactosamine-4-sulfatase mutations and relationship with clinical phenotype in MPS VI patients. *Am J Hum Genet*, 58:1127-1134.
- Litjens T, Hopwood JJ, 2001. Mucopolysaccharidosis type VI: Structural and clinical implications of mutations in N-acetylgalactosamine-4-sulfatase. *Human Mutation*. 18:282-295.

- Lowry RB, Applegarth DA, Toone JR, *et al.*, 1990. An update on the frequency of mucopolysaccharide syndromes in British Columbia. *Hum Genet*, 85:389-390.
- Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF, 1999. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA*, 281(3):249-254.
- Miller S, Dykes D, Polesky H, 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*; 16:1215.
- Modaresi S, Rupp K, von Figura K, Peters C, 1993. Structure of the human arylsulfatase B gene. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 374:327-35.
- Nelson J, 1997. Incidence of the MPS in Northern Ireland. *Hum Genet*; 101:355-8.
- Neufeld EF, Muenzer J, 2001. The mucopolysaccharidosis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. (eds.). *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, 8th ed. McGraw-Hill, New York, pp. 3421-3452.
- Paterson DE, Harper G, Weston HJ, Mattingley J, 1982. Maroteaux-Lamy syndrome, mild form MPS VI B. *Br J Radiol*, 55:805-812.
- Peters C, Schmidt B, Rommerskirch W, *et al.*, 1990. Phylogenetic conservation of arylsulphatases: cDNA cloning and expression of human arylsulphatase B. *J Biol Chem*, 265:3374-3381.
- Petry MFG, Dieter T, Burin M, Giugliani R, Leistner S, 2003. Identification of a novel mutation in the ARSB gene that is frequent among Brazilian MPS VI patients. *Test*, 7:347-349.
- Petry MFG, Nonemacher K, Sebben JC, *et al.*, 2005. MPS type VI: Identification of novel mutations on the ARSB gene in South American patients. *J Inherit Metab Dis*, 28:1027-1034.
- Pilz H, Von Figura K, Goebel HH, 1979. Deficiency of arylsulfatase B in 2 brothers aged 40 and 38 years (Maroteaux-Lamy syndrome, type B). *Ann Neurol*, 6:315-25.
- Pinto R, Caseiro C, Lemos M, *et al.*, 2004. Prevalence of Lysosomal storage diseases in Portugal. *Eur J Hum Genet*, 12:87-92.
- Poorthuis BJ, Wevers RA, Kleijer WJ, *et al.*, 1999. The frequency of lysosomal storage diseases in the Netherlands. *Hum Genet*, 105(1-2):151-156.
- Saito S, Ohno K, Sugawara K, Sakuraba H, 2008. Structural and clinical implications of amino acid substitutions in N-acetylgalactosamine-4-sulfatase: Insight into Mucopolysaccharidosis Type VI. *Molecular Genetics and Metabolism*, 93:419-425.
- Schuchman EH, Jackson CE, Desnick RJ, 1990. Human arylsulfatase B: MOPAC cloning, nucleotide sequence of a full-length cDNA, and regions of amino acid identity with arylsulfatase A and C. *Genomics*; 6:149-58.
- Simonaro CM, Schuchman EH, 1995. N-acetylgalactosamine-4-sulfatase identification of four new mutations within the conserved sulfatase region causing Mucopolysaccharidosis Type VI. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1272:129-132.

- Swiedler S, Beck M, Bajbouj M, *et al.*, 2005. Threshold effect of urinary glycosaminoglycans and the walk test as indicators of disease progression in a survey of subjects with mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome). *Am J Med Genet A*, 134:144-150.
- Tonnesen T, Gregersen HN, Guttler F, 1991. Normal MPS excretion, but dermatan sulphaturia, combined with a mild Maroteaux-Lamy phenotype. *J Med Genet*, 28:499-501.
- Villani GRD, Balzano N, Di Natale P, 1998. Two novel mutations of the arylsulfatase B gene in two Italian patients with severe form of mucopolysaccharidosis. *Hum Mutat*; 11:410-410.
- Villani GRD, Balzano N, Vitale D, *et al.*, 1999. Maroteaux-lamy syndrome: five novel mutations and their structural localization. *Biochim Biophys Acta*; 1453:185-192.
- Voskoboeva E, Isbrandt D, von Figura K, *et al.*, 1994. Four novel mutant alleles of the arylsulfatase B gene in two patients with intermediate form of MPS VI. *Hum Genet*; 93:259-264.
- Voskoboeva E, Krasnopol'skaia KD, Peters K, von Figura K, 2000. Identification of mutations in the arylsulfatase B gene in Russian MPS type VI patients. *Genetika*, 36:837-843.
- Wicker G, Prill V, Brooks D, *et al.*, 1991. Mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome): an intermediate clinical phenotype caused by substitution of valine for glycine at position 137 of arylsulfatase B. *J Biol Chem*, 266:21386-21391.

14. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os objetivos propostos, chegamos as seguintes conclusões descritas abaixo:

a) Identificar a(s) mutação(ões) presente(s) nos pacientes com MPS VI de Monte Santo/BA:

Através da análise molecular, nos treze pacientes com MPS VI de Monte Santo/BA, foi possível identificar a mutação p.H178L em homozigose.

b) Identificar os portadores (heterozigotos) nas famílias através da análise da mutação identificada nos casos índices:

A análise molecular dos familiares apresentou uma alta taxa de heterozigotos (42%). Foram analisados 236 indivíduos nos 11 núcleos familiares, 98 (20,8%) alelos mutantes e 374 (79,2%) alelos normais. Análises dos heredogramas indicam a presença de vários indivíduos com chance de 25% e até de 50% de serem heterozigotos.

c) Definir haplótipos utilizando polimorfismos intragênicos de sequencia única (SNPs) nos familiares e pacientes de Monte Santo/BA, para a identificação de uma possível origem comum do alelo mutado nesta população:

O haplótipo associado com a mutação p.H178L nos pacientes de Monte Santo/BA foi determinado com base na mudança de nucleotídeo causada por cada um dos 10 SNPs analisados como sendo G:C:T:A:A:G:A:C:G:A. A presença da mutação p.H178L nos treze pacientes com MPS VI de Monte Santo, Bahia, em conjunto com as análises dos polimorfismos e dos heredogramas, demonstra que houve um efeito fundador nessa região. O alelo mutado se mantém frequente devido ao isolamento da região e dos casamentos consanguíneos.

d) Permitir aconselhamento genético eficiente e consequentemente orientações a cerca da doença aos familiares com indivíduos afetados:

Para os casais com risco substancial (25%) de terem filhos com MPS VI bem como os demais heterozigotos, no momento da entrega do laudo molecular, foi disponibilizado um aconselhamento e orientações para procurar a equipe do Projeto sempre que necessário. Através do Projeto Genética no Sertão foi implantado no município de Monte Santo um Centro de tratamento para os pacientes com MPS VI, aumentando assim a qualidade de vida desses pacientes e de suas famílias.

Perspectivas futuras:

Análises adicionais devem ser realizadas para identificar a causa da variabilidade clínica entre esses pacientes, visto que eles possuem a mesma mutação em homozigose e o mesmo haplótipo de polimorfismos intragênicos e uma ampla variedade dos sintomas clínicos da MPS VI. Um artigo demonstrando a variabilidade clínica entre os pacientes está em fase de elaboração.

Os nossos resultados mostram a necessidade de continuar com as análises nos familiares dos pacientes com MPS VI de Monte Santo/BA, para o aconselhamento genético adequado, devido ao alto índice de heterozigotos. O Serviço de Genética Médica continuará com as análises nos familiares até que a técnica seja implantada em Salvador/BA.

Novos estudos devem ser realizados para implementar a MPS VI na triagem neonatal desta região visando detectar precocemente indivíduos homozigotos para a mutação p.H178L, que se beneficiariam com um tratamento sendo iniciado o mais rápido possível. Já está sendo realizado um trabalho de análise bioquímica e molecular entre os recém-nascidos do município de Monte Santo.

15. ANEXOS

15.1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DO PROJETO: Análise de mutações no gene ARSB em um grupo de pacientes com MPS VI de Monte Santo/BA e seus familiares: definição de uma possível origem comum através de estudo de haplótipos utilizando polimorfismos intragênicos.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Sandra Leistner-Segal, Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, RS.

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

Nome do paciente: _____

Endereço: _____

Cidade: _____ Estado _____ CEP: _____

Fone: (____) _____ Email: _____

Responsável: _____ Idade: _____

RG: _____ Grau de parentesco: _____

Justificativa e objetivos do estudo:

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

Procedimentos a que serão submetidos os pacientes

Os pacientes com suspeita de apresentar uma mucopolissacaridose serão submetidos a uma avaliação clínica. Caso a suspeita seja confirmada, serão coletadas amostras de sangue e de

HCPA / GPPG
VERSÃO APROVADA

30/10/2007
WZ 07435

GPPG - Recebido

29 OUT. 2007

Por: Sandra Leistner-Segal Nº 07435

urina para análises laboratoriais. 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 ser indicados. O estudo de familiares pode ser importante para o esclarecimento do caso. Esses exames fazem parte da rotina de atendimento de pacientes com suspeita de mucopolissacaridose.

Armazenamento de dados e amostras

Nos casos confirmados, os dados clínicos e laboratoriais serão registrados em um banco de dados e as amostras ficarão armazenadas em um banco de material. Esses dados e amostras ficarão à disposição de pesquisadores que queiram desenvolver pesquisas sobre o tema, desde que as pesquisas sejam aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa. Neste caso, os pacientes serão chamados novamente para consentir com o uso das amostras armazenadas antes do estudo começar.

Benefícios esperados

Com o diagnóstico do tipo de mucopolissacaridose, o paciente poderá se beneficiar das medidas de tratamento eventualmente disponíveis. Por outro lado, sua família também poderá se beneficiar através do 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 presente estudo:

Sim Não

Autorizo o armazenamento das amostras para futuros estudos como especificado no item de armazenamento de dados e amostras:

Sim Não

Data: _____ / _____ / _____

Paciente ou responsável: _____

Responsável pelo estudo: _____

HCPA / GPPG
VERSÃO APROVADA
30.10.2007
M 07435

15.2. Modelo do laudo entregue aos pacientes e familiares de Monte Santo com o resultado do exame molecular



SERVIÇO DE GENÉTICA MÉDICA
CENTRO COLABORADOR DA
ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE
PARA O DESENVOLVIMENTO DE SERVIÇOS DE
GENÉTICA MÉDICA NA AMÉRICA LATINA



Reg. HCPA N°: -

Ficha SGM N°: -

N° Biologia Molecular: _____

Nome do Paciente: _____

Encaminhado por: _____

Data de entrada do material no laboratório: _____

LABORATÓRIO DE GENÉTICA MOLECULAR RESULTADO DA ANÁLISE MOLECULAR

Procedimentos:

Análise do gene ARSB – MPS VI.

Técnica utilizada:

PCR seguido de digestão com enzima de restrição (RFLP) para detecção da mutação H178L.

Material utilizado:

DNA extraído de sangue periférico.

Resultado:

Presença da mutação

dois alelos

um alelo

Ausência da mutação

Conclusão:

O resultado obtido indica que Adão Moraes da Silva é:

homocigoto para a mutação H178L

heterocigoto para a mutação H178L

homocigoto normal

Sandra Leistner-Segal, PhD

CRBio 0467087

____/____/____

Rua Ramiro Barcelos, 2350
90035-903 - Porto Alegre - RS - Brasil
www.hcpa.ufrgs.br

fone (51) 3359-8011
fax (51) 3359-8010
l-genetica@hcpa.ufrgs.br

15.3. Aula ministrada em maio de 2010 para os familiares dos pacientes com MPS VI em Monte Santo/BA por Fabiana Moura Costa Motta

**BASE GENÉTICA DA
MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO VI**


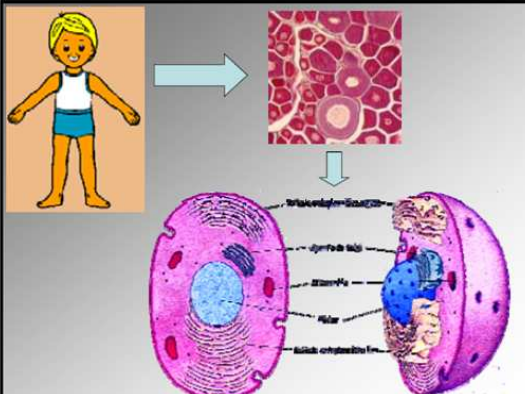


Fabiana Moura Costa Motta
Equipe MPS
SGM-HCPA-UFRGS

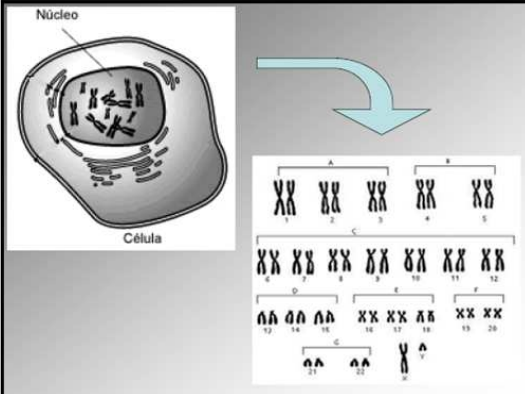
Projeto Genética no Sertão
Maio 2010

A Mucopolissacaridose tipo VI é uma doença

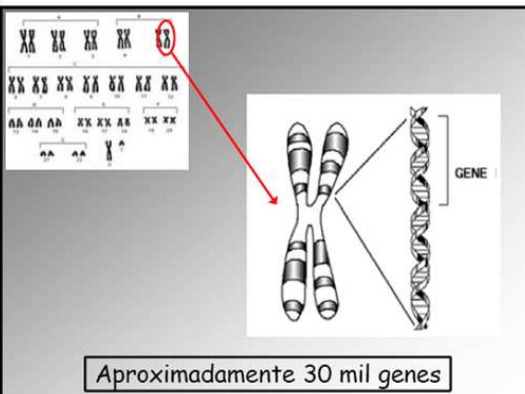
- genética
- autossômica
- recessiva

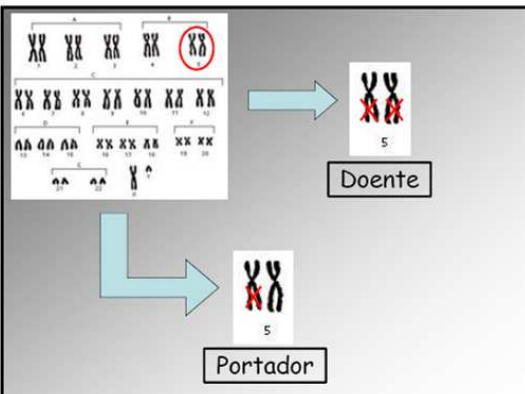
Núcleo



Célula



Aproximadamente 30 mil genes




Doente

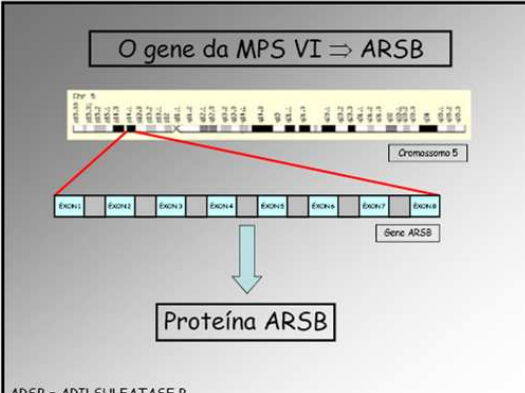
Portador

A Mucopolissacaridose tipo VI é uma doença

- genética
- autossômica
- recessiva

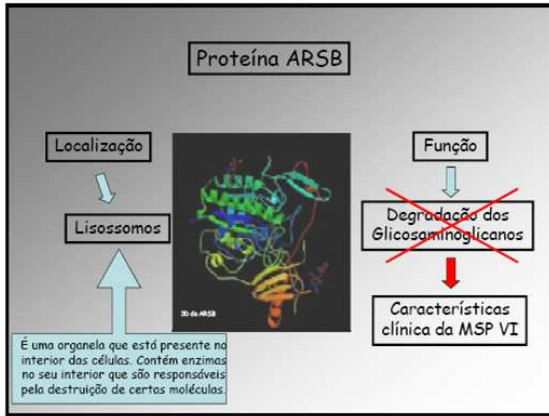


O gene da MPS VI ⇒ ARSB



Proteína ARSB

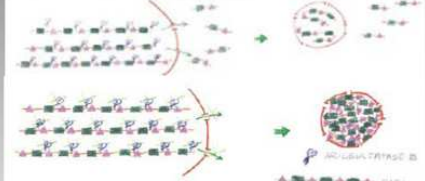
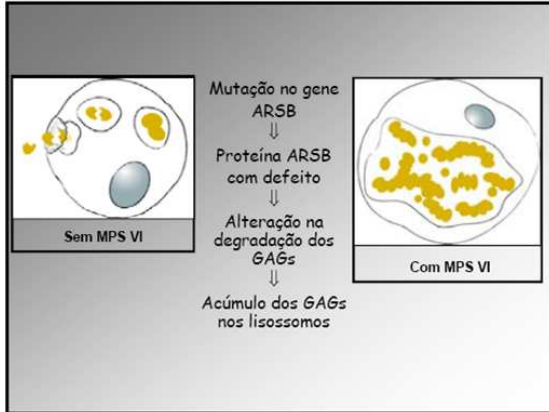
ARSB = ARILSULFATASE B



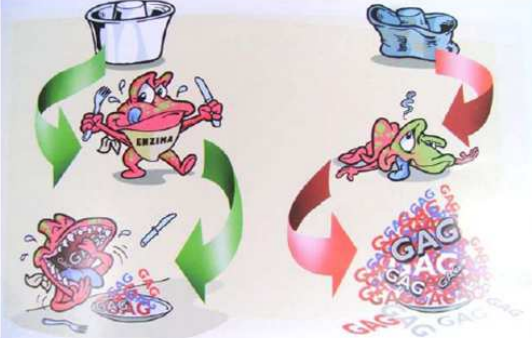
Glicosaminoglicanos

→ Antigamente eram chamados de mucopolissacarídeos
 → No corpo humano há um processo contínuo de substituição dos materiais usados ocorrendo a quebra para serem descartados.

MUCO → refere-se a consistência gelatinosa das moléculas
POLI → significa muitos
SACARÍDEO → termo genérico para molécula de açúcar

O gene é nosso molde



Até o momento já foram descritas **133** diferentes mutações no gene ARSB

↓

Variam muito de acordo com a região geográfica e o grupo étnico



Até o momento já foram descritas **133** diferentes mutações no gene ARSB

↓

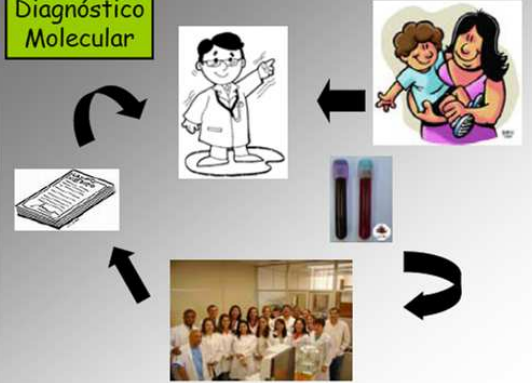
Essa variedade fornece as diferentes características clínicas da doença



Mutação H178L



Diagnóstico Molecular




Quais as chances de um casal ter um filho com MPS VI?

- 1) Pai e mãe portadores
- 2) Pai ou mãe portadores
- 3) Pais Normais



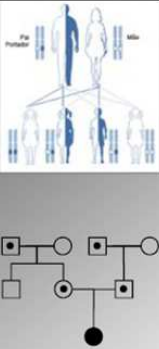
Qual é a chance de um casal ter um filho com MPS VI se o pai e a mãe possuem um gene alterado?

Mãe NA	Pai NA
NN 25% Tem MPS VI? Não E Portador? Não	NA 25% Tem MPS VI? Não E Portador? Sim
NA 25% Tem MPS VI? Não E Portador? Sim	AA 25% Tem MPS VI? Sim E Portador? Sim

N/N = Alelo normal
A/A = Alelo alterado

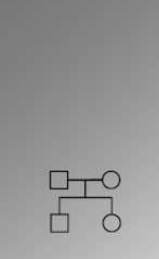
Qual é a chance de um casal ter um filho com MPS VI se o pai ou a mãe possuem um gene alterado?

Mãe NA	Pai NN
NN 50% Tem MPS VI? Não E Portador? Não	AN 50% Tem MPS VI? Não E Portador? Sim

N/N = Alelo normal
A = Alelo alterado


Qual é a chance de um casal ter um filho com MPS VI se o pai e a mãe não possuem um gene alterado?

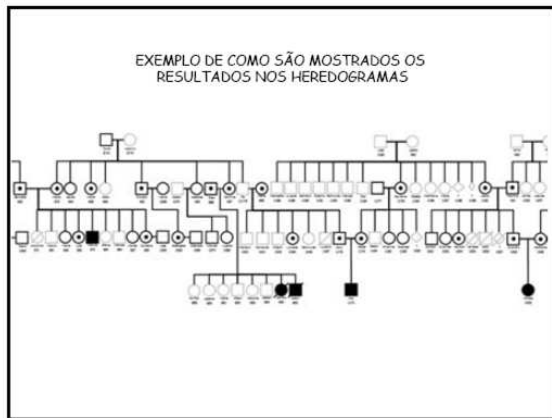



Mãe NN	Pai NN
NN 100% Tem MPS VI? Não E Portador? Não	

N/N = Alelo normal

HEREDOGRAMA DE MONTE SANTO







Dúvidas sobre Mucopolissacaridoses?

Ligue gratuitamente para a REDE MPS BRASIL
0800-5102030
ou entre em contato conosco pelo e-mail
redempsbrazil@ufrgs.br
ou pela webpage
www.redempsbrazil.ufrgs.br

A Rede MPS Brasil é uma parceria entre centros brasileiros que atendem pacientes com MUCOPOLISSACARIDOSES que tem entre seus objetivos facilitar o acesso ao diagnóstico, tratamento e prevenção dessas doenças.

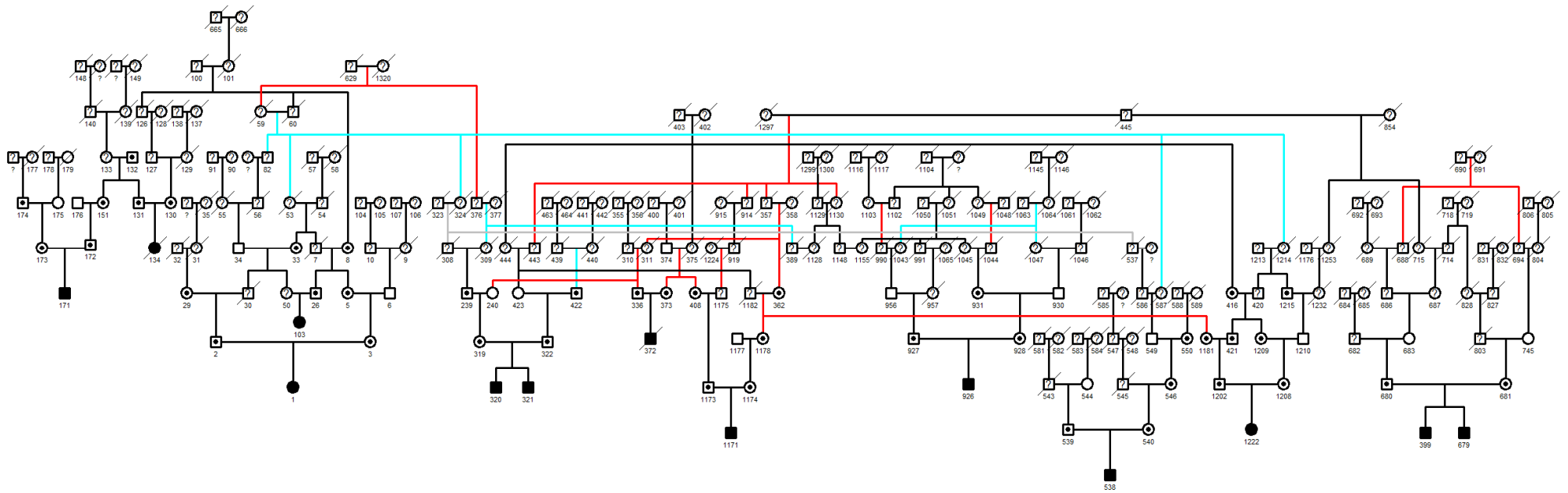
Endereço para contato:
Serviço de Genética Médica
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Rua Ramiro Barcelos, 2350
90035-903 Porto Alegre RS Brasil

Fone gratuito: 08005102030
Fone: +55 51 21018011
Fax: +55 51 21018010
E-mail: redempsbrazil@ufrgs.br
www.ufrgs.br/redempsbrazil

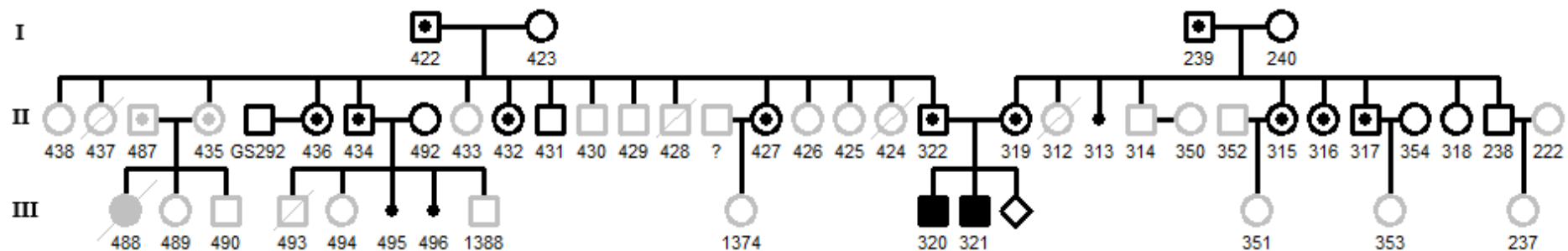
Apelo



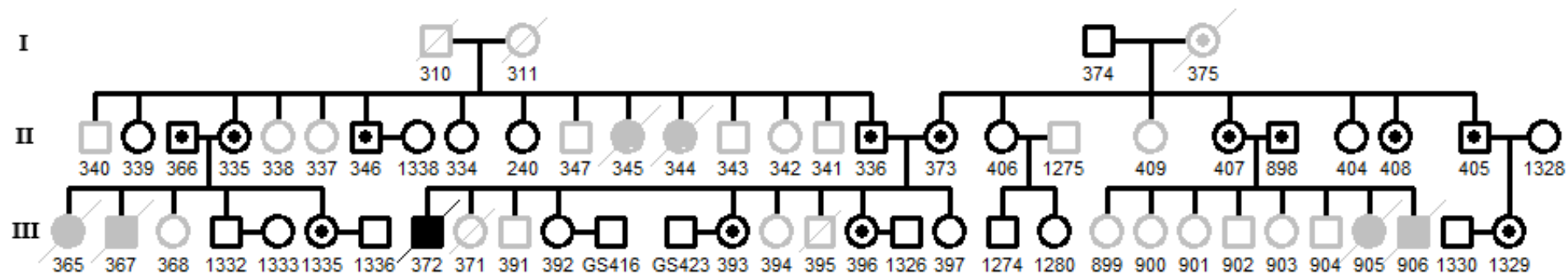
15.4. Heredogramas



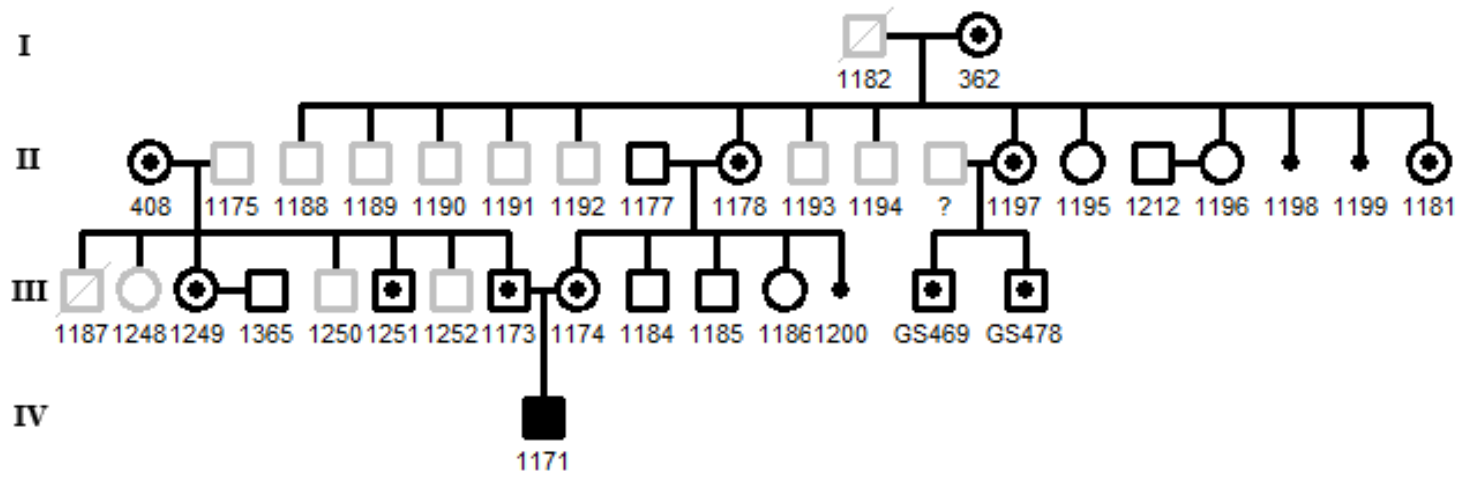
Heredograma do artigo 1 mostrando a relação de parentesco entre os treze pacientes com MPS VI de Monte Santo/BA, incluindo apenas os antecedentes.



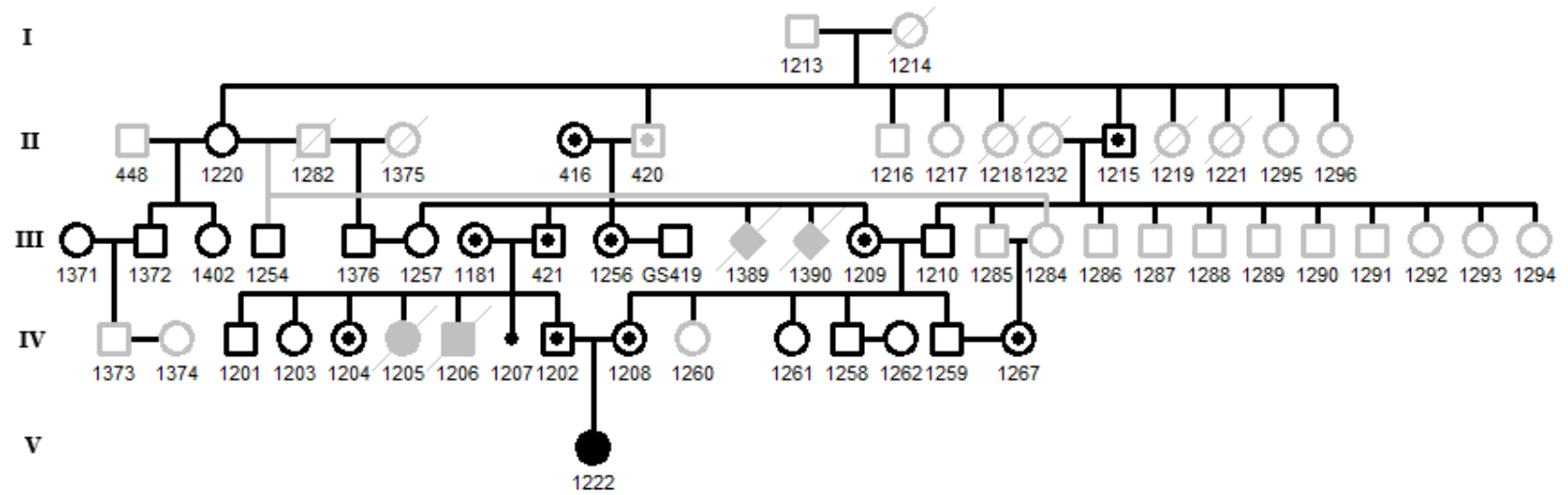
Heredograma do artigo 2 (Figura 1a).



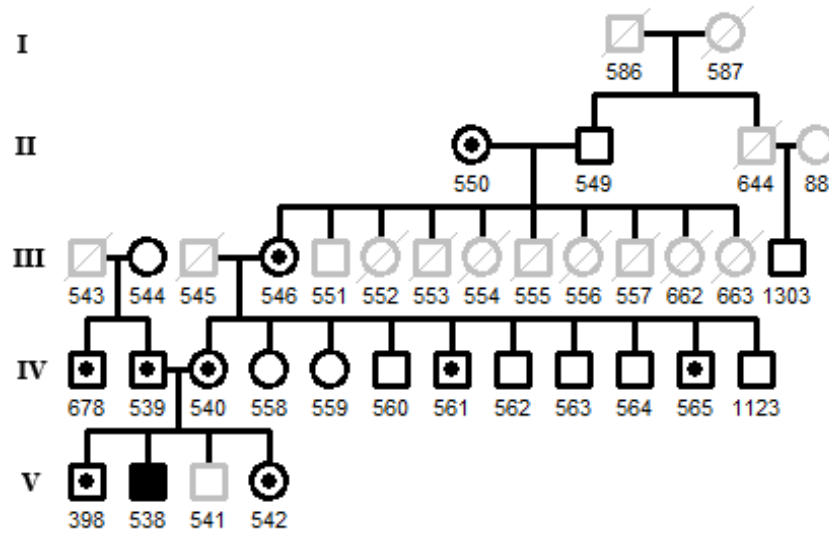
Heredograma do artigo 2 (Figura 1b).



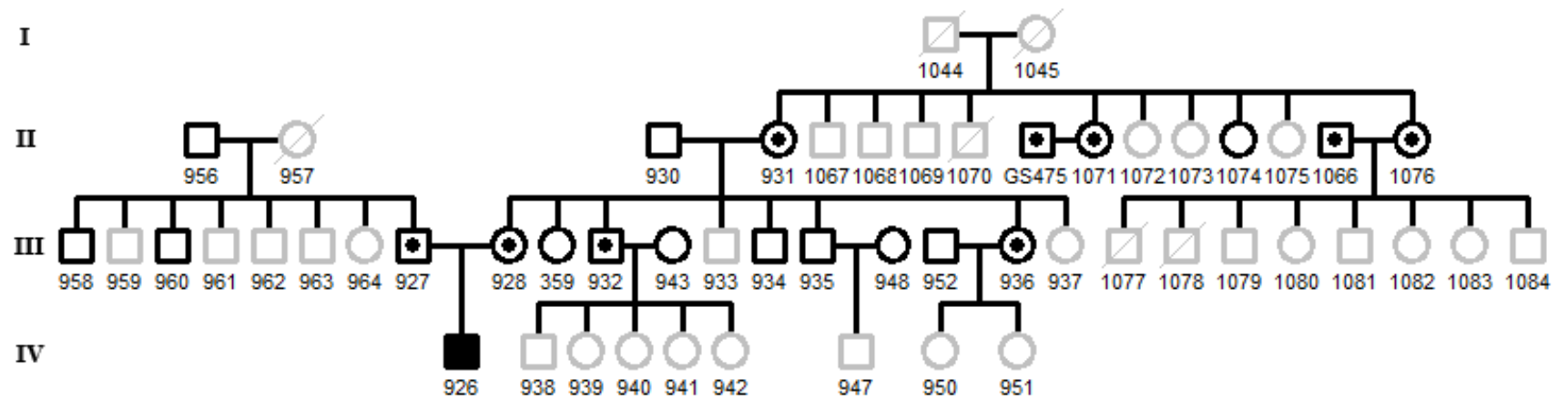
Heredograma do artigo 2 (Figura 1c).



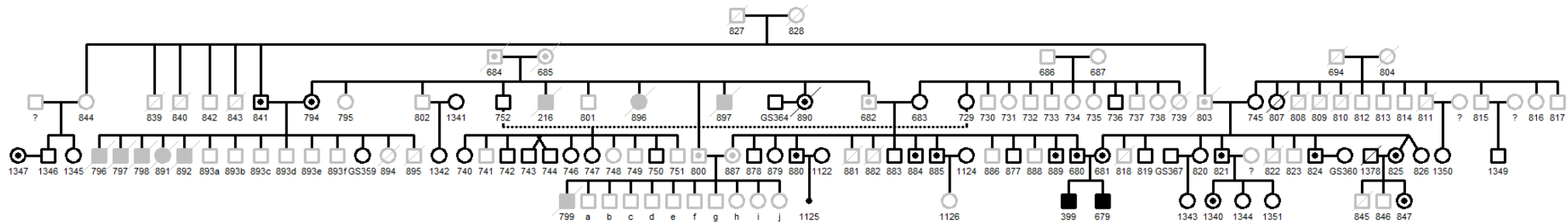
Heredograma do artigo 2 (Figura 1d).



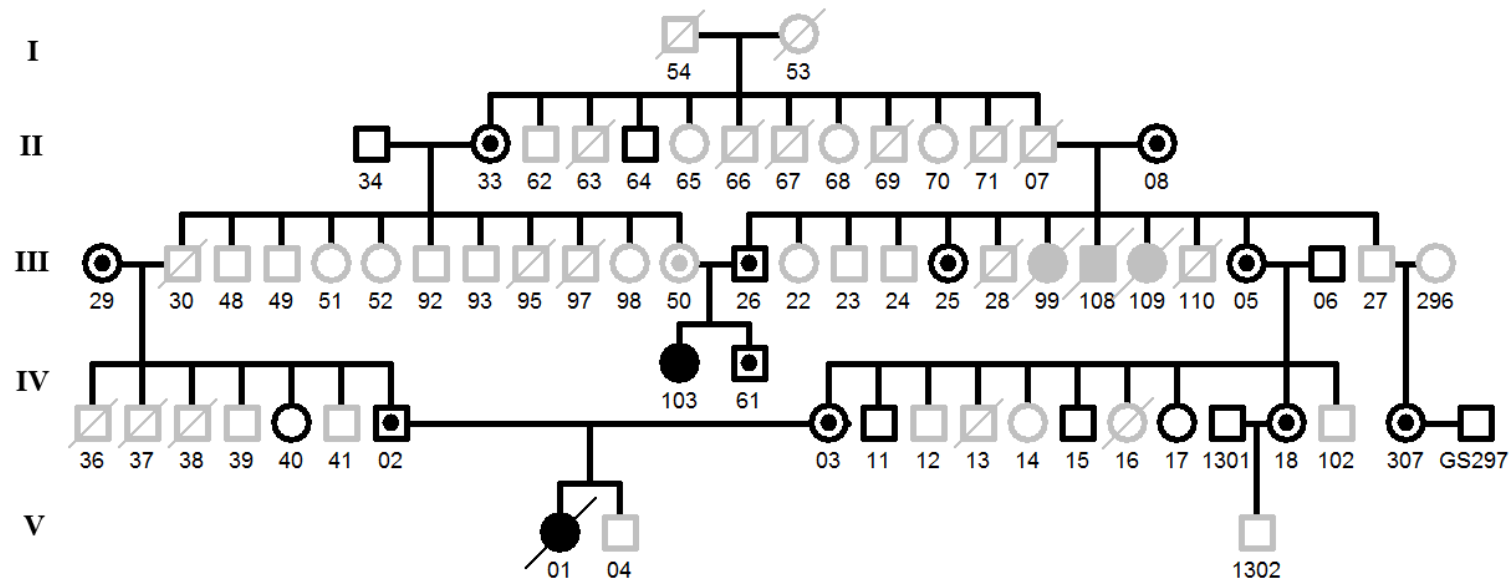
Heredograma do artigo 2 (Figura 1e).



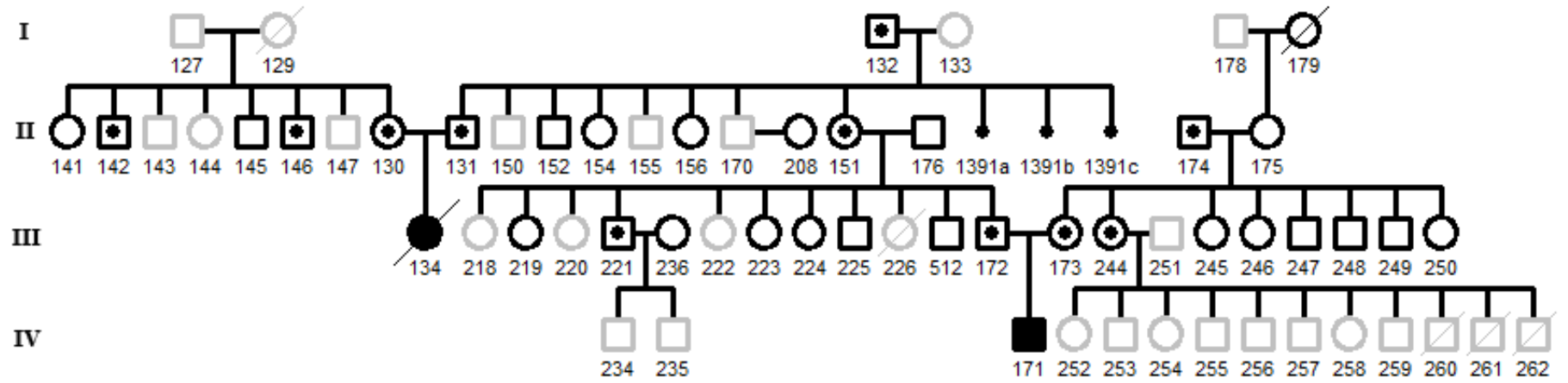
Heredograma do artigo 2 (Figura 1f).



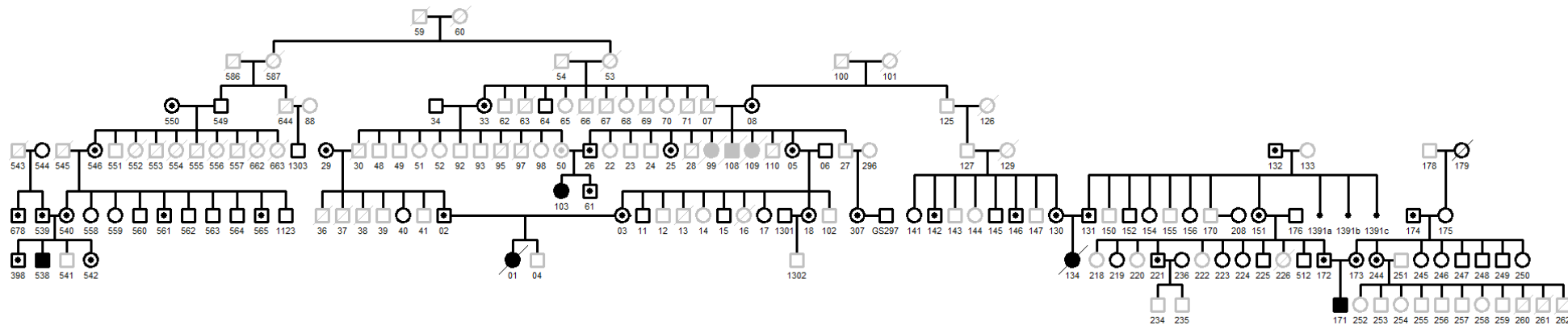
Heredograma do artigo 2 (Figura 2a).



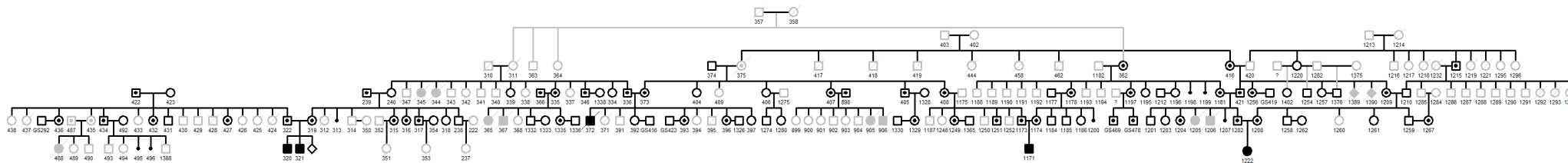
Heredograma do artigo 2 (Figura 2b).



Heredograma do artigo 2 (Figura 2c).



Heredograma incluindo 5 (n° 01, 103, 134, 171 e 538) dos 13 pacientes com MPS VI de Monte Santo/BA.



Heredograma incluindo 5 (n° 320, 321, 372, 1171 e 1222) dos 13 pacientes com MPS VI de Monte Santo/BA.

16. FONTES FINANCIADORAS DO PROJETO

