

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**DETECÇÃO DE MUTAÇÕES EM PACIENTES COM  
MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO I (MPS I)**

*Franciele Dall’Bello Pessutto*

Orientador: Roberto Giugliani

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas – Bioquímica como requisito parcial para obtenção do título de  
Mestre em Bioquímica

Porto Alegre, novembro de 2007.



“Não Desanimem... Imita os mestres de  
exercícios,  
que, quando um aluno cai, manda que  
se levante e lute novamente.”

Epiteto

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Roberto Giugliani, por sua prontidão, confiança e pelas oportunidades concedidas.

À Dra. Ursula da Silveira Matte, que foi parte fundamental para realização deste trabalho. Por estar sempre disponível para auxiliar-me em todos os momentos que precisei.

A todos os colegas do Laboratório de Terapia Gênica do Centro de Pesquisas do HCPA, pela paciência, carinho, bom humor e por todos momentos agradáveis que vocês proporcionaram.

Ao pessoal do Serviço de Genética Médica – HCPA –UFRGS e do departamento de Bioquímica - ICBS – UFRGS, pela disponibilização da estrutura e dos serviços necessários.

Aos amigos (não mencionarei, que são muitos e estão no meu coração), pela amizade sincera, pelas palavras de consolo, pelo encorajamento, incentivo e parceria nas horas que tanto precisei.

Ao Roni por seu apoio, amor incondicional nestes últimos meses. Sem esquecer da paciência e compreensão nos momentos mais difíceis. E principalmente por dar-me o equilíbrio emocional que necessitava e foi imprescindível para finalização deste trabalho.

Aos meus pais, Olívio e Vildete, e meus irmãos, Óliver e Nicolas, pelo estímulo, amor e por compreenderem que apesar da distância e a ausência, o carinho continuou vivo. A vocês dedico com muito carinho este trabalho e agradeço pelo apoio constante em todos momentos da minha vida. Amo vocês.

## SUMÁRIO

	Pg
Lista de Abreviaturas	VI
Lista de Tabelas	VII
Lista de Figuras	VIII
Resumo	IX
<i>Abstract</i>	X
1. Introdução	1
1.1 Doenças Lisossômicas de Depósito	1
1.2 Mucopolissacaridoses	1
1.3 Mucopolissacaridose Tipo I	4
1.3.1 Histórico	4
1.3.2 Epidemiologia	6
1.3.3 Aspectos Clínicos	6
1.3.3.1 Síndrome de Hurler	7
1.3.3.2 Síndrome de Hurler-Scheie	7
1.3.3.3 Síndrome de Scheie	8
1.3.4 Tratamento	8
1.3.5 Aspectos Bioquímicos e Diagnóstico	12
1.3.6 Aspectos Moleculares	15
1.3.6.1 Mutações Descritas	15
1.3.6.2 Frequência das Mutações	16
1.3.6.3 Polimorfismos	17
1.3.6.4 Correlação Genótipo-Fenótipo	18
2. Objetivos	21
3. Artigo: <i>Mutational analysis of the <math>\alpha</math>-L-iduronidase gene in Brazilian Type I Mucopolysaccharidosis patients: frequency of known mutations and identification of five novel mutations.</i>	22
4. Discussão	41
5. Conclusões	52

6. Perspectivas	53
7. Referências Bibliográficas	54
8. Anexo	65

## LISTA DE ABREVIATURAS

DL	Doenças Lisossômicas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
GAGs	Glicosaminoglicanos
H	Hurler
H/S	Hurler-Scheie
IDUA	$\alpha$ -L-iduronidase
MGS	<i>Medical Genetics Service</i>
MPS	Mucopolissacaridose
MPS I	Mucopolissacaridose Tipo I
MPS IH	Síndrome de Hurler
MPS IH/S	Síndrome de Hurler-Scheie
MPS IS	Síndrome de Scheie
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
S	Scheie
SSCP	<i>Single Strand Conformational Polymorphism</i>
Taq DNA polimerase	DNA Polimerase de <i>Thermus aquaticus</i>
TCTH	Trasplante de células tronco hematopoiéticas
TRE	Terapia de Reposição enzimática

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação das Mucopolissacaridoses (MPS) com indicação do acúmulo de glicosaminoglicanos (GAGs) na urina e deficiência enzimática	4
---	---



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Rota de degradação do dermatan (A) e heparan (B) sulfato nos lisossomos	14
Figura 2: Fluxograma da pesquisa de mutações em 25 pacientes com MPS I.	42
Figura 3: Comparação da seqüência de aminoácidos da $\alpha$ -L-iduronidase em diferentes espécies	47

## RESUMO

Mucopolissacaridose tipo I (MPS I) é causada por uma deficiência na enzima  $\alpha$ -L-iduronidase (IDUA), que está envolvida na metabolização de heparan e dermatan sulfato. Existem três fenótipos clínicos, que vão desde a forma grave, Hurler, caracterizada por anormalidades esqueléticas, hepatosplenomegalia e retardo mental grave. O fenótipo intermediário é caracterizado por um envolvimento somático progressivo, incluindo disostose múltipla, com pouco ou nenhum comprometimento neurológico. Já no fenótipo leve, ou Scheie, está presente doença cardíaca valvular, opacificação da córnea, limitadas anormalidades esqueléticas, mas ausência de retardo mental.

Neste estudo, investigamos um grupo de 25 pacientes, diagnosticados com a MPS I, que foram inicialmente analisados para 6 mutações recorrentes, (W402X, P533R, R383H, R89Q, A327P e Q70X). Os pacientes não genotipados, após a análise das mutações conhecidas, foram analisados por SSCP e, aqueles com um padrão de migração de SSCP anormal foram seqüenciados. A análise mutacional confirmou uma elevada prevalência de W402X e P533R (28% e 18%). Os seqüenciamentos resultaram na identificação de cinco mutações previamente conhecidas e cinco mutações novas. O genótipo foi completamente definido em 60% (15/25) dos pacientes brasileiros e 76% dos alelos foram determinados.

Assim, o nosso estudo mostrou que apesar da prevalência de W402X e P533R na população brasileira com MPS I, há ainda um grande número de mutações únicas para cada pacientes MPS I, ressaltando as dificuldades rastreamento de mutações para esta desordem em populações mistas.

## ABSTRACT

Mucopolysaccharidosis type I (MPS I) is caused by a deficiency of the enzyme  $\alpha$ -L-iduronidase (IDUA), which is involved in the breakdown of dermatan and heparan sulphates. There are three clinical phenotypes, ranging from the severe Hurler form characterized by skeletal abnormalities, hepatosplenomegaly and severe mental retardation, to the milder Scheie phenotype in which there is cardiac valve disease, corneal clouding, limited skeletal problems, but no mental retardation. The intermediate form of MPS I (Hurler/Scheie) is characterized by progressive somatic involvement, including dysostosis multiplex, with little or no intellectual dysfunction.

In this study, we have investigated a group of 25 patients, diagnosed with the MPS I that were screened for 6 known mutations (W402X, P533R, R383H, R89Q, A327P and Q70X). Patients not genotyped, after the analysis of known mutations, were analyzed by SSCP and those with an abnormal SSCP migration pattern were sequenced. Mutational analysis confirmed a high prevalence of W402X and P533R (28% and 18%). Sequencing resulted in the identification of five known mutations and five previously unknown sequence changes. The genotype was fully defined in 60% (15/25) of Brazilian patients and 76% of alleles was determined.

In addition, our study has show that, despite the prevalence of W402X and P533R in the Brazilian MPS I population, there is still a large number of mutations unique to individual MPS I patients, highlighting the difficulties of mutation screening for this disorder in mixed populations.

## **1. INTRODUÇÃO**

### **DOENÇAS LISSÔMICAS DE DEPÓSITO**

As doenças lisossômicas (DL) são Erros Inatos do Metabolismo que possuem uma patofisiologia comum na qual há uma deficiência total ou parcial de uma enzima específica. Esta deficiência causa um acúmulo gradual lisossomal de macromoléculas complexas não metabolizadas como: cerebrosídeos, gangliosídeos, glicogênio, glicoproteínas ou mucopolissacarídeos (Hartung et al., 2004). As DL apresentam uma incidência mundial de aproximadamente 1:7700 nascidos vivos (Meikle et al., 1999).

A gravidade das DL dependerá do tipo e da quantidade de macromoléculas acumuladas nas células dos tecidos envolvidos e das conseqüências patológicas dessa alteração. Na maioria das DL, o depósito de compostos não degradados no lisossomo inicia na vida fetal e torna-se clinicamente evidente nos 2 primeiros anos de vida. A maioria destas doenças caracteriza-se por seu curso progressivo, com alta morbidade e aumento da mortalidade, muito embora existam variações significativas entre as diferentes doenças e entre pacientes com a mesma doença (Colombo e Cabello, 2003).

### **1.2. MUCOPOLISSACARIDOSES**

As mucopolissacaridoses são um grupo de doenças autossômicas recessivas caracterizadas por um acúmulo de mucopolissacarídeos (glicosaminoglicanos – GAGs) não degradados ou parcialmente degradados devido à deficiência de enzimas lisossomais específicas (Neufeld e Muenzer, 2001). Dependendo da deficiência enzimática, o

metabolismo de dermatan sulfato, heparan sulfato, queratan sulfato, condroitin sulfato ou hialuronan (ácido hialurônico) pode ser bloqueado isoladamente ou em combinação. Há onze deficiências enzimáticas conhecidas que levam a sete distintas MPS. Este grupo de doenças apresenta um amplo espectro de severidade clínica, inclusive para uma mesma deficiência enzimática (Neufeld e Muenzer, 2001).

Os GAGs, anteriormente denominados mucopolissacarídeos, são formados por cadeias polissacarídias ácidas, não ramificadas, compostas por repetições de dissacarídeos. A sua denominação é devida ao fato de um dos açúcares sempre possuir um grupamento amina (N-acetilglicosamina ou N-acetilgalactosamina). O outro açúcar é geralmente um ácido urônico.

Os GAGs são componentes da matriz extra-celular onde apresentam-se com exceção do ácido hialurônico, covalentemente ligados a uma matriz protéica específica formando um grupo diverso de macromoléculas denominados proteoglicanos. Esta estrutura dá elasticidade aos tecidos e capacita-os a manter sua conformação característica. Existe um contínuo *turn-over* celular de proteoglicanos. Pouco se sabe sobre a regulação deste processo mas o sistema lisossomal é claramente um integrante da homeostase da matriz extracelular (Winchester, 1996). Os glicosaminoglicanos são produtos da degradação celular dos proteoglicanos, que constituem as formas macromoleculares dos GAGs na matriz extracelular (Sánchez e Fuentes, 2006). A degradação dos proteoglicanos inicia-se pela sua clivagem por proteases extracelulares. A degradação intracelular subsequente é feita pela ação sequencial das enzimas lisossomais (Winchester, 1996). A degradação lisossomal produz monossacarídeos e sulfato inorgânico (Hopwood e Morris, 1990).

A deficiência de qualquer enzima envolvida na degradação lisossomal de GAGs causa o acúmulo de substrato parcialmente degradado nos lisossomos levando aos diferentes tipos de MPS (Tabela 1). O acúmulo dos GAGs nos tecidos causam diretamente algumas das manifestações clínicas tais como: face grosseira, visceromegalia e espessamento cutâneo. Outras manifestações clínicas, como deficiência mental e o retardo do crescimento, são resultados de alteração da função celular que o acúmulo de GAGs provoca. Por último, os GAGs podem interferir diretamente na estrutura de substâncias como o colágeno, levando a sintomas de contratura articular (Neufeld e Muenzer, 2001).

Os GAGs não degradados ou parcialmente degradados, além de acumular-se nos lisossomos, provocam um aumento na excreção de GAGs na urina, o que permite fazer o diagnóstico bioquímico de MPS. A identificação de GAGs urinários pode ajudar a discriminar entre as classes de mucopolissacarídeos, no entanto não possibilita distinguir entre os subgrupos (Ex: MPS III A, B ou C). O diagnóstico definitivo é estabelecido por ensaio enzimático, geralmente empregando-se pele (fibroblasto) ou sangue com a utilização de um substrato artificial (cromogênico ou fluorogênico) (Neufeld e Muenzer, 2001; Sánchez e Fuentes, 2006).

Tabela 1 – Classificação das Mucopolissacaridoses (MPS) com indicação do acúmulo de glicosaminoglicanos (GAGs) na urina e deficiência enzimática (adaptado de Neufeld e Muenzer, 2001).

Tipos de MPS	Epônimo	GAG em excesso na urina	Enzima deficiente
MPS I H	Síndrome de Hurler	dermatan sulfato e heparan sulfato	$\alpha$ -L-iduronidase
MPS I S	Síndrome de Scheie	dermatan sulfato e heparan sulfato	$\alpha$ -L-iduronidase
MPS I H-S	Síndrome de Hurler-Scheie	dermatan sulfato e heparan sulfato	$\alpha$ -L-iduronidase
MPS II	Síndrome de Hunter	dermatan sulfato e heparan sulfato	Iduronato sulfatase
MPS III A	Síndrome de Sanfilippo A	heparan sulfato	Heparan N-sulfatase
MPS III B	Síndrome de Sanfilippo B	heparan sulfato	$\alpha$ -N-acetilglicosaminidase
MPS III C	Síndrome de Sanfilippo C	heparan sulfato	Acetil CoA: $\alpha$ -glicosaminídeo Acetiltransferase
MPS III D	Síndrome de Sanfilippo D	heparan sulfato	N-acetilglicosamina 6-sulfatase
MPS IV A	Síndrome de Mórquio A	queratan sulfato	Galactose-6-sulfatase
MPS IV B	Síndrome de Mórquio B	queratan sulfato	$\beta$ -galactosidase
MPS VI	Síndrome de Maroteaux-Lamy	dermatan sulfato	Arilsulfatase B
MPS VII	Síndrome de Sly	dermatan sulfato e heparan sulfato	$\beta$ –glicuronidase
MPS IX	-	Hialuronan	Hialuronidase

## 1.3 MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO 1

### 1.3.1 Histórico

A descrição original da Síndrome de Hurler foi publicada em 1919 por Gertrud Hurler que relatou dois casos não relacionados com múltiplas anormalidades esqueléticas, opacidade de córnea, hepatoesplenomegalia e faces grosseiras (Hurler, 1919; Hopwood e Morris, 1990). Este fenótipo ficou conhecido como gargolismo e posteriormente síndrome

de Hurler. Em 1962, Scheie e cols. descreveram dez pacientes com uma variante da síndrome de Hurler. Os pacientes apresentavam opacidade da córnea, inteligência normal, rigidez articular e anormalidades ósseas e faciais em grau leve.

Inicialmente as Síndromes de Hurler e Scheie foram consideradas duas entidades clínicas distintas (MPSI e MPSV). Estudos de complementação com fibroblastos utilizando um substrato radioativo demonstraram que as Síndromes de Hurler e Scheie eram devidas à mesma deficiência enzimática (Wiesmann e Neufeld, 1970). Dois anos mais tarde, Bach e cols. (1972) caracterizaram o fenótipo bioquímico das síndromes de Hurler e Scheie como sendo devido à deficiência da enzima  $\alpha$ -L-iduronidase (IDUA). A partir de então, abandonou-se a denominação de MPSV para Síndrome de Scheie e passou-se a utilizar a denominação de MPS IH e MPS IS, uma vez que as síndromes de Hurler e Scheie representavam fenótipos extremos de uma mesma doença. A proposta de existir um espectro de mutações afetando diferentemente a atividade enzimática foi sugerida por Schuchman e Desnick (1988).

Em 1990, Scott e cols., identificaram a localização do gene da  $\alpha$ -L-iduronidase, permitindo a análise molecular e reforçando esta última interpretação. A identificação de várias mutações no gene IDUA tem sido relacionada com as formas clínicas da doença (estudos de correlação genótipo-fenótipo). Atualmente, acredita-se que haja um espectro contínuo de manifestações fenotípicas, cada uma correspondendo a combinações genotípicas específicas (Neufeld e Muenzer, 2001).



### **1.3.2 Epidemiologia**

A MPS I é uma patologia rara, com incidência variável, segundo diferentes autores. A incidência de MPS IS é estimada entre 1:600.000 nascidos vivos (Neufeld e Muenzer, 2001) e de MPS IH/S em 1:279.839 (Nelson, 1997). Um amplo estudo realizado no Canadá estimou a frequência de MPS IH em 1:144.000 nascidos vivos (Lowry et al., 1990), enquanto na Irlanda do Norte este valor foi de 1:76.320 nascidos vivos (Nelson, 1997). Dados obtidos no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre sugerem uma incidência da MPS I em 1:106.000 em todo país (Beiguelman, 1994). Devido à necessidade de centros especializados para realizar a confirmação do diagnóstico por ensaio enzimático e à morte precoce dos pacientes, torna-se difícil estimar com precisão a real incidência de MPS I.

### **1.3.3 Aspectos clínicos**

A MPS I é uma doença herdada de forma autossômica recessiva causada por uma deficiência de IDUA. Os sintomas clínicos eventualmente resultam a partir do estoque lisossomal de glicosaminoglicanos degradados parcialmente. Sendo assim as manifestações clínicas são heterogêneas, sendo reconhecidas três formas principais: MPS IH ou Síndrome de Hurler (forma grave), MPS IS ou Síndrome de Scheie (forma leve) e MPS IH/S ou Síndrome de Hurler-Scheie (forma intermediária).

### **1.3.3.1 Síndrome de Hurler**

A Síndrome de Hurler representa a forma grave de MPS I, de progressão muito rápida com envolvimento de múltiplos órgãos e tecidos que leva à morte precoce dos pacientes usualmente antes dos 10 anos de vida, normalmente por problemas cardiorrespiratórios. Os recém nascidos afetados apresentam um fenótipo normal. O diagnóstico é comumente feito entre 4 e 18 meses de idade (Neufeld e Muenzer, 2001).

Os primeiros sinais clínicos característicos incluem hepatoesplenomegalia, rigidez articular, retardo no desenvolvimento neuropsicomotor, deformidades esqueléticas, opacidade de córnea e perda de audição. Outros sintomas característicos incluem as alterações esqueléticas, conhecidas como disostose múltipla (macrocefalia, giba tóraco-lombar, falanges curtas e com forma trapezoidal), hérnias umbilicais e/ou inguinal que podem estar presentes ao nascimento, infecções recorrentes das vias aéreas superiores e face grosseira. (Neufeld e Muenzer, 2001; Sánchez e Fuentes, 2006)

O retardo no crescimento aparece a partir do primeiro ano de vida e os pacientes raramente superam os 120 cm no final do primeiro ano (Sánchez e Fuentes, 2006). O atraso psicomotor se torna evidente durante o segundo ano de vida e é geralmente profundo com uma deterioração progressiva das funções motoras adquiridas, com ausência quase total de linguagem. A partir do primeiro ano de vida também há uma progressiva opacificação da córnea e perda da audição (Neufeld e Muenzer, 2001).

### **1.3.3.2 Síndrome de Hurler-Scheie**

O fenótipo intermediário da MPS I é caracterizado por um envolvimento somático progressivo, incluindo disostose múltipla, com pouco ou nenhum comprometimento neurológico. (Neufeld e Muenzer, 2001) Um aspecto peculiar

característico da face do paciente é a presença de micrognatia (queixo e mordida retraídos) (Sánchez e Fuentes, 2006). A inteligência é normal. O aparecimento dos primeiros sintomas ocorre a partir dos 3 anos de idade, com opacificação da córnea, perda da audição, enrijecimento articular e problemas cardíacos. A sobrevivência até a idade adulta é comum, sendo que as complicações cardíacas e a obstrução das vias aérea superiores são as principais causas de morte (Neufeld e Muenzer, 2001).

### **1.3.3.3 Síndrome de Scheie**

A forma leve da MPS I caracteriza-se por rigidez articular (“mãos de garra”), valvulopatia aórtica, opacidade da córnea e outras poucas complicações, como surdez, hérnia umbilical e inguinal e glaucoma. A face grosseira é característica, mas a estatura e a inteligência são normais. O início dos primeiros sintomas ocorre em geral aos 5 anos de idade, e o diagnóstico é feito entre 10 e 20 anos de idade (Neufeld e Muenzer, 2001; Sánchez e Fuentes, 2006). A longevidade é praticamente normal (Neufeld e Muenzer, 2001).

### **1.3.4 Tratamento**

Até o momento, não há um tratamento eficaz e curativo para todas as manifestações clínicas da doença, limitando-se a medidas gerais de suporte. Além destas, alternativas preventivas, como o aconselhamento genético e o diagnóstico pré-natal, devem ser oferecidos às famílias afetadas. As duas abordagens terapêuticas propostas atualmente para MPS I podem ser divididas da seguinte forma: transplante de medula óssea e terapia de reposição enzimática.

O transplante de células tronco hematopoéticas (TCTH) tem sido empregado como um tratamento para a síndrome de Hurler desde 1981 (Hobbs et al., 1981). Este tratamento baseia-se no fato de que a enzima produzida pelas células do tratamento é liberada no plasma e pode ser absorvida por células enzimaticamente deficientes. A expectativa de vida é aumentada, e muitas das anormalidades sistêmicas são melhoradas após o transplante (Hobbs et al., 1981; Hugh et al., 1989). Entre os resultados positivos estão especialmente os que se referem às alterações viscerais, com redução da hepatoesplenomegalia e opacidade da córnea (Peters et al., 1996), diminuição das complicações cardíacas, com regressão da hipertrofia ventricular (Braunlin et al., 2003), melhora na audição e a deteriorização mental torna-se mais lenta (Hobbs et al., 1981; Hugh et al., 1989; Whitley et al., 1993; Peters et al., 1996; Peters et al., 1998). No entanto, quanto à função neurológica, as alterações presentes pré-transplante parecem ser irreversíveis (Whitley et al., 1993; Neufeld e Muenzer, 2001). De um modo geral, os indivíduos que apresentam menor comprometimento intelectual antes do transplante respondem melhor ao tratamento, mantendo ou melhorando seus níveis de aquisição mental. Já os pacientes com coeficiente de inteligência (Q.I.) inferior a 70 mantêm o déficit cognitivo após o transplante (Peters et al., 1996). Em relação às desordens músculo-esqueléticas na síndrome de Hurler, o TCTH não parece alterar a história natural (Weisstein et al., 2004), sugerindo dificuldade de acesso da enzima à cartilagem (Vellodi et al., 1997).

O fator mais importante para o sucesso do transplante em pacientes portadores de MPS é a importância do diagnóstico precoce e o rápido encaminhamento para centro especializados. Devido a estes e outros fatores, tais como a demora em encontrar doadores compatíveis e a grande possibilidade de complicações, esta terapia tem sido progressivamente substituída pela Terapia de Reposição Enzimática (TRE).

A TRE consiste na administração direta da enzima no paciente e tem sido utilizada com sucesso em várias DLs. Esta terapêutica foi recomendada inicialmente para pacientes com Síndrome de Hurler-Scheie e Scheie (Muenzer e Fisher, 2004), apesar de já existirem estudos promissores mostrando melhoras clínicas em pacientes com a forma grave da doença inclusive naqueles com danos neurológicos (Tokic et al., 2007, Wraith et al., 2007).

O primeiro estudo de TRE com  $\alpha$ -L-iduronidase humana começou em 1997. Os resultados, depois de 1 ano de tratamento, mostraram reduzir os níveis de estoque lisossomal e alguns melhoras clínicas (Kakkis et al., 2001). Dados publicados atualmente (Sifuentes et al., 2007) mostram o acompanhamento de 5 pacientes com MPS I (4 com Hurler-Scheie e 1 com Scheie) em tratamento com terapia de reposição enzimática por 6 anos, que começaram o tratamento com idades entre 9 e 14 anos. Entre os resultados deste estudo, os pacientes apresentaram uma diminuição no aparecimento da apnéia do sono; normalização do tamanho do fígado, redução do volume do baço e níveis de GAG urinários próximos do normal, o que pode estar correlacionado com o “clearance” de GAG dos tecidos. Os pacientes ainda apresentaram um substancial crescimento e ganho de peso, a visão permaneceu normal, e mudanças na opacificação da córnea foram pequenas. Entretanto, todos apresentaram uma piora em um ou mais sintomas neurológicos pré-existentes. Todos os pacientes acompanhados desenvolveram reações alérgicas à enzima administrada.

Recentemente, outro estudo com 16 pacientes com síndrome de Hurler e quatro com Hurler-Scheie, todos com menos de 5 anos, mostrou que no paciente mais jovem com Síndrome de Hurler (<2,5 anos) e em todos com Hurler-Scheie, o desenvolvimento mental

apresentou-se normal, após 1 ano de tratamento com TRE. A proporção de pacientes com problemas cardíacos apresentou um decréscimo, assim como o fígado e baço apresentaram uma diminuição do tamanho (Wraith et al., 2007). Outro estudo demonstrou que a TRE não foi capaz de reverter às alterações esqueléticas provocadas pela doença em seis pacientes com Síndrome de Hurler-Scheie em tratamento durante um ano (Cox-Brinkman et al., 2007).

A TRE não é curativa e não pode melhorar todos os órgãos e sistemas no indivíduo quando as alterações irreversíveis já estão estabelecidas, entretanto o tratamento precoce pode prevenir a progressão em alguns aspectos relacionados com a doença melhorando a qualidade de vida dos pacientes. A TRE, de uma forma geral, demonstrou melhorar a função cardíaca e a força total do músculo, diminuiu o tamanho do fígado e baço dos pacientes com MPS I, no entanto, a grande dificuldade da TRE para esta e todas outras desordens similares é que infelizmente não é possível reverter às modificações neurológicas causadas pela doença.

Apesar da TRE ser a terapêutica atual mais segura, o acesso da enzima ao cérebro ainda parece ser o maior desafio para esta terapêutica, assim como para o TCTH, mesmo sabendo que teoricamente as células derivadas do doador são capazes de atravessar a barreira hemato-encefálica. O fato da administração da enzima ter que ser semanalmente também pesa na busca de novas estratégias. Com o objetivo de tentar vencer estes e outros desafios, surge a possibilidade da terapia gênica.

A terapia gênica para doenças lisossômicas de depósito exige vetores que permitam que os níveis de expressão da enzima relevante sejam mantidos dentro de certos limites. Vários estudos de terapia gênica em modelos animais de MPS têm sido realizado usando uma variedade de vetores virais e não virais; tais como vetores lentivirus

(Kobayashi et al., 2005; Di Domenico et al., 2005); vírus adenoassociados (Hartung et al., 2004); e retrovírus (Liu et al., 2005).

### **1.3.5 Aspectos Bioquímicos e Diagnóstico**

A enzima  $\alpha$ -L-iduronidase, deficiente na MPS I, é responsável pela degradação de dermatan sulfato e heparan sulfato. Esta enzima é uma glicosidase que hidroliza a extremidade não redutora dos resíduos terminais de ácido- $\alpha$ -L-idurônico. O ácido L-idurônico representa 80% do ácido urônico do dermatan sulfato, ao contrário do heparan sulfato, em que o ácido glicurônico é o principal componente. Portanto, verifica-se na urina dos pacientes um maior acúmulo de dermatan sulfato do que de heparan sulfato (Hopwood e Morris, 1990; Neufeld e Muenzer, 2001).

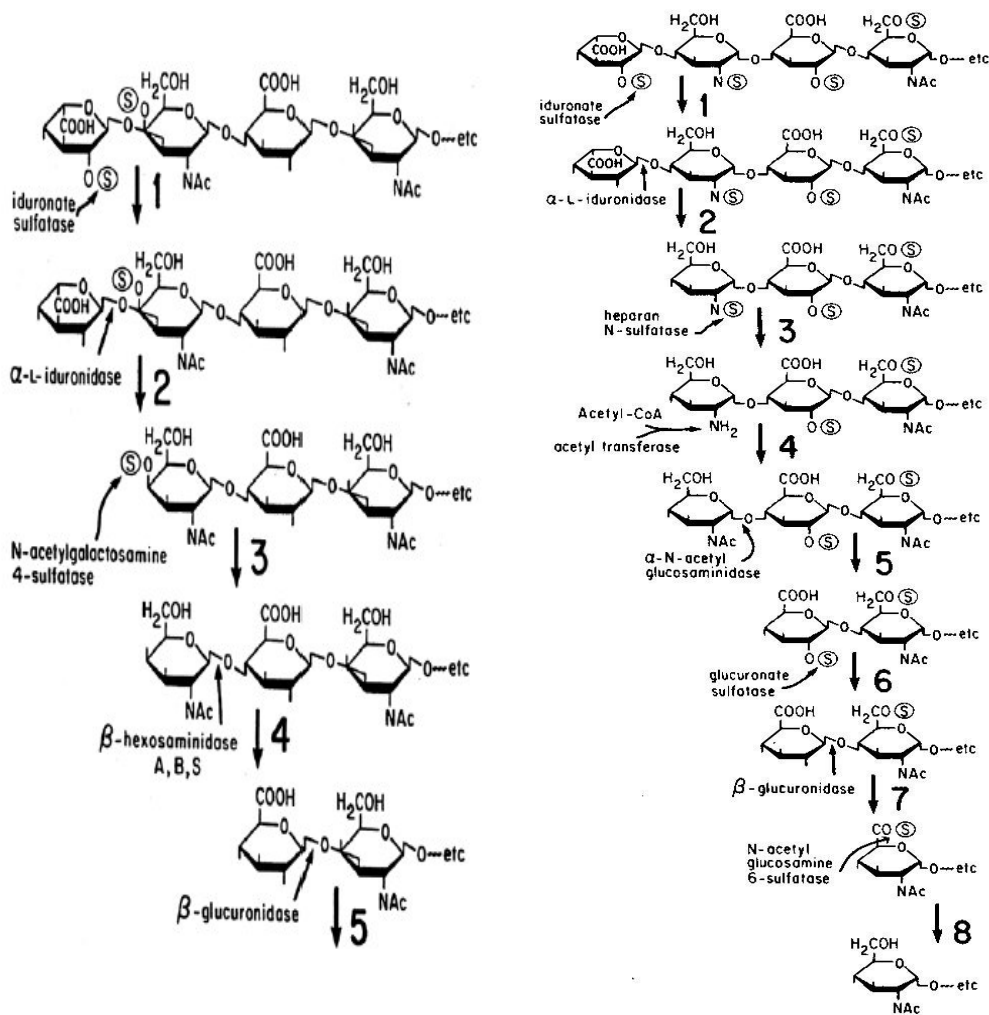
O heparan sulfato, composto principalmente por ácido glicurônico e glicosaminas, forma proteoglicanos associados à membrana plasmática e é catabolizado com uma meia vida de 4 a 6 horas. O dermatan sulfato, composto por ácido L-idurônico e N-acetilgalactosamina sulfatada, é encontrado na matriz de diferentes tecidos conectivos, como parede de vasos sanguíneos, tendões e válvulas cardíacas, além da córnea (Hopwood e Morris, 1990; Elbein e Kaushal, 1999). O heparan sulfato está associado à membrana plasmática de diferentes tipos celulares, inclusive neurônios, onde foi encontrado como componente das vesículas sinápticas (Murray e Keeley, 1998). A enzima iduronato-2-sulfatase é a primeira enzima lisossomal na rota de degradação desses dois GAGs, produzindo o substrato no qual atua a IDUA (Hopwood e Morris, 1990; Neufeld e

Muenzer, 2001). As figuras 1.A e 1.B representam a rota de degradação seqüencial do dermatan e heparan sulfato no lisossomas.

Como todas as enzimas lisossomais, a IDUA apresenta sítios de glicosilação aos quais são adicionados resíduos de manose-6-fosfato, responsáveis pelo correto endereçamento da proteína para o lisossomo. O pH ótimo de atividade da enzima varia de 4,0 a 4,5 (Schuchman e Desnick, 1988). O peso molecular varia de acordo com o tecido estudado e os processos de maturação proteolítica presentes em cada um deles (Taylor et al., 1991).

Pacientes com MPS I são clinicamente normais ao nascimento, embora possam apresentar hérnias e peso aumentado, especialmente na forma grave (Schwartz, 2000). Após a suspeita clínica, geralmente por retardo do desenvolvimento neuropsicomotor, visceromegalia ou presença de características faciais sugestivas da doença, a confirmação do diagnóstico é feita por análise laboratorial.





A)

B)

Figura 1 – Rota de degradação do dermatan (A) e heparan (B) sulfato nos lisossomos. (adaptado de Neufeld e Muenzer, 2001).

Tentativas de distinção entre os três fenótipos clínicos por métodos bioquímicos não têm sido bem sucedidas (Hopwood e Morris, 1990; Ashton et al., 1992; Scott et al., 1995; Neufeld e Muenzer, 2001). Com relação à excreção de GAGs, não existem meios de quantificar precisamente a quantidade dos tipos excretados para que se possa estabelecer uma relação entre o conteúdo de dermatan e heparan sulfato na urina. A atividade da IDUA

em pacientes com as três formas da doença é cerca de 0,1% do valor normal (Clements et al., 1989).

Atualmente, os testes bioquímicos utilizados na rotina de diagnóstico de MPS I baseiam-se na investigação de metabólitos e ensaios enzimáticos. Em relação à investigação de metabólitos, três testes são realizados: azul de toluidina, teste semi-quantitativo que analisa a presença de mucopolissacarídeos na urina; dosagem de mucopolissacarídeos e cromatografia de mucopolissacarídeos específicos. Os ensaios enzimáticos em plasma podem ser fluorimétricos, colorimétricos ou por radioisótopos (Wajner et al., 2001).

### **1.3.6 Aspectos Moleculares**

O gene da IDUA foi mapeado no braço curto do cromossomo 4, na região 4p16.3, a 600Kb do telômero (Scott et al., 1990). O gene possui aproximadamente 19Kb com 14 éxons, que originam um mRNA de 2,3Kb (Scott et al., 1992a). O gene possui uma sequência aberta de leitura de 1959 pb codificando um precursor de 653 aminoácidos. Um peptídeo-sinal de 26 aminoácidos é clivado imediatamente antes da região amino-terminal da proteína madura. Assim, a proteína funcional possui 627 aminoácidos e seis sítios potenciais de glicosilação (Scott et al., 1991).

#### **1.3.6.1 Mutações descritas**

A primeira mutação descrita no gene da IDUA foi W402X, encontrada em 31% dos alelos de uma amostra de 64 pacientes (Scott et al., 1992a). Pouco tempo depois foram

descritas as mutações Q70X e P533R, totalizando 53% dos alelos de MPS I estudados até então e definindo 28% dos genótipos dos afetados (Scott et al., 1992b). Atualmente foram descritas no gene da IDUA humana 110 mutações (The Human Gene Mutation Database, outubro, 2007). Entre as mutações descritas 19 são sem sentido, 56 são com sentido trocado e 8 ocorrem em sítios de *splice*. Além disto, 18 pequenas deleções e seis inserções, variando de 1 a 12pb, foram identificadas.

### **1.3.6.2 Frequência das mutações**

De acordo com a população em estudo, a frequência das diferentes mutações varia grandemente. Entre a população caucasóide, as duas mutações mais frequentes são a W402X e a Q70X que juntas representam 61% a 72% dos alelos (Bunge et al., 1994; Beesley et al., 2001). Entretanto é possível observar uma diferença entre os países do norte da Europa e os países mediterrâneos, quanto à frequência das mutações. A mutação Q70X é mais freqüente na Escandinávia (Bunge et al., 1995) e na Rússia (Voskoboeva et al., 1998), enquanto que W402X é mais freqüente na Espanha (Gort et al., 1998). Esta mutação apresenta frequências muito similares na Austrália (Scott et al., 1992a), Inglaterra (Meaney et al., 1996) e Estados Unidos (Clarke et al., 1994a), variando em torno de 60% a 43%, já, em pacientes italianos, a W402X está presente em torno de 11%. Estes dados podem sugerir uma origem anglo-saxônica ou celta para a mutação.

A mutação P533R assume uma importância maior no sul da Europa. Em pacientes espanhóis ela é a segunda mais freqüente, presente em 10% dos alelos (Gort et al., 1998), o mesmo ocorrendo na Itália (Gatti et al., 1997). No Marrocos, P533R é a mutação mais freqüente, presente em 92% dos alelos (Alif et al., 1999). As mutações W402X, Q70X e P533R estão ausentes em estudos realizados em pacientes árabes em

Israel que apresentam duas outras mutações mais freqüentes: T366P e Y64X (Bach et al., 1993).

Por outro lado, a análise de pacientes orientais demonstra resultados distintos. Em pacientes japoneses as mutações mais freqüentes foram R89Q e 704ins5, sendo que as mutações W402X e Q70X não foram encontradas em nenhum paciente (Yamagishi et al., 1996). Entre chineses a mutação mais comum foi T364M, presente em 50% dos alelos (Lee-Chen et al., 1997). Em pacientes coreanos, 704ins5 e L346R foram as principais mutações encontradas (Lee et al., 2004).

No Brasil, um estudo realizado por Matte e cols. (2003), mostrou que as duas mutações mais freqüentes foram W402X e P533R, com 37% e 11,6% respectivamente. W402X é a mutação mais comum em pacientes caucasianos, no entanto, a mutação P533R só foi encontrada com a mesma freqüência do Brasil em pacientes italianos e espanhóis (Gort et al., 1998; Gatti et al., 1997). Mutações como R89Q e Q70X, apresentaram freqüências relativamente baixas (3,3% e 1,6% respectivamente) quando comparados com estudos em outras populações européias. Desta forma, estes dados refletem a origem da população brasileira através das recentes imigrações de espanhóis, italianos e alemães.

### **1.3.6.3 Polimorfismos**

São conhecidos por serem alterações conservativas ou não-conservativas de aminoácidos no DNA que não causam uma deficiência patológica na atividade enzimática, também conhecidas por mutações neutras ou sem efeito deletério. Foram descritas mais de 30 alterações não patogênicas no gene da IDUA humana. No entanto, acredita-se que haja muitas outras, uma vez que os autores apenas referem ter encontrado novas alterações sem descrevê-las.

Não se sabe até que ponto estas variantes podem influenciar a estabilidade e o processamento do mRNA, a sua taxa de tradução ou mesmo a atividade, estabilidade e transporte da proteína (Scott et al., 1995). Uma hipótese seria que os polimorfismos podem potencializar o efeito de uma mutação, alterando o fenótipo, por exemplo, de leve para intermediário. Isto poderia explicar diferenças entre fenótipos clínicos de pacientes com o mesmo genótipo (Scott et al., 1993).

#### **1.3.6.4 Correlação Genótipo-Fenótipo**

Os três fenótipos clínicos parecem ser causados primariamente por diferentes combinações de alelos mutantes no gene IDUA. Em adição ao nível de complexidade de variação fenotípica da doença, há a possibilidade de modulação por efeito dos polimorfismos ou interação com outros fatores genéticos e ambientais. Além disto, formas mais amenas da doença ocorrem na presença de apenas um alelo que codifique alguma atividade residual.

Todas mutações sem sentido descritas resultam em uma falta total de atividade enzimática, e, quando identificadas em ambos os alelos originam um fenótipo grave da doença. Pacientes que são heterozigotos para essas mutações ou para inserções/deleções podem apresentar uma ampla variabilidade fenotípica dependendo do segundo alelo (Terlato e Cox, 2003). Ashton e cols. (1992) demonstraram que pacientes homozigotos para W402X não apresentam quantidades de proteínas detectáveis por técnicas imunológicas.

Embora a substituição de um simples aminoácido possa prejudicar severamente a função de uma enzima, mutações de sentido trocado são mais prováveis ter alguma atividade residual de IDUA (Scott et al., 1995). As mutações de sentido trocado são heterogêneas quanto ao fenótipo apresentado pelos seus portadores. A mutação de sentido

trocado, P533R, já foi identificada em estado homozigoto em pacientes com a forma leve, intermediária e grave (Terlato e Cox, 2003). Embora não haja uma explicação para esta larga variabilidade, a progressão da MPS I parece ser menos grave em heterozigotos P533R/W402X e homozigotos P533R comparadas com homozigotos Q70X ou W402X ou heterozigotos W402X/Q70X, sugerindo que a pequena diferença na quantidade de enzima existente entre o homozigoto e o heterozigoto composto seja suficiente para amenizar a gravidade do fenótipo (Clarke et al., 1994b, Terlato e Cox, 2003).

A maioria das mutações em sítio de *splice*, levam a um mRNA muito instável e desta forma ao fenótipo grave, quando associado com uma segunda mutação sem sentido (Moskowitz et al., 1993; Teng et al., 2000; Beesley et al., 2001). A exceção é a mutação 678-7g>a (IVS 5-7g>a), que produz uma pequena quantidade de mRNA e proteína IDUA normal que previne significantes estoques de substrato. Esta mutação tem sido identificada em associação com mutação sem sentido em pacientes com a forma intermediária (Moskowitz et al., 1993; Beesley et al., 2001).

Em torno de 23 pequenas deleções e inserções têm sido descritas, com a maioria causando um fenótipo grave. Somente duas inserções (396insAC e 974ins12) e uma deleção (deltaD444/445) têm sido identificadas em pacientes com a forma leve em associação com o alelo grave (Terlato e Cox, 2003). A inserção 704ins5 é a mutação mais freqüente em pacientes japoneses com Hurler (Yamagishi et al., 1996).

A dificuldade da previsão do fenótipo originado pelas mutações de ponto pode ser exemplificada pela situação que ocorre no exon 2. As mutações R89Q e R89W, estão associadas com o fenótipo leve, sugerindo que a arginina R não é vital para a função da enzima, enquanto que as mutações H82P e A75T originam um fenótipo grave. Isto pode indicar que esta região da proteína é menos tolerante a modificações (Beesley et al., 2001).

As conseqüências clínicas só podem ser obtidas pela análise de outros pacientes com o mesmo genótipo, devendo-se ter cuidado na predição do fenótipo para novas combinações de alelos (Tieu et al., 1995; Scott et al., 1995).

A determinação genotípica de pacientes com MPS I é importante não só para a escolha de alternativas de tratamento, mas também para a avaliação de terapias experimentais. Em primeiro lugar porque a determinação genotípica pode fornecer um indicativo precoce do subtipo clínico da doença, o que de outra maneira só seria obtido após evolução dos sintomas. Além disso, permite uma avaliação da resposta individual de pacientes submetidos a transplante de medula óssea ou reposição enzimática. A caracterização genotípica dos casos de MPS I também permite a aplicação de técnicas mais precoces de diagnóstico pré-natal (como o diagnóstico pré-implantação) e é de grande importância no aconselhamento genético de famílias com indivíduos afetados por esta enfermidade.

## **2. OBJETIVOS**

Os objetivos deste trabalho foram:

1. Identificar e caracterizar, através da análise molecular do gene da  $\alpha$ -L-iduronidase (IDUA), o genótipo de pacientes afetados por mucopolissacaridose dos tipos I - H (forma severa), I - S (forma leve) e I - H/S (forma moderada).
2. Inferir, em pacientes brasileiros com MPS I, a frequência de seis mutações já descritas na literatura.
3. Correlacionar as mutações encontradas entre os afetados com a gravidade clínica da doença.



## **ARTIGO CIENTÍFICO**

Os resultados deste trabalho estão apresentados a seguir, sob forma de um artigo científico que abrange os objetivos listados anteriormente. O artigo será submetido para um periódico especializado internacional, provavelmente a revista *Molecular Genetics and Metabolism*.

Mutational analysis of the  $\alpha$ -L-iduronidase gene in Brazilian Mucopolysaccharidosis Type I patients: frequency of known mutations and identification of five novel mutations.

FDB Pessutto<sup>1,2</sup>, I Schwartz<sup>3</sup>, U Matte<sup>1</sup>, R Giugliani<sup>1,2,3</sup>.

1 - Centro de Terapia Gênica, Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

2 – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3 – Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Correspondence to:

Franciele Dall Bello Pessutto

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Centro de Pesquisas, 1º andar, Centro de Terapia Gênica

Rua Ramiro Barcelos, 2350

Porto Alegre – RS- Brasil CEP 90035-903

Tel: 51 2101 8838 Fax: 51 2101 8010

[francipessutto@gmail.com](mailto:francipessutto@gmail.com)

Key words: Mucopolysaccharidosis type I, Hurler syndrome, Scheie syndrome,  $\alpha$ -L-iduronidase, Lysosomal storage disorders.

## ABSTRACT

Mucopolysaccharidosis type I (MPS I) is caused by a deficiency of the enzyme  $\alpha$ -L-iduronidase (IDUA), which is involved in the breakdown of dermatan and heparan sulphates. There are three clinical phenotypes, ranging from the severe Hurler form characterized by skeletal abnormalities, hepatosplenomegaly and severe mental retardation, to the milder Scheie phenotype in which there is cardiac valve disease, corneal clouding, limited skeletal problems, but no mental retardation. The intermediate form of MPS I (Hurler/Scheie) is characterized by progressive somatic involvement, including dysostosis multiplex, with little or no intellectual dysfunction. In this study, we have investigated a group of 25 patients, diagnosed with the MPS I that were screened for 6 known mutations (W402X, P533R, R383H, R89Q, A327P and Q70X). Patients not genotyped, after the analysis of known mutations, were analyzed by SSCP and those with an abnormal SSCP migration pattern were sequenced. Mutational analysis confirmed a high prevalence of W402X and P533R (28% and 18%). Sequencing resulted in the identification of five known mutations and five previously unknown sequence changes. The genotype was fully defined in 60% (15/25) of Brazilian patients and 76% of alleles was determined. In addition, our study has show that, despite the prevalence of W402X and P533R in the Brazilian MPS I population, there is still a large number of mutations exclusively on to individual MPS I patients, highlighting the difficulties of mutation screening for this disorder in mixed populations.

## INTRODUCTION

Mucopolysaccharidosis type I (MPS I) is caused by a deficiency of the lysosomal enzyme  $\alpha$ -L-iduronidase (IDUA). IDUA deficiency results in the failure to remove  $\alpha$ -L-iduronic acid residues from heparan and dermatan sulfate, causing the accumulation of these substrates in the lysosomes of affected cells [1]. Patients with the classical, severe Hurler disease are often diagnosed within their first year of life and usually die in their second decade. They suffer from skeletal deformities, joint contractions, hepatosplenomegaly, corneal clouding and severe mental retardation. Patients with the attenuated clinical form of MPS I, Scheie disease, may be recognized in their early teens, have normal intelligence, attenuated skeletal symptoms and potentially, a normal lifespan. However, cardiac impairment and spinal cord compression in Scheie patients can cause serious clinical problems later in life. Patients with MPS I with intermediate clinical phenotypes (Hurler/Scheie) that include normal or reduced intelligence with marked somatic symptoms have also been described [2].

Approximately 110 IDUA gene mutations have been reported in MPS I patients [3] and mutation analysis has enabled the prediction of clinical severity in some patients, mainly presenting the severe form of the clinical spectrum [4-6]. Mutation frequencies vary worldwide, but W402X and Q70X are the two most frequent mutations found in European patients, being responsible for up to 70% of the alleles in some countries [4, 7, 8]. The IDUA mutation P533R has been previously reported to be common with a high frequency of detection in Moroccan [9] and Sicilian Italian [10] MPS I patients. The two most common IDUA mutations in Brazilian MPS I patients are W402X and P533R with

respective frequencies of 37% and 12% [11]. Collectively, missense alleles account for over three-quarters of the MPS I mutant alleles in Caucasians, but in most cases, clinical criteria are still used to define the patient phenotype [12]. The accurate prediction of genotype-phenotype correlations in MPS I has significant implications given the wide spectrum of disease severity and the choice of treatment options, that include bone marrow transplantation [13-16] and enzyme replacement therapy (ERT) [17-19].

In this study, mutational analysis has been carried out on 25 patients diagnosed clinically and biochemically as MPS I. We have investigated these patients to determine the relationship between IDUA genotype and patient's clinical phenotype.

## MATERIAL AND METHODS

### Sample characterization

From 2001 to 2007, the Medical Genetics Service (MGS) located in the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, diagnosed 35 patients with MPS I by enzyme assay [20]. As the MGS is a reference center for the diagnosis of lysosomal storage disorders, patients were from different regions of Brazil, and, therefore, had different ethnic backgrounds. DNA samples were obtained from 25 patients (71.5%) for mutation detection.

### DNA extraction

Genomic DNA extracted from peripheral blood samples using the salting out technique [21].

## PCR amplification

Each of the 14 exons and intron/exon boundaries of the  $\alpha$ -L-iduronidase gene were amplified by PCR using primers described by Beesley et al [6]. Typical PCR reactions were performed in a total volume of 50  $\mu$ L containing 100ng of genomic DNA, 0.2mM of dNTP, 20pmol of each primer, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, ammonium buffer (160mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 10% (v/v) DMSO, and 1U of Taq DNA polymerase (Invitrogen). Cycling conditions were typically 94°C for 5 min, followed by 30 cycles of 45 sec at 94°C, 1 min at 50-66°C, 1 min and 30sec at 72°C, and a final extension at 72°C for 10 min.

## Detection of the 6 known mutations

The patients were screened for 6 previously reported mutations (Q70X, R89Q, A327P, R383H, W402X and P533R) using restriction enzymes or analyzed by single strand conformational polymorphism (SSCP) analysis in PCR fragments, as described in Matte et al [11].

## Single Strand Conformational Polymorphism Analysis (SSCP)

After the analysis of known mutations, the patients not genotyped were analyzed followed by SSCP. SSCP gels ranged from 6% to 12% polyacrilamide and electrophoresis was carried out from 1 to 4 hours at RT or 4°C, according to the specific length of amplified fragment.

## Sequencing analysis

Samples with an abnormal SSCP migration pattern were sequenced using the DY Enamic<sup>TM</sup> ET dye terminator Kit and Megabase automated sequencer (GE Healthcare). The primers used for sequencing were the same as those used for the PCR amplification. Mutations were confirmed by sequencing the reverse strand using the same method.

## Clinical Data

Clinical information was obtained by reviewing the medical records from patients. In patients, submitted to ERT, data collected are prior to the beginning of therapy.

## RESULTS

The 25 patients were screened for 6 previously known mutations: Q70X, R89Q, A327P, R383H, W402X and P533R. The frequencies of these mutations are presented in Table 1. As expected, W402X was the most frequent mutation (28%) followed by P533R (18%).

Following this initial screening, 44% of genotypes were identified and 56% of alleles were determined. In the remaining 14 patients, only one allele was identified in 6 patients and neither in the remaining 8. These 14 patients were screened by SSCP followed by automated sequencing and previously reported mutations were found in 4 patients. The 5 known mutations found were E182K G208D, Y343X, R619X and R628X. Previously undescribed changes were found in 4 patients (Table 2). The novel changes were found throughout the gene and include 3 missense mutations (T99I, A79I Y625C), 1 deletion (164delG) and one splice site mutation (IVS7+1g>a). All sequence changes were

confirmed by sequencing the reverse strand using the same method. The genotype was fully defined in 60% (15/25) of Brazilian patients and 76% of alleles was determined.

One out of five new mutations (A79T) was detected at the same site as a previously reported mutation (A79V) [22]. Alanine at 79 is reportedly conserved across species among human [23], canine [24], and murine [26] IDUA genes. The presence of nearby missense mutations A75T, H82P, R89Q and R89W resulting in severe to mild phenotypes [4, 26 - 28] also indicates that the area Ala<sub>75</sub> to Arg<sub>89</sub> in the protein is important for structural stability of the enzyme. In the same patient was found the alteration T99I was found and also a new mutation in exon 14, Y625C. This mutation (Y625C) was found in two patients in heterozygous state, one is a Hurler patient and another couldn't be defined between Hurler or Hurler-Scheie. Two other missense mutations previously reported in exon 14, W626R and R628P, and closer of Y625C mutation, are both responsible for the Hurler phenotype [4, 11]. Therefore, it appears that this region of exon 14 is a highly conserved.

Other new mutation, IVS 7+1g>a, probably affect the consensus splice sequence in the boundary between exon 7 and intron 7. The IVS 7+1g>a is present in heterozygous form in a Hurler-Scheie patient without mental retardation. The last new mutation found in this study (164delG), consists of a deletion of guanine in the codon 26, causing a premature stop signal 81 codons later, in codon 107.

The genotype and clinical phenotype for these patients have been summarized in Table 3. The current age of the patients ranges from 11 months to 25.8 years, with a median of 6.4 years. As depicted in table 3, the age distribution is skewed to the younger children, and approximately 52% of the patients are currently between 1 and 5 years of age. The population classified as patients with Hurler syndrome was 44%, compared to 20% and



20% classified as patients with Hurler-Scheie and Scheie syndromes, respectively. For 16% the clinical severity could not be determined. For 63.6% of the 11 patients with Hurler syndrome diagnosis was established before 2 years of age. The other Hurler patients' age at diagnosis ranged from 2.75 to 7.6 years. Conversely, among the five patients with Scheie syndrome, none received their diagnosis before 2 years of age. Mutation W402X was present in homozygous form in 6 out of 11 Hurler patients. The other 5 were in heterozygous to W402X, Y625C, R619X and one was a compound heterozygote G208D and E182K. The last Hurler patient wasn't genotyped. The 3 out of 5 Scheie patient's genotype were heterozygous to R383H and the other alleles were P533R, 164delG and one not identified.

## DISCUSSION

In many genetic diseases the majority of mutations are private, with a few recurrent ones. This is not the case for MPS I, where some mutations can be found in different ethnic groups of patients at relatively high frequencies. Mutational analysis in 25 patients confirmed a high prevalence of W402X and P533R (46% combined frequency) and resulted in the identification of several known mutations and some previously unknown sequence changes.

The two most common mutations found in this study, W402X and P533R accounted for 28% and 18% of MPS I alleles, respectively. W402X is also the most common IDUA mutation found in Caucasian patients, with a frequency of up to 60% in Spanish MPS I patients and 46% in patients of Anglo-Saxon origin [29, 30]. Analyzing P533R frequency found in others peoples, like in Moroccan (90%), Italian (11%) and

Spanish (10%), the P533R frequency found in Brazilian patients is closer to Spanish and Italian MPS I patients than to other peoples [8-10]. Matte et al [11, 31], reported in two previous studies with Brazilian MPS I patients, frequencies of R383H and R89Q mutations similar to what we found in this study. The reported frequencies for Q70X are markedly higher in patients of Scandinavia and ancient Soviet Union, reaching frequencies of 62% and 44%, respectively [7, 32]. This mutation seems to be less frequent among Italian patients. Gatti et al [10] reported a frequency of 13% for Q70X in Italian patients. If we assume that Brazilian patients are genetically closer to Spanish and Italian patients than to Scandinavia and Soviet Union patients, we should expect that the incidence of Q70X in Brazilian population to be low, as reported by Matte et al [11] and in this study.

Analyzing our data about the prevalence of each phenotype, they are in agreement with previous reports. The prevalence is higher for Hurler than Hurler-Scheie syndrome, and lowest for Scheie syndrome [1, 33 - 37]. Over 87% of our patients, regardless of age at symptoms onset or disease severity, report the presence of cardiac abnormalities and apnea. These findings highlight the fact that significant somatic morbidity may be associated with both late-onset, attenuated forms and early-onset severe forms of MPS I, underscoring the need to monitor all patients for development of complications that can potentially surface in this progressive, multisystemic disorder.

Despite the high prevalence of W402X and P533R in our MPS I population, one or both mutations were not identified in 14 patients after the initial screening. Following mutational analysis of the entire gene in these patients, 18 additional sequence changes were found, including 5 that have not been previously reported. Out of these, the 2 missense new mutations, A79T and Y625C, are likely to be deleterious based on homology across species and presence of nearby mutations. The other new missense mutation, T99I, it

is probably not disease causing, since it is not located at a conserved region of the gene and the closest mutations nearby are located at R89 and M133. Analyzing the other two new mutations, 164delG and IVS 7+1g>a, and knowing that, most splice-site mutations profoundly affect normal splicing, leading to a very unstable mRNA and deletions are predicted to lead to premature stop codons, we believe that these mutations, are probably disease-causing. Anyway, confirmatory data should be obtained by expression assay or population analysis.

Two mutations previously reported, G208D and E182K, already were found in Brazilian Hurler patients, but not together in the same patients [11]. Brooks et al [38] reported that E182K protein should be catalytically inactive, because a lysine residue cannot perform the acid/base catalysis required for glycosidase activity contributing to a very severe clinical phenotype in a MPS I patient. R619X and R628X mutation weren't described previously in Brazilian patients [11]. These mutations were initially described by Beesley et al [6] in British Caucasian patients. The other nonsense mutation found in our patients was Y343X. This mutation has been described in a patient with classical severe phenotype. Y343X, actually uses the mutant stop codon as a 3'-splice site, thus possibly producing a shorter IDUA protein missing 19 amino acids from codons 325-343. Our patient with Y343X is a Scheie form, probably because the other allele is responsible for the residual enzyme activity.

In addition to these new disease-causing mutations, a number of other changes were found, including one possible new polymorphism (T99I). A large number of polymorphisms and non-pathogenic sequence variants have been described for the IDUA gene, some at them with amino acid changes [5]. The effect these sequence variants on  $\alpha$ -

L-iduronidase activity has not been clearly defined and may account for variation in clinical phenotype at MPS I patients with the same genotype.

In this study, 76% (38/50) of alleles were determined. It is not clear whether the remaining 24% (12/50) of MPS I alleles have not been elucidated because of the insufficient sensitivity of the SSCP screening or because the mutants alleles are in the promoter region or are gross deletion, which have not been analyzed in this study. Such changes, although likely to exist, have not been described in the IDUA gene so far.

Our study has shown that, despite the prevalence of W402X and P533R in the Brazilian MPS I population, there is still a large number of mutations unique to individual MPS I patients, highlighting the difficulties of mutation screening for this disorder in mixed populations. Nevertheless, mutation analysis is important to genotype-phenotype correlations. With the prospects of screening for MPS I in the future, it will become all the more important to have the best predictive information available for families and caregivers to make the most rational choice for treatment.

## REFERENCES

- [1] E.F. Neufeld, J. Muenzer, The Mucopolysaccharidoses, in: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle (Eds.), *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, eighth ed., McGraw-Hill, New York, 2001.
- [2] S. Bunge, P.R. Clements, S. Byers, W.J. Kleijer, D.A. Brooks, J.J. Hopwood, Genotype-phenotype correlations in mucopolysaccharidosis type I using enzyme kinetics, immunoquantification and in vitro turnover studies, *Biochim. Biophys. Acta* 1407 (1998) 249-256.
- [3] Human Mutation Database Available from <http://www.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/hgmd0.html>.
- [4] S. Bunge, W.J. Kleijer, C. Steglich, M. Beck, E. Schwinger, A. Gal, Mucopolysaccharidosis type I: identification of 13 novel mutations of the  $\alpha$ -L-iduronidase gene, *Hum. Mutat.* 6 (1995) 91-94.
- [5] H.S. Scott, S. Bunge, A. Gal, L.A. Clarke, C.P. Morris, J.J. Hopwood, Molecular genetics of mucopolysaccharidosis type I: diagnostic, clinical, and biological implications, *Hum. Mutat.* 6 (1995) 288-302.
- [6] C.E. Beesley, C.A. Meaney, G. Greenland, V. Adams, A. Vellodi, E.P. Young, B.G. Winchester, Mutational analysis of 85 mucopolysaccharidosis type I families: frequency of known mutations, identification of 17 novel mutations and in vitro expression of missense mutations, *Hum. Genet.* 109 (2001) 503-511.
- [7] S. Bunge, W.J. Kleijer, C. Steglich, M. Beck, C. Zuther, C.P. Morris, E. Schwinger, J.J. Hopwood, H.S. Scott, A. Gal, Mucopolysaccharidosis type I: identification of 8 novel mutations and determination of the frequency of the two common  $\alpha$ -L-iduronidase mutations (W402X and Q70X) among European patients, *Hum. Mol. Genet.* 3 (1994) 861-866.
- [8] L. Gort, A. Chabás, M.J. Coll, Analysis of five mutations in 20 mucopolysaccharidosis type I patients: high prevalence of the W402X mutation, *Hum. Mut.* 11 (1998) 332-333.
- [9] N. Alif, K. Hess, J. Straczek, S. Sebbar, Y. Belahsen, N. Mouane, A. Abkari, P. Nabet, M.A. Gelot, Mucopolysaccharidosis type I in Morocco: clinical features and genetic profile, *Arch. Pediatr.* 7 (2000) 597-604.

- [10] R. Gatti, P. Di Natale, G.R. Villani, M. Filocamo, V. Muller, X.H. Guo, P.V. Nelson, H.S. Scott, J.J. Hopwood, Mutations among Italian mucopolysaccharidosis type I patients, *J. Inherit. Metab. Dis.* 20 (1997) 803-806.
- [11] U. Matte, G. Yogalingam, D. Brooks, S. Leistner, I. Schwartz, L. Lima, D.Y. Norato, J.M. Brum, C. Beesley, B. Winchester, R. Giugliani, J.J. Hopwood, Identification and characterization of 13 new mutations in mucopolysaccharidosis type I patients, *Mol. Genet. Metab.* 78 (2003) 37-43.
- [12] N.J. Terlato, G.F. Cox, Can mucopolysaccharidosis type I disease severity be predicted based on a patient's genotype? A comprehensive review of the literature, *Genet. Med.* 5(4) (2003) 286-294.
- [13] C. Peters, M. Balthazor, E.G. Shapiro, R.J. King, C. Kollman, J.D. Hegland et al, Outcome of unrelated donor bone marrow transplantation in 40 children with Hurler syndrome, *Blood* 87 (1996) 4894-4902.
- [14] C. Peters, E.G. Shapiro, J. Anderson et al, and the Storage Disease Collaborative Study Group, Hurler Syndrome, II: outcome of HLA-genotypically identical sibling and HLA-haploidentical related donor bone marrow transplantation in fifty-four children, *Blood* 91 (1998) 2601-2608.
- [15] N. Guffon, G. Souillet, I. Maire, J. Straczek, P. Guibaud, Follow-up of nine patients with Hurler syndrome after bone marrow transplantation, *J. Pediatr.* 133 (1998) 119-125.
- [16] A. Vellodi, E.P. Young, A. Cooper, J.E. Wraith, B. Winchester, C. Meaney et al., Bone marrow transplantation for mucopolysaccharidosis type I: experience of two British centers, *Arch. Dis. Child.* 76 (1997) 92-99.
- [17] E.D. Kakkis, J. Muenzer, G. Tiller, L. Waber, J. Belmont, M. Passage et al., Enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis I, *N. England. J. Med.* 344 (2001) 182-188.
- [18] M. Beck, J. Wraith, L. Clarke, E. Kolodny, G. Pastores, J. Muenzer, A phase 3 study of rhIDUA enzyme therapy for MPS I (abstract), *J. Inherit. Metab. Dis.* 25 (suppl 1) (2002) 120.
- [19] L. Clarke, J. Muenzer, E. Kolodny, G. Pastores, M. Beck, J. Wraith, RhIDU enzyme replacement therapy for MPS I: 24-extension study (abstract), *Am. J. Hum. Genet.* 71 (suppl 1) (2002) 581.

- [20] J.J. Hopwood, V. Muller, A. Smithson, N Bagget, A fluorometric assay using 4-methylumbeliferyl- $\alpha$ -L-iduronide for the estimation of  $\alpha$ -L-iduronidase activity and the detection of Hurler and Scheie syndromes, *Clin. Chim. Acta.* 92 (1979) 257-65.
- [21] A.S. Miller, A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells, *Nucleic. Acids Res.* 16 (1988) 1215.
- [22] G.J. Lee-Chen, S.P. Lin, I.S. Chen, J.H. Chang, C.W. Yang, Y.W. Chin, Mucopolysaccharidosis type I: Identification and characterization of mutations affecting alpha-L-iduronidase activity, *J. Formos. Med. Assoc.* 101(6) (2002) 425-428.
- [23] H.S. Scott, D.S. Anson, A.M. Orsborn, P.V. Nelson, P.R. Clements, C.P. Morris, J.J Hopwood, Human  $\alpha$ -L-iduronidase: cDNA isolation and expression, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88(21) (1991) 9695-9699.
- [24] L.J. Stoltzfus, B. Sosa-Pineda, S.M. Moskowitz, K.P. Menon, B. Dlott, L. Hopper, D.B. Teplow, R.M. Shull, E.F. Neufeld, Cloning and characterization of cDNA encoding canine  $\alpha$ -L-iduronidase, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 6570-6575.
- [25] L.A. Clarke, J. Nasir, H. Zhang. H. MacDonald, D.A. Applegarth, M.R. Hayden, J. Toone, Murine  $\alpha$ -L-iduronidase: cDNA isolation and expression, *Genomics* 24 (1994) 311-316.
- [26] A. Yamagishi, S. Tomatsu, S. Fukuda, N. Uchiyama, N. Shimozawa, Y. Suzuki, N. Kondo, T. Sukegawa. T. Orii, Mucopolysaccharidosis type I: identification of common mutations that cause Hurler and Scheie syndromes in Japanese populations, *Hum. Mutat.* 7 (1996) 23-29.
- [27] L.A. Clarke and H.S. Scott, Two novel mutations causing mucopolysaccharidosis type I detected by single strand conformational analysis of the  $\alpha$ -L-iduronidase gene, *Hum. Mol. Genet.* 2 (1993) 1311-1312.
- [28] H.S. Scott, T. Litjens, P.V. Nelson, P.R. Thompson, D.A. Brooks, J.J. Hopwood, C.P. Morris, Identification of mutations in the  $\alpha$ -L-iduronidase gene (IDUA) that cause Hurler and Scheie syndromes, *Am. J. Hum. Genet.* 53 (1993) 973-986.
- [29] H.S. Scott, T. Litjens, J.J. Hopwood, C.P. Morris, A common mutation for mucopolysaccharidosis type I associated with a sever Hurler syndrome phenotype, *Hum. Mutat.* 1 (1992) 103-108.

- [30] H.S. Scott, T. Litjens, P.V. Nelson, D.A. Brooks, J.J Hopwood, C.P. Morris,  $\alpha$ -L-iduronidase mutations (Q70X and P533R) associated with a severe Hurler phenotype, *Hum. Mutat.* 1 (1992) 333-339.
- [31] U. Matte, S. Leistner, L. Lima, I. Schwartz, R. Giugliani, Unique frequency of known mutations in Brazilian MPS I patients, *Am. J. Med. Genet.* 90 (2000) 108-109.
- [32] E.Y. Voskoboeva, X.D. Krasnopolskaya, T.V. Mirenburg, B. Weber, J.J. Hopwood, Molecular genetics of Mucopolysaccharidosis type I: mutation analysis among the patients of the former Soviet Union, *Mol. Genet. Metab.* 65 (1998) 174-180.
- [33] P.J. Meikle, J.J. Hopwood, A.E. Clague, W.F. Carey, Prevalence of lysosomal storage disorders, *JAMA* 281 (1999) 249 – 254.
- [34] J. Nelson, Incidence of the mucopolysaccharidoses in Northern Ireland, *Hum. Genet.* 101 (1997) 355-358.
- [35] R.B. Lowry, D.A. Applenarth, J.R. Toone, E. MacDonald, N.Y. Thunem, An update on the frequency of the mucopolysaccharide syndromes in British Columbia, *Hum. Genet.* 85 (1990) 389-390.
- [36] B.J. Poorthuis, R.A. Wevers, W.J. Kleijer, J.E. Groener, J.G. de Jong, S. van Weely, K.E. Niezen-Koning, O.P. van Diggelen, The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands, *Hum. Genet.* 105 (1999) 151-156.
- [37] GM Pastores, P Arn, M. Beck, JTR Clarke, N Guffon, P Kaplan, J Muenzer, DYJ Norato, E Shapiro, J Thomas, D Viskochil, JE Wraith, The MPS I registry: Design, methodology, and early findings of a global disease registry for monitoring patients with Mucopolysaccharidosis Type I, *Mol. Genet. Metab.* 91 (2007) 37-47.
- [38] D.A. Brooks, S. Fabrega, L.K. Hein, E.J. Parkinson, P. Durand, G. Yogalingam, U. Matte, R. Giugliani, A. Dasvarma, J. Eslahpazire, B. Henrissat, J. Mornon, J.J. Hopwood, P. Lehn, Glycosidase active site mutations in human  $\alpha$ -L-iduronidase, *Glycobiology* 11(9) (2001) 741-750.



Table 1 – Frequency of recurrent mutations in Brazilian MPS I patients.

Mutation	Frequency (%)
W402X	28
P533R	18
R383H	6
R89Q	4
Q70X	0
A327P	0

Table 2 – Characteristics and position of 5 new mutations found in Brazilian MPS I patients.

Mutation		Location	Codon	cDNA <sup>a</sup>	gDNA <sup>b</sup>	Observations
164delG	del G	Exon 1	26	164	628	<i>Premature stop codon at position 107<sup>a</sup></i>
A79T	G A	Exon 2	79	323	1383	<i>Conserved region</i>
T99I	C T	Exon 2	99	384	1417	<i>Not conserved region</i>
Y625C	A G	Exon 14	625	1962	5020	<i>Conserved region</i>
IVS 7+1g→a	G A	Intron 7	-	-	1977	<i>Disrupted consensus splice site sequence</i>

<sup>a</sup> Positions numbered according to GenBank entry M74715

<sup>b</sup> Positions numbered according to GenBank entries M95739 for exon 1 and M95740 for exons 3-14.





#### 4. DISCUSSÃO

Ainda que sejam individualmente raras, as doenças lisossômicas (DL) apresentam alto custo do ponto de vista econômico, psicológico e social para os familiares, além de uma carga ao sistema de saúde. Embora existam potenciais terapias para tratamento, como transplante de medula óssea e terapia de reposição enzimática, a sua eficácia vai depender fortemente do diagnóstico precoce e tratamento da doença, antes do início da patologia irreversível. A detecção precoce de DL permite o aconselhamento genético dos pais, para proporcionar escolhas de reprodução e evita o prolongado e estressante processo de diagnóstico. Para tanto são necessários métodos precisos para a identificação de heterozigotos e para definição precoce do prognóstico clínico. A análise molecular pode ser útil na abordagem destas questões. No caso da MPS I, a correlação genótipo-fenótipo torna-se mais significativa, dado ao largo espectro da doença e a escolha das opções do tratamento.

Dos 25 pacientes brasileiros com MPS I testados para 6 mutações conhecidas no gene IDUA, 11 pacientes foram genotipados e 14, tiveram um ou ambos os alelos não identificados após a triagem inicial. Seguindo a análise de todo gene, 18 alterações genéticas foram encontradas, sendo que 5 não haviam sido reportadas anteriormente. Assim, 60% (15/25) dos pacientes foram genotipados e 76% (38/50) dos alelos identificados. A figura 2 mostra o fluxograma da pesquisa de mutações nos 25 pacientes com MPS I.

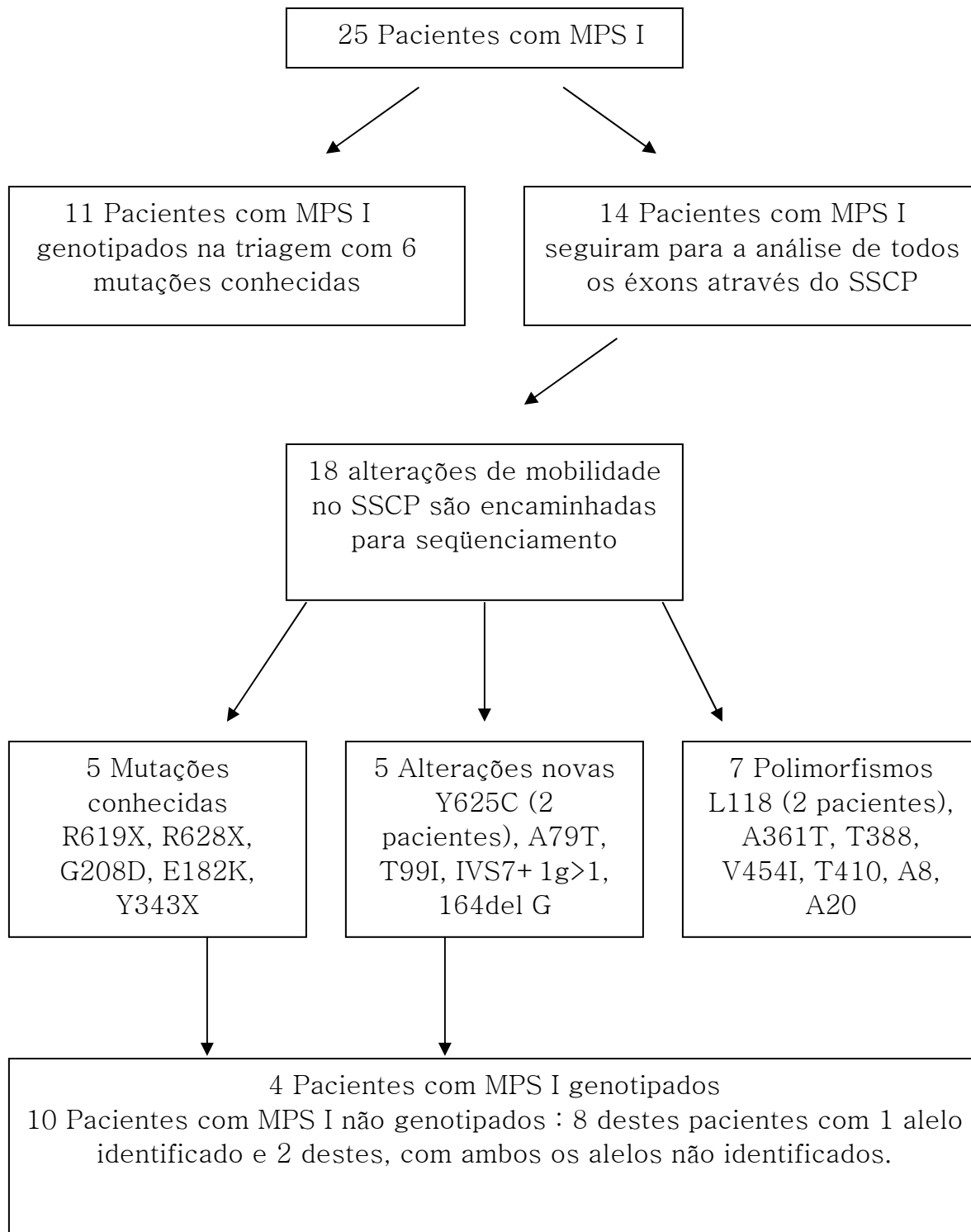


Figura 2: Fluxograma da pesquisa de mutações em 25 pacientes com MPS I.

Os 12 alelos não determinados podem ser resultado da insuficiente sensibilidade da triagem realizada pela técnica de SSCP. A sensibilidade do SSCP tem revelado taxas de detecção de mutações que variam entre 30 e 90% (Orita et al., 1989; Michaud et al., 1992; Sheffield et al., 1993, Ravnik-Glavac et al., 1994). Estudos mostraram que a sensibilidade do PCR-SSCP é inversamente proporcional ao tamanho do fragmento de DNA analisado. Os maiores índices são obtidos para fragmentos com tamanho entre 150 e 200pb e/ou diferentes condições eletroforéticas (Sheffield et al., 1993; Jordanova et al., 1997). No presente estudo, dos 13 fragmentos amplificados por PCR, somente três apresentam tamanhos próximos da faixa de 150 a 200pb. A maioria dos fragmentos varia de 300 a 471pb, sendo que a pior sensibilidade é a do éxon 2 (471pb). Os SSCP dos éxons 2, 8, 9 e 11 foram testados em duas condições (Temperatura ambiente e 4°C), o que levou a apresentação de algumas alterações de mobilidade que não haviam aparecido em uma delas. Assim, após o seqüenciamento pôde-se identificar uma nova mutação, T99I no éxon 2, e duas alterações conhecidas T388 e Y343X no éxon 8. Outra possibilidade para a não-identificação de alguns alelos, é que estes estariam localizados na região promotora ou ainda a existência de uma deleção total de um dos alelos. Tais alterações não foram analisadas neste estudo.

Até outubro de 2007, foram descritas no gene da IDUA humana 110 mutações patogênicas, demonstrando a grande variabilidade genotípica da MPS I, o que dificulta a rapidez com que diagnóstico molecular possa ser realizado. Desta forma, faz-se necessário a identificação das mutações mais freqüentes em uma dada população. A freqüência e o espectro de alelos mutantes em cada *locus* podem ser influenciados por mutações, seleção natural, deriva genética e migração. Para pacientes com MPS I, mutações recorrentes têm sido descritas em freqüência relativamente alta, particularmente para certos grupos étnicos.

A identificação de mutações recorrentes frequentes direciona a análise, reduzindo gastos e tempo com a liberação do diagnóstico molecular.

Neste estudo, as duas mutações mais comuns foram W402X e P533R apresentando frequências de 26.9% e de 17.3% dos alelos, respectivamente. W402X é também a mutação mais comum encontrada em pacientes caucasianos, com uma frequência de em torno de 60% em pacientes MPS I espanhóis e 46% em pacientes de origem anglo-saxônica. Analisando a frequência da mutação P533R em outros grupos étnicos, como entre os marroquinos (90%), italianos (11%), espanhóis (10%) e australianos (3%), a frequência encontrada em pacientes MPS I brasileiros está mais próximas dos italianos e espanhóis, provavelmente, devido à origem de nossa colonização. Matte e cols. (2000; 2003) reportaram em pacientes brasileiros com MPS I, frequências para as mutações R383H e R89Q muito similares às encontradas no presente estudo. Índices elevados da mutação R89Q (24%) só foram encontrados entre os japoneses (Yamagishi et al., 1996), entre pacientes ingleses, por exemplo, a frequência não é superior a 1,2% (Beesley et al., 2001), tal como observado nos brasileiros.

As diferenças percentuais encontradas entre diferentes povos para mesmas mutações sugerem relações entre determinadas mutações e eventos históricos. Um exemplo é a mutação Q70X, que é encontrada marcadamente alta na Escandinávia (Bunge et al., 1995) e Rússia (Voskoboeva et al., 1998), países do norte europeu, alcançando índices de 62% e 44% dos alelos, enquanto que entre italianos (Gatti et al., 1997) e espanhóis (Gort et al., 1997), os percentuais giram em torno de 13% e 10% respectivamente, sugerindo uma associação mais próximas entre russos e escandinavos do que com outras populações da Europa central ou ocidental (Matte, 2001). Desta forma, levando em consideração nossas origens de colonização e a grande miscigenação existente

no Brasil, deveríamos esperar baixa incidência para a mutação Q70X, como relatado em no presente trabalho e em estudos prévios em pacientes brasileiros (Matte et al., 2003). Apesar de algumas mutações aparecerem como casos isolados, elas tendem a reaparecer nos mesmos grupos étnicos, como é o caso das mutações G208D e E182K, que foram encontradas neste estudo e já haviam sido relatadas em pacientes brasileiros (Matte et al., 2003).

A diferença na frequência das mutações entre as populações está associada às diferenças percentuais de pacientes com formas mais ou menos graves. Nossos dados estão de acordo com outros estudos que indicam que a taxa de incidência é mais elevada para Hurler do que Hurler - Scheie, e mais baixo para Scheie (Lowry et al., 1990; Nelson, 1997; Meikle et al. 1999; Poorthuis et al., 1999; Neufeld e Muenzer, 2001; Pastores et al., 2007). Com base nos dados disponíveis de nossos pacientes, a idade em que os primeiros sintomas manifestam-se varia muito, desde o nascimento à idade adulta, e um fenótipo mais grave da doença está associado ao aparecimento mais precoce dos sintomas. No entanto, é surpreendente que mais de 87% dos registros dos pacientes, independentemente da idade de início sintomas ou gravidade da doença, reportam a presença de anormalidades cardíacas e apnéia. Estes resultados destacam o fato da grande morbidade somática que podem estar associadas tanto com o início tardio em fenótipos menos graves quanto com o início precoce das formas graves da MPS I, destacando a necessidade de monitorar todos os pacientes observando o desenvolvimento de complicações nesta desordem progressiva e multissistêmica. Embora as análises dos pacientes geralmente demonstrem a heterogeneidade da doença (Neufeld e Muenzer, 2001; Muenzer, 2004; Wraith, 2005; Vijay e Wraith, 2005), os resultados ilustram também a arbitrariedade e as limitações de classificar os doentes em subtipos clínicos. Além disso, dada à complexidade da desordem,



mais do que três classificações da doença deveriam ser exigidas para a correta representação do espectro da doença.

A existência de um espectro de mutações afetando diferentemente a atividade enzimática foi proposta por Schuchman e Desnick (1988). A análise molecular do gene, isolado em 1990 por Scott e cols., confirmou esta interpretação. Acredita-se que haja um espectro contínuo de manifestações fenotípicas, cada um correspondendo a combinações genotípicas específicas (Hopwood e Morris, 1990; Neufeld e Muenzer, 2001). Uma vez que formas mais amenas da doença ocorrem na presença de apenas um alelo que codifique alguma atividade enzimática residual a classificação dos alelos em grave, intermediário ou leve deve ser feita baseando-se no fenótipo descrito em homozigotos, a menos que existam dados obtidos a partir de estudos de expressão.

As mutações de sentido trocado são heterogêneas em relação ao fenótipo, estando diretamente relacionadas à posição do aminoácido envolvido. Uma das mutações de sentido trocado que foi encontrada neste trabalho foi a A79T. Esta mutação foi detectada num sítio em que já havia sido reportada outra mutação, A79V (Lee-Chen et al., 2002). Alanina no códon 79 é altamente conservada, quando comparada com as seqüências de  $\alpha$ -L-iduronidase em cães (Stoltzfus et al., 1992), camundongos (Clarke et al., 1994b) e humanos (Scott et al., 1991). A presença de mutações próximas A75T, H82P, R89Q e R89W resultam em fenótipos graves a intermediários (Clarke e Scott, 1993; Bunge et al., 1995; Scott et al., 1995; Yamagishi et al., 1996), também indicando que a área entre Ala<sub>75</sub> e Arg<sub>89</sub> na proteína é importante para estabilidade estrutural da enzima.

Outras duas alterações, A99I e Y625C, foram encontradas no mesmo paciente com A79T Este paciente não pôde ser definido entre Hurler ou Hurler-Scheie. A mutação

Y625C também foi encontrada em heterozigose em um outro paciente, este apresentando a forma grave da doença. Próximas a Y625C, há outras duas mutações de sentido trocado, W626R e R628P, ambas responsáveis por um fenótipo Hurler (Bunge et al., 1995; Matte et al., 2003). Observando esta região no éxon 14 de cães, camundongo e dos humanos, pode se observar a existência de aminoácidos conservados nas três espécies (figura 3). Já a alteração A99I não está localizada numa região conservada do gene (Figura 3) e as mutações mais próximas descritas encontram-se no R89 e M133 (The Human Gene Mutation Database, outubro, 2007). Desta forma, acreditamos que T99I não esteja causando a doença neste paciente. De qualquer forma, dados confirmatórios devem ser obtidos por ensaio de expressão e análise populacional.

**79**

**99**

```

IDUA  Y I G A V P H S G I E Q V R I H W L L D L I T A R K S S S S S S S S
Mur:
IDUA  Y I G A V P H R G I K Q V R T H W L L E L V T T R G S S S S S S S S
Hum:
IDUA  Y I G A V P H G G I E Q V R T H W L L E L I T A R E S S S S S S S S
Can:

```

**625**

```

IDUA  N L F V F S P O T A V V S G S Y R V R A L D Y W A R
Mur:
IDUA  N L F V F S P O T G A V S G S Y R V R A L D Y W A R
Hum:
IDUA  N L F V F S P E S A V T S G S Y R V R A V D Y W A R
Can:

```

Figura 3: Comparação da seqüência de aminoácidos da  $\alpha$ -L-iduronidase em diferentes espécies (Clarke et al., 1994b). Mur: Murino. Hum: Humano. Can: Canino.

Todas as deleções são preditas de não produzirem qualquer enzima funcional, sendo assim, são causadoras de doença e classificadas como mutações graves. A mutação 164delG consiste na deleção de uma guanina no códon 26, desta forma, acarretando no aparecimento de um códon de terminação na posição 107. O paciente com esta mutação é um paciente Scheie, provavelmente, esta classificação deve-se à presença da outra mutação R383H, que apresenta uma atividade residual enzimática.

Mutações em sítios de *splice* podem ser associadas com a forma grave ou leve da doença, dependendo da existência de um sítio crítico de *splice*. A outra mutação encontrada primeiramente neste estudo, que provavelmente afetam o sítio de *splice*, é IVS7+1g>a. Esta mutação foi encontrada num paciente Hurler-Scheie, em que o outro alelo não foi identificado. Para a identificação da gravidade desta mutação e de que forma ela afeta o processo, é necessário realizar um estudo de mRNA.

Em células normais, a enzima  $\alpha$ -L-iduronidase é modificada pela ligação com manose-6-fosfato. Assim, este complexo, liga-se ao receptor para manose-6-fosfato e é transportado para uma vesícula e lançado ao endossomo, onde o baixo pH promove a dissociação da enzima com o receptor. Posteriormente, então, a enzima é transportada para o lisossomo maduro para degradar heparan e dermatan sulfato. A formação deste complexo é absolutamente essencial para que a enzima  $\alpha$ -L-iduronidase tenha uma estabilidade e para que consiga sofrer todas as modificações pós-transducionais. A presença de certas mutações na enzima  $\alpha$ -L-iduronidase reduz de forma dramática a interação desta com a manose-6-fosfato e conseqüentemente com o complexo de degradação. Este provavelmente é o caso de uma das mutações já descritas na literatura e encontrada neste estudo. Brooks e cols. (2001), reportaram que a proteína E182K deveria ser cataliticamente inativa, por

causa de um resíduo de lisina que não pode realizar a catálise ácido/base requerida para a atividade da enzima, contribuindo para um fenótipo clínico grave em pacientes com MPS I. Tanto a mutação E182K quanto G208D, encontradas num mesmo paciente com a forma grave da doença, já haviam sido relatadas em pacientes brasileiros tipo Hurler mas não mesmo paciente (Matte et al., 2003).

Outras duas mutações já descritas e encontradas neste estudo estão localizadas no éxon 14, ou seja, as mutações R619X e R628X e outra no éxon 8, Y343X. De um modo geral, as mutações sem sentido são consideradas nulas, isto é, resultam em uma terminação precoce da proteína e, portanto, a falta total de atividade enzimática, estando associadas à forma grave da doença. Em nosso estudo, os dois pacientes que encontramos as mutações R619X e R628X, apresentam o fenótipo Hurler. No paciente com R619X nós não identificamos a mutação do segundo alelo, mas provavelmente é uma mutação que causa perda total da atividade enzimática; e no paciente com a mutação R628X, o segundo alelo é outra mutação sem sentido, a W402X. A mutação Y343X tem sido descrita por causar perda de éxon, sendo que o sítio de terminação passa a ser usado como sítio de acceptor de *splice*. Ela está associada à forma grave da doença. Nosso paciente apresenta o tipo Scheie, isto ocorre provavelmente à atividade residual da enzima proveniente do outro alelo, não diagnosticado.

Em adição a estas novas mutações patogênicas, várias outras alterações foram encontradas, incluindo um possível novo polimorfismo (T99I). Um grande número de polimorfismo e seqüências não patogênicas tem sido descrito para o gene IDUA, algumas com mudança de aminoácidos, como Q33H, V454I e 361T (Scott et al., 1995). O efeito dessas seqüências variantes na atividade da  $\alpha$ -L-iduronidase não tem sido claramente

definidos, dados sugerem que elas podem provocar variações no fenótipo clínico em pacientes com o mesmo fenótipo. Poucos estudos têm sido realizados para avaliar o efeito dos polimorfismos. Scott e cols. (1993) descreveram um caso em que a presença do polimorfismo A361T isolado parecia estar modificando a atividade enzimática levando a um quadro mais grave do que o esperado pela presença da mutação patogênica R89Q.

A opção por uma ou ambas alternativas terapêuticas para MPS I disponíveis atualmente, terapia de reposição enzimática e transplante de células tronco hematopoética (TCTH), tem levado em consideração o fenótipo e genótipo. O TCTH tem sido indicado apenas para pacientes com a forma grave da doença, com idade menor que 2 anos e que ainda possuem preservada a função cognitiva. Em função da alta morbidade e mortalidade associadas ao transplante de medula óssea, para pacientes com a função cognitiva já alterada, opta-se pela terapia de reposição enzimática que apresenta uma melhora sobre o sistema nervoso periférico (Terlato e Cox, 2003).

Tem sido proposto que indivíduos com uma quantidade residual da enzima seriam mais tolerantes à administração da enzima por reposição, do que aqueles que não produzem enzima. Acredita-se ainda que exista uma correlação entre o genótipo e a quantidade de enzima produzida, sendo que indivíduos com mutações que criam códon de terminação seriam mais propensos a apresentar uma reação imunológica a este tratamento. Estas mutações estão entre as mais frequentes em pacientes com a forma grave da doença (Schull et al., 1994). Entre os 11 pacientes Hurler estudados neste trabalho, apenas dois não apresentaram mutações sem sentido. Logo, pode-se supor que os demais 9 estariam mais propensos a apresentarem reação imunológica durante o tratamento de terapia de reposição enzimática.

Nosso estudo demonstrou que, apesar da prevalência de W402X e P533R na população brasileira com MPS I, há ainda um número significativo de mutações únicas para cada paciente com MPS I, destacando as dificuldades para a triagem de mutações para esta doença numa população tão mista. Entretanto, a análise mutacional é de grande importância para correlações genótipo-fenótipo. As contribuições da análise de mutações para MPS I estão na possibilidade de ter o maior número de informações possíveis para a família, em relação à detecção de portadores, no aconselhamento genético e no diagnóstico pré-natal, assim como para os profissionais, contribuindo na escolha mais racional para tratamento.

## 5. CONCLUSÕES

A análise dos dados levou-nos a concluir que o presente trabalho:

1. Contribuiu para a genotipagem completa de 60% dos pacientes, e a identificação de 76% dos alelos de 25 pacientes brasileiros afetados por Mucopolissacaridose I, com as formas graves, leves e moderadas.
2. Pôde sugerir uma alteração no protocolo de triagem para análise inicial das mutações R89Q, R383H, W402X e P533R, a partir da determinação da frequência de mutações recorrentes e determinação de 56% dos alelos na triagem, e ausência das mutações A327P e Q70X.
3. Identificou 5 novas mutações ainda não descritas na literatura (164del G; A79T, T99I, Y625C e IVS7+1g>a).
4. Confirmou a prevalência de pacientes Hurler entre os pacientes com MPS I, destacando a importância da observação de achados clínicos de recém-nascido até os dois anos de idade, período em que a maioria dos pacientes Hurler são diagnosticados.

## **6. PERSPECTIVAS**

As novas mutações encontradas neste trabalho deverão ser confirmadas através de análise populacional ou ensaio enzimático. Outros testes, até o presente momento não-definidos, deverão ser realizados para a avaliação destas mutações.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alif N, Hess K, Straczek J, Sebbar S, N'Bou A, Nabet P, Dousset B (1999) Mucopolysaccharidosis type I: characterization of a common mutation that causes Hurler syndrome in Moroccan subjects. *Ann Hum Genet*, 63:9-16.
- Ashton LJ, Brooks DA, MCourt PAG, Muller VJ, Clements PR, Hopwood JJ (1992) Immunoquantification and enzyme kinetics of  $\alpha$ -L-iduronidase in cultured fibroblasts from normal controls and mucopolysaccharidosis type I patients. *Am J Hum Genet*, 50:787-794.
- Bach G, Friedman R, Weissmann B, Neufeld EF (1972). The defect in Hurler and Scheie syndromes: deficiency of  $\alpha$ -L-iduronidase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 69:2048-2051.
- Bach G, Moskowitz SM, Tieu PT, Matynia A, Neufeld EF (1993) Molecular analysis of Hurler syndrome in Druze and Muslim Arab patients in Israel: multiple allelic mutations of the IDUA gene in a small geographic area. *Am J Hum Genet*, 53:330-338 .
- Beesley CE, Meaney CA, Greenland G, Adams V, Vellodi A, Young EP, Winchester BG (2001) Mutational analysis of 85 mucopolysaccharidosis type I families: frequency of known mutations, identification of 17 novel mutations and in vitro expression of missense mutations. *Hum Genet*, 109:503-511.
- Beiguelman B (1994) A dinâmica dos genes nas famílias e nas populações. 2ª ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, pg 286.
- Braunlin EA, Stauffer NR, Peters CH, Bass JL, Berry JM, Hopwood JJ, Krivit W (2003) Usefulness of Bone Marrow Transplantation in the Hurler Syndrome. *Am J Cardiol*, 92:882-886.

- Brooks DA, Fabrega S, Hein LK, Parkinson EJ, Durand P, Yogalingam G, Matte U, Giugliani R, Dasvarma A, Eslahpazire J, Henrissat B, Mornon J, Hopwood JJ, Lehn P (2001) Glycosidase active site mutations in human  $\alpha$ -L-iduronidase. *Glycobiology*, 11(9):741-750.
- Bunge S, Kleijer WJ, Steglich C, Beck M, Zuther C, Morris CP, Schwinger E, Hopwood JJ, Scott HS, Gal A (1994) Mucopolysaccharidosis type I: identification of 8 novel mutations and determination of the frequency of the two common  $\alpha$ -L-iduronidase mutations (W402X and Q70X) among European patients. *Hum Mol Genet*, 3:861-866.
- Bunge S, Kleijer WJ, Steglich C, Beck M, Zuther C, Schwinger E, Gal A (1995) Mucopolysaccharidosis type I: Identification of 13 novel mutations of the  $\alpha$ -L-iduronidase gene. *Hum Mutat*, 6:91-94.
- Clarke LA & Scott HS (1993) Two novel mutations causing mucopolysaccharidosis type I detected by single strand conformational analysis of the alpha-L-iduronidase gene. *Hum Mol Genet*, 2(8):1311-1312.
- Clarke LA, Nelson PV, Warrington CL, Morris CP, Hopwood JJ, Scott HS (1994a) Mutation analysis of 19 North American mucopolysaccharidosis type I patients: identification of two additional frequent mutations. *Hum Mutat*, 3:275-282.
- Clarke LA, Nasir J, Zhang H, McDonald H, Applengarth DA, Hayden MR, Toone J (1994b) Murine  $\alpha$ -L-iduronidase:cDNA isolation and expression. *Genomics*, 24:311-316.
- Clements PR, Brooks DA, McCourt PAG, Hopwood JJ (1989) Immunopurification and characterization of human  $\alpha$ -L-iduronidase with the use of monoclonal antibodies. *Biochem J*, 259:199-208.

- Colombo M & Cabello F (2003) Errores innatos del metabolismo lisosomal. In: Colombo MC, Cornejo VE, Raimann EB (eds) Errores innatos en el metabolismo del niño, 2th ed. Santiago de Chile.
- Cox-Brinkman J, Smeulders MJC, Hollak CEM, Wijburg FA (2007) Restricted upper extremity range of motion in mucopolysaccharidosis type I: no response to one year of enzyme replacement therapy. *J Inherit Metab Dis*, 30: 47-50.
- Di Domenico D, Villani GR, Di Napoli D, Reyero EG, Lombardo A, Naldini L, Di Natale P (2005) Gene Therapy for a mucopolysaccharidosis type I murine model with lentiviral-IDUA vector. *Hum Gene Ther*, 16(1):81-90.
- Elbein A & Kaushal GP. (1999) The extracellular Matrix. In: Baynes J & Dominiczak M (eds.) *Medical Biochemistry*. Mosby, London, pp 333-339.
- Gatti R, Di Natale P, Villani GR, Filocamo M, Muller V, Guo XH, Nelson PV, Scott HS, Hopwood JJ (1997) Mutations among Italian mucopolysaccharidosis type I patients. *J Inherit Metab Dis*, 20:803-806.
- Gort L, Chabás A, Coll MJ (1998) Analysis of five mutations in 20 mucopolysaccharidosis type I patients: high prevalence of the W402X mutation. *Hum Mut*, 11:332-333.
- Hartung SD, Frandsen JL, Pan D, Koniar BL, Graupman P, Gunther R, Low WC, Whitley CB, McIvor RS (2004) Correction of Metabolic, Craniofacial, and Neurologic Abnormalities in MPS I Mice Treated at Birth with Adeno-associated Virus Vector Transducing the Human  $\alpha$ -L-Iduronidase Gene. *Molecular Therapy*, 9:866-875.
- Hobbs JR, Barret AJ, Chambers D, James D, Hugh-Jones K, Byrom N, Henry K, Lucas C, Benson B, Tansley L, Patrick A, Mossman J, Young E (1981) Reversal of clinical

features of Hurler's disease and biochemical improvement after treatment by bone-marrow transplantation. *Lancet*, 2:709-712.

Hopwood JJ & Morris CP (1990) The Mucopolysaccharidoses: diagnosis, molecular genetics and treatment. *Mol Biol Med*, 7: 381-404.

Human Mutation Database – <http://www.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/hgmd0.html>

Hugh-Jones K, Hobbs JR, Vellodi A, et al. (1989) Long-term follow-up of children with Hurler's disease treated with bone marrow transplantation. In: Hobbs JR, ed. *Correction of certain genetic diseases by transplantation*. London: COGENT, 103-111.

Hurler G Ueber (1919) Typ multiplier Abartugen Vorwiegend am Skelettsystem. *Z Kinderheik* 24:220.

Jordanova A, Kalaydjieva L, Savov A, Claustres M, Schwarz M, Estivill X, Angelicheva D, Haworth A, Casals T, Kremensky I (1997) SSCP analysis: a blind sensitivity trial. *Hum Mutat*, 10:65-70.

Kakkis E, Muenzer J, Tiller G, Waber L, Bekmont J, Passage M, Izykowski B, Phillips J, Doroshov R, Walot I, Hoft R, Yu K, Okazaki S, Lewis D, Thompson J, Neufeld E (2001) Enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis I. *New England J Med*, 344:182-188.

Kobayashi H, Carbonaro D, Pepper K, Petersen, D, Ge S, Jackson H, Shimada H, Moats R, Kohn DB (2005) Neonatal Gene Therapy of MPSI Mice by Intravenous Injection of a Lentiviral Vector. *Molecular Therapy*, 11:776-788.

- Lee-Chen GJ, Wang TR (1997) Mucopolysacchridosis type I: identification of novel mutations that cause Hurler/Scheie syndrome in Chinese families. *J Med Genet*, 34:939-941.
- Lee-Chen GJ, Lin SP, Chen IS, Chang JH, Yang CW, Chin YW (2002) Mucopolysaccharidosis type I: Identification and characterization of mutations affecting alpha-L-iduronidase activity. *J Formos Med Assoc*, 101(6):425-428.
- Lee IJ, Hwang SH, Jeon BH, Song SM, Kim JS, Paik KH, Kwon EK, Jin D-K (2004) Mutational analysis of the  $\alpha$ -L-iduronidase gene in 10 unrelated Korean type I mucopolusaccharidosis patients: Identification of four novel mutations. *Clin Genet*, 66:575-576.
- Liu Y, Xu L, Henning AK, Kovacs A, Fu A, Chung S, Lee D, Wang B, Herati RS, Ogilvie JM, Cai S, Ponder KP (2005) Liver-directed Neonatal Gene Therapy Prevents Cardiac, Bone, Ear, and Eye Disease in Mucopolysaccharidosis I Mice. *Molecular Therapy*, 11:35-46.
- Lowry RB, Applengarth DA, Toone JR, MacDonald E, Thunem NY (1990) An update on the frequency of the mucopolysaccharide syndromes in British Columbia. *Hum Genet*, 85:389-390.
- Matte U, Leistner S, Lima L, Schwartz I, Giugliani R (2000) Unique Frequency of know Mutations in Brazilian MPS I Patients. *Am J Med Genet*, 90:108-109.
- Matte US (2001) Análise Molecular do Gene da  $\alpha$ -L-iduronidase em pacientes sul-americanos com Mucopolissacaridose Tipo I. Tese de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do sul. Porto Alegre, 88pp.

- Matte U, Yogalingam G, Brooks D, Leistner S, Schwartz I, Lima L, Norato DY, Brum JM, Beesle, C, Winchester B, Giugliani R, Hopwood JJ (2003) Identification and characterization of 13 new mutations in mucopolysaccharidosis type I patients. *Mol Genet Metab*, 78:37-43.
- Meaney C, Vellodi A, Young E, Winchester B (1996) Mutation analysis in Hurler disease MPS I (Abstract) 4<sup>th</sup> International Symposium on Mucopolysaccharide and Related Disorders. Wollongong, Australia.p.39
- Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF (1999) Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA*, 281: 249 – 254.
- Michaud J, Brody LC, Steel G, Fontaine G, Martin LC, Valle D, Mitchell G (1992) Single-Strand conformational polymorphism analysis: efficacy of detection of point mutations in the human ornithine o-aminotrasferase gene. *Genomics*, 10:389-394.
- Moskowitz SM, Tieu PT, Neufeld EF (1993) Mutation in Scheie syndrome (MPS IS): A→G transition creates new splice site in intron 5 of one IDUA allele. *Hum Mutat*, 2:141-144.
- Muenzer J (2004) The mucopolysaccharidosis: a heterogeneous group of disorders with variable pediatric presentations. *J Pediatr*, 144:S27-S34.
- Muenzer J & Fisher A (2004) Advances in the Treatment of Mucopolysaccharidosis Type I. *The New England Journal of Medicine*, 350(19): 1932-34.
- Murray RK & Keeley FW (1998) A matriz extracelular. In: Murray RK, Granner D, Mayes P, Rodwell V. (eds) Harper: Bioquímica. 8<sup>a</sup> ed. São Paulo:Atheneu, 667-685.
- Nelson J (1997) Incidence of the mucopolysaccharidoses in Northern Ireland. *Hum Genet*, 101:355-358.

Neufeld EF & Muenzer J (2001) The mucopolysaccharidosis. In the Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8<sup>th</sup> ed. (C.R. Scriver, A. L Beaudet, W.S. Sly, and D. Valle Eds.), pp.3421-3452. McGraw-Hill, New York.

Orita M Iwahana H, Kana Zawa H, Sekija T (1989) Detection of poly of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphism. Proc Natl Acad Sci USA, 86: 2766-2770.

Pastores GM, Arn P, Beck M, Clarke JTR, Guffon N, Kaplan , Muenzer J, Norato DYJ, Shapiro E, Thomas J, Viskochil D, Wraith JE (2007) The MPS I registry: Design, methodology, and early findings of a global disease registry for monitoring patients with Mucopolysaccharidosis Type I. Mol Genet Metab, 91:37-47.

Peters C, Balthazor M, Shapiro E, King R, Kollman C, Hegland JC, Henslee-Downey J, Trigg ME, Cowan MJ, Sanders J, Bunin N, Weinstein H, Lenarsky C, Falk P, Harris R, Bowen T, Williams T, Grayson G, Warketin P, Sender L, Cool V, Crittenden M, Packman S, Kaplan P, Lockman L, Anderson J, Krivit W, Dusenbery K, Wagner J (1996) Outcome of unrelated donor bone marrow transplantation in 40 children with Hurler syndrome. Blood, 87(11):4894-4902.

Peters C, Shapiro E, Anderson J, Henslee-Downey J, Klemepere MR, Cowan MJ, Saunders EF, de Alarcon PA, Twist C, Nachman JB, Hale G, Harris R, Rozans MK, Kurtzberg J, Grayson G, Williams T, Lenarsky C, Wagner J, Krivit W, and the members of The Storage Disease Collaborative Study Group (1998) Hurler syndrome: II. Outcome of HLA-genotypically identical sibling and HLA-haploidentical related donor bone marrow transplantation in fifty-four children. Blood, 91:2601-2608.

Poorthuis BJ, Wevers RA, Kleijer WJ, Groener JE, de Jong JG, van Weely S, Niezen-Koning KE, van Diggelen OP (1999) The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands, Hum Genet,105:151-156.

- Ravnik-Glavac M, Glavac D, Dean M (1994) Sensitivity of single-strand conformation polymorphism and heteroduplex method for mutation detection in the cystic fibrosis gene. *Hum Mol Genet*, 3:801-807.
- Sánchez MB & Fuentes FJR (2006) Mucopolisacaridosis. In: *Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias*, 2ª ed. (P. Sanjurjo e A. Baldellou), 421-429. Madrid.
- Schuchman & Desnick R (1988) Mucopolysaccharidosis type I subtypes. *J Clin Invest*, 81:98-105.
- Schull LJ, Kakkis ED, McEntee MF, Kania S, Jonas AJ, Neufeld EF (1994) Enzyme replacement in a canine model of Hurler syndromes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 12937-12941.
- Schwartz IVD (2000) Mucopolisacaridose tipo I: análise da variabilidade clínica e da associação com o genótipo entre pacientes brasileiros. Dissertação de mestrado do Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do sul. Porto Alegre, 143pp.
- Scott HS, Ashton LJ, Eyre HJ, Baker E, Brooks DA, Callen DF, Shuterland GR, Morris CP, Hopwood JJ (1990) Chromosomal localization of the human  $\alpha$ -L-iduronidase gene (IDUA) to 4p16.3. *Am J Hum Genet*, 47:802-807.
- Scott HS, Anson DS, Osborn AM, Nelson PV, Clements PR, Morris CP, Hopwood JJ (1991) Human  $\alpha$ -L-iduronidase: cDNA isolation and expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88:9695-9699



- Scott HS, Litjens T, Hopwood JJ, Morris CP (1992a) A common mutation for mucopolysaccharidosis type I associated with a severe Hurler syndrome phenotype. *Hum Mutat*, 1:103-108.
- Scott HS, Litjens T, Nelson PV, Brooks DA, Hopwood JJ, Morris CP (1992b)  $\alpha$ -L-iduronidase mutations (Q70X and P533R) associated with a severe Hurler phenotype. *Hum Mutat*, 1:333-339.
- Scott HS, Nelson PV, Litjens T, Hopwood JJ, Morris CP (1993) Multiple polymorphisms within the  $\alpha$ -L-iduronidase gene (IDUA): Implications for a role in modification of MPS I disease phenotype. *Hum Mol Genet*, 2:1471-1473.
- Scott HS, Bunge S, Gal A, Clarke LA, Morris P, Hopwood JJ (1995) Molecular genetics of Mucopolysaccharidosis type I: Diagnostic, clinical and biological implications. *Hum Mut*, 6:288-302.
- Sheffield VC, Beck JS, Kwitek A, Sandstrom DV, Stone EM (1993) The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics*, 16:325-332.
- Sifuentes M, Doorshow R, Hoft R, Mason G, Walot I, Diamant M, Okazaki S, Huff K, Cox GF, Swiedler SJ, Kakkis ED (2007) A follow-up study of MPS I patients treated with laronidase enzyme replacement therapy for 6 years. *Mol Genetics and Metabolism*, 90(2):171-180.
- Stoltzfus LJ, Sosa-Pineda B, Moskowitz SM, Menos KP, Dlott B, Hooper L, Teplow DB, Shull RM, Neufeld EF (1992) Cloning and characterization of cDNA Encoding Canine  $\alpha$ -L-iduronidase. *The journal of Biological Chemistry*, 267(10):6570-6575.
- Taylor JA, Gibson GJ, Brooks DA, Hopwood JJ (1991)  $\alpha$ -L-iduronidase in normal and mucopolysaccharidosis-type-I human skin fibroblasts. *Biochem J*, 274:263-268.

- Teng YN, Wang TR, Hwu WL, Lin SP, Lee-Chen GJ (2000) Identification and characterization of -3c-g acceptor splice site mutation in human alpha-L-iduronidase associated with mucopolysaccharidosis type IH/S. *Clin Genet*, 57:131-136.
- Terlato NJ & Cox GF (2003) Can mucopolysaccharidosis type I disease severity be predicted based on a patient's genotype? A comprehensive review of the literature. *Genet Med*, 5(4):286-294.
- Tieu PT, Bach G, Matynia A, Hwang M, Neufeld EF (1995) Four novel mutations underlying mild or intermediate forms of  $\alpha$ -L-iduronidase deficiency (MPS IS and MPS IH/S). *Hum Mutat*, 6:55-59.
- Tokic V, Barisic I, Huzjak N, Petkovic G, Fumic K, Paschke E (2007) Enzyme replacement therapy in two patients with an advanced severe (Hurler) phenotype of mucopolysaccharidosis I. *Eur J Pediatr*, 166:727-732.
- Vellodi A, Young EP, Cooper A, Wraith JE, Winchester B, Meaney C, Ramaswami U, Will A (1997) Bone marrow transplantation for mucopolysaccharidosis type I: experience of two British centers. *Arch Dis Child*, 76:92-99.
- Vijay S & Wraith JE (2005) Clinical presentation and follow-up of patients with the attenuated phenotype of mucopolysaccharidosis type I. *Acta Pediatr*, 94(7):872-877.
- Voskoboeva EY, Krasnopolskaya XD, Mirenburg TV, Weber B, Hopwood JJ (1998) Molecular genetics of Mucopolysaccharidosis type I: mutation analysis among the patients of the former Soviet Union. *Mol Genet Metab*, 65:174-180.
- Wajner M, Vargas CR, Burin M, Giugliani R, Coelho JC (2001) Investigação de Erros Inatos do Metabolismo. *Revista HCPA*, 3:343-360.

- Weisstein JS, Delgado E, Steinbach LS, Hart, K, Packman S (2004) Musculoskeletal Manifestations of Hurler Syndrome. *J Pediatr Orthop*, 24 (1): 97-101.
- Whitley CB, Krivit W, Ramsay NKC, Kersey JH, Chang RE, Latchlaw, Blazar BR, Scott HS, Nelson PV, Morris CP, Hopwood JJ (1993) Mutation analysis and clinical outcome of patients with Hurler syndrome (mucopolysaccharidosis type I-H) undergoing bone marrow transplantation. *Am J Hum Genet*, 52:A101.
- Wiesmann U & Neufeld EF (1970) Scheie and Hurler syndromes: apparent identify of the biochemical defect. *Science*, 169:72-74.
- Winchester B (1996) Lysosomal Metabolism of Glycoconjugates. In: *Subcellular Biochemistry*. Vol. 27; *Biology of the Lysosome*. Ed. Lloyd & Mason. Plenum Press, New York, 191-238.
- Wraith JE (2005) The first 5 years of clinical experience with laronidase enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis I. *Expert Opin. Pharmacother*, 6:489-506.
- Wraith JE, Beck M, Lane R, Van der Ploeg A, Shapiro E, Xue Y, Kakkis ED, Guffon N (2007) Enzyme Replacement Therapy in Patients who have Mucopolysaccharidosis I and are younger than 5 years: Results of a multinational study of recombinant human  $\alpha$ -L-Iduronidase (Laronidase). *Pediatrics*, 120: 37-46.
- Yamagishi A, Tomatsu S, Fukuda S, Uchiyama A, Shimosawa N, Suzuki Y, Kondo N, Sukegawa K, Orii T (1996) Mucopolysaccharidosis type I: identification of common mutations that cause Hurler and Scheie syndromes in Japanese populations. *Hum Mut*, 7:23-29.

Table 3 – Genotype-phenotype correlation and clinical features for the Brazilian patients, showing the presence of other molecular changes.

Patient	Genotype	Exons sequenced <sup>a</sup>	Other changes <sup>b</sup>	Parental consanguinity	Age at diagnosis	Age at last evaluation	Height (percentile)	Sleep obstructive Apnea	Neuropsychomotor development	Cardiac Abnormalities	Type
01	P533R/ND	2,	L118	No	3y 8m	3y8m	-	-	-	-	H or H/S
02	W402X/ W402X	Not sequenced		No	1y9m	Death at 3y2m	79.5 cm (between -5 AND -4SD)	Yes	Delayed	Tricuspid regurgitation	H
03	P533R/ P533R	Not sequenced		Yes	3y11m	4y2m	97cm (>-2SD)	Yes	Delayed	Cardiomegaly	H/S or H
04	W402X/ W402X	Not sequenced		Yes	1y6m	1y6m	-	-	Delayed	Dilated cardiomyopathy; mild mitral regurgitation	H
05	R383H/ P533R	Not sequenced		Yes	7y5m	10yo	136.7cm (>2SD)	No	Normal	Mild mitral and aortic insufficiencies	S
06	W402X/ W402X	Not sequenced		No	1y2m	Death at 3y10m	92 cm (>-2SD)	Yes (severe)	Delayed	Dilated cardiomyopathy dilatada, left ventricle enlarged	H
07	Y625C/A79T	2, 6, 14	T99I	No	1y5m	1y6m	79cm (>-2SD)	No	Normal	Normal	H/S or H
08	W402X/ND			No	7y7m	9y9m	102,8 cm (between -5 AND -4 SD)	Yes (mild)	Delayed	Mild mitral insufficiency; pulmonary hypertension.	H
09	ND	5, 6, 8	A361T, T388, V454I, T410, L118	No	1y3m	1y3m	-	-	-	-	H
10	W402X/ W402X	Not sequenced		Yes	2y	2y	82.5 cm (>-2SD)	Yes	Normal	-	H
11	IVS 7+1g→a/ND	6, 7, 9, 14		No	6y11m	8y5m	115.3 cm (between -3 AND -2SD)	Yes (mild)	Normal	-	H/S
12	Y625C/ND	14		No	2y9m	4a3mo	91,5 cm (-3SD)	Yes (severe)	Delayed	-	H
13	W402X/ W402X	Not sequenced		No	4y	9y3mo	99 cm (between -6 AND -5SD)	Yes	Delayed since the first year of life	Mild mitral and aortic regurgitation	H
14	ND	7, 8, 13		No	12y7m	12y7m	120 cm (between -5 AND -4SD)	No	Normal	-	H/S
15	P533R/R89Q	Not sequenced		No	2y3m	1y11mo	82 cm (>-2SD)	-	Normal	Normal	S
16	R383H/ND	1,	A8, A20	No	13y2m	19y7mo	150 cm (between -3 AND -2SD)	Yes	Normal	Mild mitral thickness	S

17	R619X/ND	13, 14		No	11m	2y2mo	82 cm (>-2SD)	-	Normal	Mild mitral insufficiency	H
18	W402X/R628X	1, 2, 3 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11-12,13, 14	L118	No	-	-	-	-	-	-	H/S or H
19	W402X/W402X	Not sequenced		No	1y7m	1y4mo	76 cm (>-2SD)	-	Normal	-	H
20	P533R/ P533R	Not sequenced		No	6y5m	6yo	109 cm (>-2SD)	Yes	Normal	Normal	H/S
21	G208D/E182K	5, 6		No	5y9m	9yo	104cm (between -5 AND -4SD)	Yes (severe)	Delayed	Mitral and tricuspid regurgitation	H
22	P533R/ND	6,		No	10y8m	10y7mo	126 cm (between -3 AND -2SD)	Yes (mild)	Delayed	-	H/S
23	P533R/R89Q	Not sequenced		No	10y3m	8yo	112 cm (between -3 AND -2SD)	Yes	Normal	Mitral regurgitation, cardiomegaly	H/S
24	R383H/164del G			No	25y10m	25y10mo	-	-	-	-	S
25	Y343X/ND	8		No	20y4m	21y6mo	158,2 (>-2SD)	No	Normal	Mild aortic stenosis, mild mitral insufficiency	S

S (Scheie); H/S (Hurler-Scheie); H (Hurler); ND (not determined); - (Data not available)

<sup>a</sup> Note that not all patients had all exons sequenced.

<sup>b</sup> Other changes refers to polymorphic alterations found after sequencing.