

Conde E^{1,2}, Siebert M^{1,2,3}, Burin MG², Jardim LB, Giugliani R^{1,2}, Saraiva-Pereira ML^{1,2,3,4}

¹Laboratório de Identificação Genética – Centro de Pesquisa Experimental – HCPA; ²Serviço de Genética Médica – HCPA; ³Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular; ⁴Depto. de Bioquímica – UFRGS (email: mlpereira@hcpa.ufrgs.br)

Introdução

A leucodistrofia metacromática (LDM) é uma doença lisossômica de depósito, de herança autossômica recessiva, caracterizada por degeneração progressiva da mielina e perda axonal no sistema nervoso central e periférico. A LDM é causada pela deficiência da enzima arilsulfatase A (ARSA), enzima responsável por catalisar a hidrólise de esfingolipídios sulfatados. Essa deficiência leva ao acúmulo intralissossômico do substrato não degradado.⁽¹⁾ A LDM é dividida em três formas clínicas, de acordo com a idade de início, a gravidade e progressão dos sintomas: a forma infantil tardia, a forma juvenil e a forma adulta.⁽²⁾

A deficiência enzimática é causada por mutações no gene *ARSA*, o qual se localiza no *locus* 22q13.33 e está dividido em oito éxons distribuídos ao longo de 3.2kb de DNA genômico.⁽³⁾ Várias mutações foram descritas até o momento e associadas à LDM. Além disso, duas mutações nesse gene estão associadas a uma condição denominada Pseudodeficiência de Arilsulfatase A (PD-ASA), que se caracteriza por deficiência enzimática de *ARSA in vitro* em indivíduos normais, isto é, sem manifestações fenotípicas.⁽⁴⁾

Objetivo

O objetivo desse estudo foi identificar as mutações em três famílias com análise bioquímica para LDM e identificar as alterações associadas à PD-ASA.

Materiais e Métodos

Coorte	<ul style="list-style-type: none"> • 3 casos-índice • Respectivos pais e irmãos • Total de 11 pessoas
Isolamento de DNA	<ul style="list-style-type: none"> • 5mL de sangue com EDTA • Através da técnica de precipitação em excesso de sais⁽⁵⁾
Quantificação	<ul style="list-style-type: none"> • Através do método espectrofotômetro <i>NanoDrop</i>
PCR	<ul style="list-style-type: none"> • Amplificação dos oito éxons do gene <i>ARSA</i>, utilizando 4 pares de primers específicos • Resultados da amplificação foram avaliados através de gel de agarose 1,2% (p/v)
Purificação	<ul style="list-style-type: none"> • Amplicons purificados por <i>ExoSAP-IT</i>
Sequenciamento	<ul style="list-style-type: none"> • Amplicons purificados sequenciados usando o kit <i>BigDye Terminator v.3.1</i> • Produtos do sequenciamento purificados e analisados por eletroforese capilar no ABI 3130xl Genetic Analyser

Resultados

O genótipo do primeiro caso-índice foi determinado como c.459+1G>A/p.G127R (Figura 1). Essas duas mutações estão localizadas no éxon 2 do gene e a mutação c.459+1G>A foi transmitida pelo alelo paterno enquanto a mutação p.G127R foi de origem materna.

O segundo caso-índice foi identificado como homozigoto para a mutação c.459+1G>A (genótipo c.459+1G>A/c.459+1G>A) (Figura 2). Essas mutações foram identificadas nos pais desse paciente e a análise de um irmão do paciente identificou que o mesmo é heterozigoto para essa mutação.

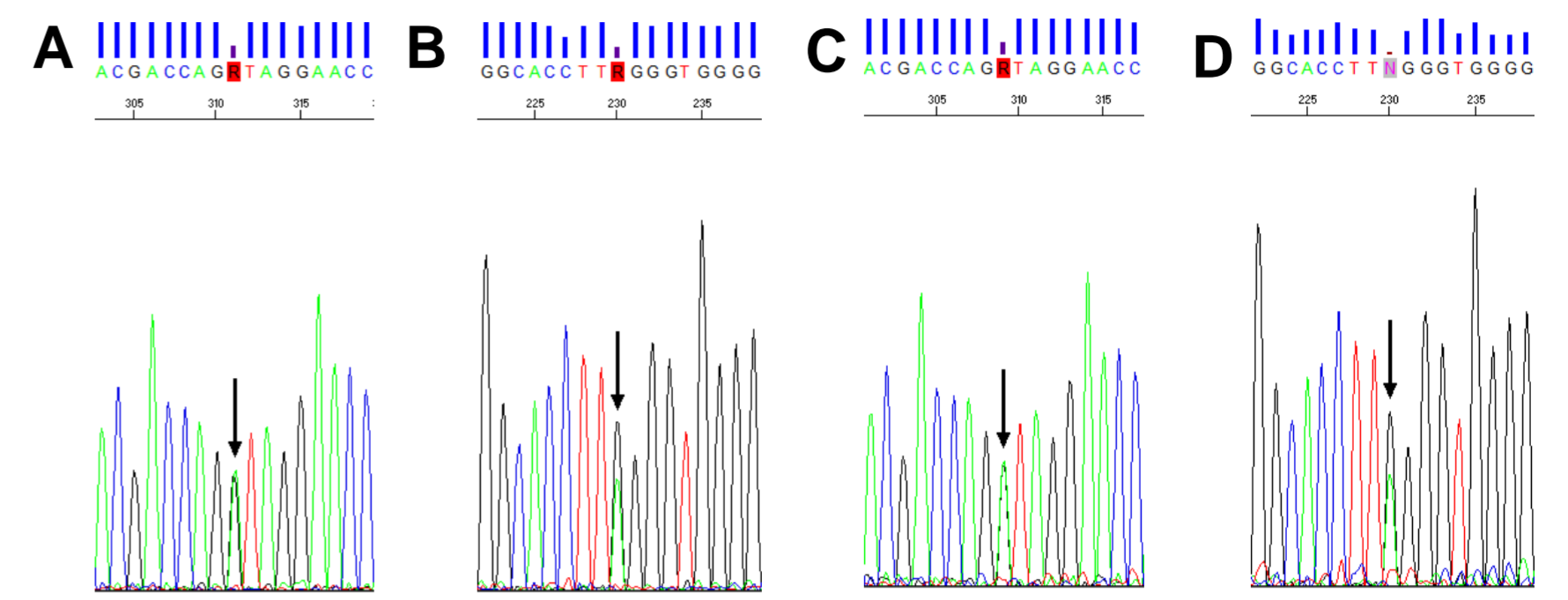


Figura 1. Sequenciamento de DNA, utilizando *primer forward*, do primeiro caso-índice, demonstrando que o paciente é um heterozigoto composta para as mutações c.459+1G>A (A) e a mutação p.G127R (B), sendo a mutação c.459+1G>A de origem paterna (C) e a mutação p.G127R de origem materna (D).

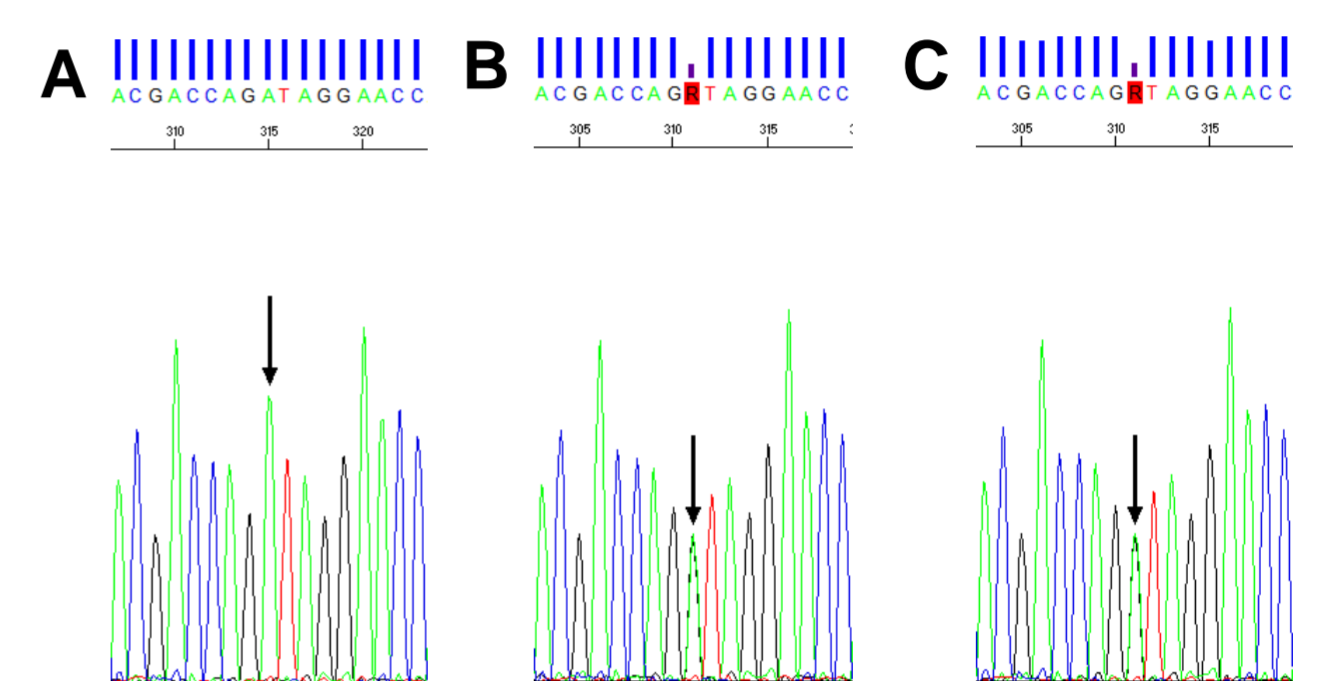


Figura 2. Sequenciamento de DNA, utilizando *primer forward*, do segundo caso-índice, cujo paciente é homozigoto para a mutação c.459+1G>A (A) e a confirmação da presença da mutação no alelo paterno (B) e no alelo materno (C).

O caso-índice da terceira família foi identificado como homozigoto para a mutação p.P426L (genótipo p.P426L/p.P426L), localizada no éxon 8 (Figura 3). Essas mutações foram também identificadas nos pais desse paciente. Entretanto, o pai do paciente também é portador das alterações para PD-ASA (alterações p.N350S e c.1524+95A>G). O irmão do paciente é heterozigoto para as alterações do alelo de PD-ASA, apresentando atividade baixa da atividade enzimática de *ARSA*.

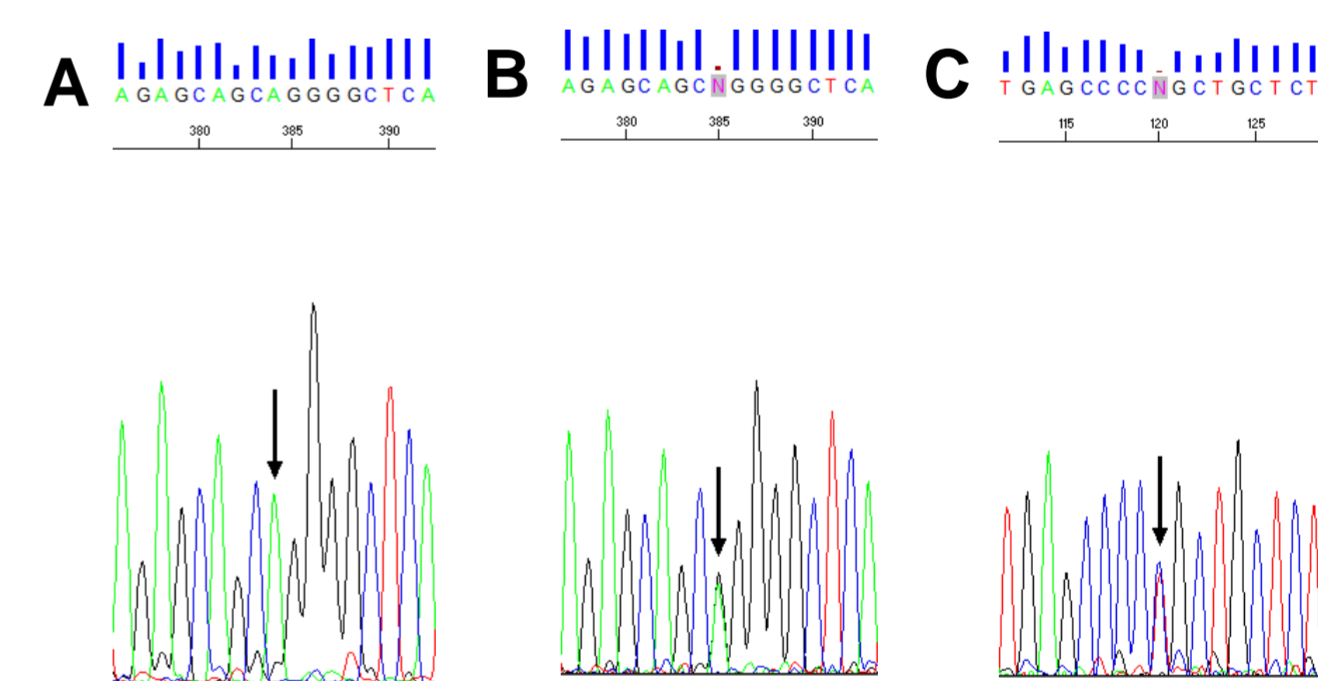


Figura 3. Sequenciamento de DNA, utilizando *primer reverse*, do terceiro caso-índice, cujo paciente é homozigoto para a mutação p.P426L (A) e a confirmação da presença da mutação no alelo paterno (B) e no alelo materno (C) (*primer forward*).

Conclusões

O presente trabalho enfatiza a importância da realização da análise molecular em casos com suspeita clínica de LDM para confirmação dos resultados bioquímicos e para esclarecer todas as alterações presentes no gene *ARSA* em uma família.

Esses dados são essenciais para o aconselhamento genético, assim como para identificação de portadores e para o oferecimento de medidas terapêuticas, como a eventual necessidade de realização de um diagnóstico pré-natal ou para a realização de um transplante de medula óssea.

Referências

1. Rauschka H *et al.* *Neurology* 67: 859–863, 2006.
2. Von Figura K *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 6066-6070, 1983.
3. Niida Y *et al.* *J. Hum. Genet.* 57(10): 687-690, 2012.
4. Marcão A *et al.* *Mol. Genet. Metab.* 79(4): 305-307, 2003.
5. Miller AS *et al.* *Nucleic Acids Res.* 16(3): 1215, 1988.